

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

**RODRIGO LUCAS PÉREZ**

**ENGENHARIA DE NICHOS HEMATOPOIÉTICO:  
AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE CULTURA  
TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
DA PLACENTA HUMANA EM ARCABOUÇOS DE  
POLI(METACRILATO DE METILA) (PMMA)**

**FLORIANÓPOLIS  
2017**



Rodrigo Lucas Pérez

**ENGENHARIA DE NICHOS HEMATOPOIÉTICO:  
AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE CULTURA  
TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
DA PLACENTA HUMANA EM ARCABOUÇOS DE  
POLI(METACRILATO DE METILA) (PMMNA)**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio Alvarez-Silva

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Ferreira Dutra

Florianópolis  
2017

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

Pérez, Rodrigo Lucas

Engenharia de Nicho Hematopoiético: Avaliação de um Sistema de Cultura Tridimensional de Células-Tronco Mesenquimais da Placenta Humana em Arcabouços de Poli(metacrilato de metila) (PMMNA) / Rodrigo Lucas Pérez ; orientador, Marcio Alvarez Silva ; corientador, Márcio Ferreira Dutra. Florianópolis, SC, 2017.

132 p.

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

Inclui referências.

1. Biologia Celular. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Placenta humana. 4. Nicho hematopoiético. 5. Arcabouço de PMMA. I. Silva, Marcio Alvarez. II. Dutra, Márcio Ferreira. III Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

**"Engenharia de nicho hematopoiético: avaliação de um sistema de cultura tridimensional de células-tronco mesenquimais da placenta humana em arcabouços de poli(metacrilato de metila) (PMMA)"**

Por

**Rodrigo Pérez Lucas**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (20/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

---

Prof. Dr. Geison de Souza Izidio  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

---

Dr. Marcio Alvarez Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador

---

Dr.ª Fernanda Vieira Bert (Universidade Federal de Santa Catarina)

---

Dr.ª Cláudia Beatriz Nedel M. de Aguiar (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 16 de outubro de 2017.



Este trabalho é dedicado à minha família, aos meus colegas do programa e a todas as outras pessoas que mantive contato durante o período do trabalho.





## AGRADECIMENTOS

Os mais de dois anos dedicados a este trabalho de mestrado deram-me a oportunidade de conhecer pessoas incríveis que, de maneira direta ou indireta, tornaram possível esta aventura. Não tem sido uma tarefa fácil, mais sim enriquecedora.

A meu orientador, o Prof. Dr. Marcio Alvarez Silva, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório e pelos ensinamentos e sugestões sempre oportunos.

A meu coorientador, Prof. Dr. Marcio Dutra, obrigado por toda paciência.

Ao Prof. Rogerio Gargioni, por toda ajuda ao longo do trabalho, especialmente pelos ensinamentos das técnicas de imunomarcção e pelos gratificantes cafezinhos após o almoço junto com o Prof. Anicleto Poli.

Um agradecimento especial a todas as mães doadoras que, mesmo em um momento de incômodos e sentimentos de ansiedade, tiveram a complacência, após as explicações sobre os objetivos da pesquisa, de concordar em participar.

A quem, além de colaborador voluntário, considero um grande amigo e referência, o Dr. Aloisio Benedetti. Você é responsável por tudo do bom e nada do mau que possa conter neste trabalho. Foi quem, de fato, fez com que todas as coisas pudessem caminhar. Obrigado pelas técnicas ensinadas e pelas largas horas de diálogo sobre nosso grande assunto de interesse: a expansão *ex vivo* de progenitores hematopoiéticos.

A todos do Centro de Obstetrícia do Hospital Universitário, especialmente à Dra. Leisa Grado e à Elisangela.

A todos os professores da pós-graduação, que contribuíram com a experiência teórica e com a paciência para meu crescimento acadêmico.

Ao Prof. Giordano Calloni, pelos ensinamentos e discussão das questões mecanobiológicas, imprescindíveis para este trabalho.

A todos os professores e colegas do LACERT, os quais foram responsáveis para que este trabalho pudesse ser realizado. Obrigado, Diana, pelo constante e desinteressado auxílio nos experimentos, pelas ideias e sugestões compartilhadas. Muito obrigado, Priscilla, pela ajuda permanente e, particularmente, pelos momentos extracurriculares.

Ao Prof. Paulo Dias, por todos os ensinamentos, sugestões e, sobretudo, pelo espaço físico da sala de cultivo, onde grande parte deste trabalho desenvolveu-se.

À Prof.<sup>a</sup>. Claudia Nedel e a todo o grupo do laboratório de Biologia de Gliomas, Flavia Lopes, Joao e Luan, por todo o apoio e suporte permanentes.

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado, do Laboratório de Controle de Processos (LCP). Foi com a sua colaboração que o objetivo ousado deste projeto teve a oportunidade de concretizar-se. Foi sua a ideia de usarmos o PMMA como elemento de fabricação do arcabouço.

Ao Luiz Belchior, com quem compartilhei esta aventura de construir um arcabouço com propriedades únicas, porém com métodos simples e baratos para cultivo 3D.

À Dra. Cristiane Nunes Lopes, que foi com quem tive a oportunidade de conhecer o Prof. Ricardo, do LCP e, assim, estabelecer a colaboração para este trabalho.

À Bruna Caetano. Você teve uma participação indispensável na confecção dos arcabouços.

De fato, a todo o pessoal do LCP, que me permitiu compartilhar um pouco do fascinante mundo da engenharia de materiais.

À Carmen Siniomi, do Laboratório de Biológica Celular Vegetal da UFSC, pela importantíssima ajuda no preparado e nas análises das amostras em microscopia eletrônica e confocal.

A toda a equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, especialmente à Susane Lopes pelas incríveis imagens de microscopia eletrônicas de varredura.

À minha amiga Thaise Geremia, pelas importantes sugestões, pelos interessantes experimentos e pelas aventuras dos afazeres de estudante.

À Indahiá Janaína Shroeder, pela confiança e paciência durante o tempo de trabalho.

A meu amigo Günther Gerar Gerent, pelos ensinamentos, pelas sugestões e pelos gratificantes momentos extracurriculares.

A todos os colegas de laboratório, aqueles que se foram e aqueles que estão chegando: Meice, Carolina, Mariana, Isabella, Lucas e Issac.

Ao grupo de segurança do MIP/BEG, especialmente ao meu amigo Lenildo, pelas importantes sugestões.

A todo o grupo da limpeza do CCB. É pelo trabalho deles que é possível realizar o nosso.

À minha família, pelo apoio e confiança permanentes durante este tempo de trabalho.

*"Você não muda as coisas lutando contra a realidade atual. Para mudar algo, é necessário construir um novo modelo que torne obsoleto o modelo em vigência."*

-Buckminster Fuller-



## RESUMO

No contexto da engenharia de tecidos, as novas propostas têm em vista a recriação dos microambientes biológicos (nichos) onde residem as células-tronco (CTs) *in vivo*, em particular os nichos hematopoéticos onde as células-tronco progenitoras hematopoéticas (CTPHs) são naturalmente expandidas. Sistemas de cultivo celular tridimensionais (3D) baseados em arcabouços poliméricos, têm sido empregados com a finalidade de controlar os processos de multiplicação e diferenciação dessas células *in vitro*. Assim, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e avaliação de um sistema de cultivo 3D de células-tronco mesenquimais da placenta humana (CTMs-PH) como possível modelo de nicho hematopoético *in vitro* para o estudo da fisiologia da hematopoiese, e em particular para a expansão *ex vivo* das CTPHs para transplante. Para isso, as células foram isoladas, da região das vilosidades coriônicas da placenta humana (n=3) onde se encontram os nichos hematopoéticos nesse órgão durante o desenvolvimento embrionário, pela capacidade da adesão ao plástico de cultivo. As células foram, então, caracterizadas morfolologicamente e funcionalmente como sendo fibroblastóide, com potencial de diferenciação nas linhagens mesodermis adipogênica e osteogênica e com capacidade de formar colônia (CFC) quando semeadas em baixa densidade obtendo em média  $5 \pm 4,546$ ,  $15,83 \pm 3,488$ ,  $3,75 \pm 2,872$  colônias nas amostras 1, 2 e 3, respectivamente. Todavia, foram realizados ensaios de curvas de proliferação para avaliar o comportamento da multiplicação das células em cultivo em função do tempo, observando um padrão de duas fases na cinética de multiplicação. Por outro lado, as CTMs-PH foram capazes de ser transfectadas com o plasmídeo pCX-EGFP, que contém um inserto do gene da proteína verde fluorescente (GFP), através da metodologia de eletroporação, utilizando o sistema comercial Neon<sup>®</sup> Transfection System. Para tal,  $5 \times 10^4$  células foram submetidas a tratamentos com dois protocolos denominados A (1 pulso de 20 ms de 1700 V) e, B (1 pulso de 40 ms de 990 V) utilizando concentrações de 1 ou 2  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico, e comparados através da quantificação da fluorescência, sendo a configuração do protocolo B com 1  $\mu\text{g}$  de DNA a condição de maior eficiência relativa de transfecção. Ainda, foi possível padronizar a confecção de arcabouços de poli(metacrilato de metila) (PMMA) com valores calculados do tamanho de poros de  $875,1 \pm 231,9 \mu\text{m}$ ,  $1424 \pm 310,3 \mu\text{m}$  e  $1832 \pm 260,1 \mu\text{m}$ , porosidade média de 75,14%, 73,49% e 71,71%, respectivamente, e módulo de Young controlável mediante a utilização de um sistema de fusão de cristais de NaCl em ambiente úmido.

Finalmente, foi possível cultivar as CTMs-PH nos arcabouços de PMMA com os três tamanhos de poros. Através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal foi observado que as CTMs-PH apresentaram uma distribuição 3D no interior dos arcabouços, com boa capacidade de adesão e possivelmente com depósitos de moléculas de matriz extracelular. Com base nos resultados, conclui-se que este sistema de cultivo 3D de CTMs-PH em arcabouços de PMMA representa um modelo atrativo para futuras avaliações de expansão *ex vivo* de CTPHs.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais. Placenta Humana. Nicho hematopoiético. Arcabouço de PMMA. Cultivo tridimensional.

## ABSTRACT

In the context of tissue engineering, the current proposals aim for the mimicking the biological microenvironments where the stem cells (SCs) reside *in vivo*, particularly the hematopoietic stem cells niche in which the hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) are naturally expanded, by through the engineering of three-dimensional (3D) scaffolds based on biomaterials. This in order to control the processes of self-renewal and differentiation of these cells *in vitro*. This study is focused on the development and evaluation of a 3D culture system of human placenta derived mesenchymal stem cells (P-MSCs) as a possible model of hematopoietic niche *in vitro* for the study of the physiology of hematopoiesis, and in particular for the *ex vivo* expansion of the HSPCs for transplantation. For this purpose, mesenchymal stem cells were isolated based on their culture plastic adhesion from the chorionic villi of the human placenta (P-MSCs) (n=3) which compose the HSPCs niche throughout embryonic development. Cells were then morphologically and functionally characterized as fibroblastóide-like morphology exhibiting capability to differentiate into adipogenic and osteogenic mesodermal lineages and in still they show ability to form colonies at a low density of seeding cells obtaining  $5 \pm 4.546$ ,  $15.83 \pm 3.488$ ,  $3.75 \pm 2.872$  colonies from samples 1, 2 and 3 respectively. In addition, growth curve assays were performed to evaluate the kinetics of the cell's proliferation in culture showing a two-phase pattern in multiplication kinetics. Further, the P-MSCs was able to be transfected with a pCX-EGFP plasmid which contain the fluorescent green protein (GFP) gene insert through electroporation methodology by using the Neon<sup>®</sup> Transfection System. For this,  $5 \times 10^4$  cells were treated with two differences protocols designed A (1 pulse of 20ms, 1700V) and B (1 pulse of 40ms, 990V) with 1 or 2  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA per  $10\mu\text{L}$  volume reaction, and compared by using fluorescence quantification, resulting the configuration of protocol B with 1  $\mu\text{g}$  of DNA the condition of superior efficiency of transfection. In addition, it was possible to standardize the fabrication of poly(methyl methacrylate) (PMMA) scaffolds with pore size of  $875,1 \pm 231,9 \mu\text{m}$ ,  $1424 \pm 310,3 \mu\text{m}$  and  $1832 \pm 260,1 \mu\text{m}$ , porosity of 75,14%, 73,49% e 71,71% respectively and a controllable compression modulus using a salt fusion method. Finally, it was possible to culture the P-MSCs in the PMMA scaffolds of the three different pore sizes. By using a scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy it was observe that the P-MSCs acquire a real 3D distribution within the PMMA scaffolds, having good adhesion capacity and likely deposit of extracellular matrix

molecules. So, based on the results it is concluded that this 3D culture system of P-MSCs in PMMA scaffolds represents an attractive model for future valuations of *ex-vivo* expansion of HSPCs.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells. Human placenta. Hematopoietic stem cell niche. PMMA scaffold. 3D culture system.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos e fontes de CTs. ....	34
Figura 2: Os componentes dos nichos das CTs. ....	36
Figura 3: Macro e microarquitetura do osso esponjosos. ....	37
Figura 4: O nicho hematopoietico na medula óssea. ....	39
Figura 5: Estrutura interna da placenta humana. ....	40
Figura 6: Estrutura química PMMA. ....	47
Figura 7: Reação de polimerização do PMMA. ....	48
Figura 8: Morfologia, proliferação e migração das CTMs-PH durante o período de cultivo primário. ....	67
Figura 9: Diferenciação adipogênica. ....	69
Figura 10: Diferenciação osteogênica. ....	70
Figura 11: Células formadoras de colônias. ....	71
Figura 12: Quantificação das colônias nos ensaios de CFC. ....	72
Figura 13: Curvas de proliferação e viabilidade celular. ....	73
Figura 14: Áreas calculadas das curvas de proliferação. ....	74
Figura 15: Teste de citocompatibilidade do PMMA compacto. ....	75
Figura 16: Arcabouços protótipos de PMMA fabricados com PS como elemento porogênico. ....	76
Figura 17: Aspecto macroscópico dos arcabouços de PMMA produzidos com o método de fusão de cristais de NaCl. ....	77
Figura 18: Macroestrutura dos arcabouços de PMMA produzidos com o método de fusão de cristais de NaCl. ....	78
Figura 19: Microestrutura dos arcabouços de PMMA produzidos com o método de fusão de cristais de NaCl. ....	79
Figura 20: Tamanho do poro. ....	80
Figura 21: Porosidade (%P). ....	81
Figura 22: Módulo de Young. ....	82

Figura 23: Análise de correlação entre o valor do módulo Young e a porosidade.....	83
Figura 24: Testes de cultivo 3D das CTMs-PH nos arcabouços de PMMA. ....	84
Figura 25: CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcabouços de PMMA fabricados com a granulometria G I de cristais de NaCl. ....	85
Figura 26: CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcabouços de PMMA fabricados com a granulometria G II e tripsinizados. ....	86
Figura 27: CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcabouços de PMMA fabricados com a granulometria G III de cristais de NaCl.....	87
Figura 28: Dimensionalidade do crescimento e morfologia das CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcabouços de PMMA G I e G III. ....	88
Figura 29: Mapa gênico da plasmídeo pCX-EGFP.....	127
Figura 30: Fluorescência das CTMs-PH transfectadas com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando os protocolos A e B. ....	130
Figura 31: Fluorescência das CTMs-PH transfectadas com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando os protocolos A e B. ....	131
Figura 32: Fluorescência das CTMs-PH transfectadas com plasmídeo pCX-EGFP após 24h e 168 h (7 dias) em cultivo. ....	132

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades estruturais e mecânicas do osso esponjoso. ....	38
Tabela 2: Propriedades físicas e mecânicas do PMMA. ....	48
Tabela 3: Análise estatística das colônias obtidas nos ensaios de CFC.	72
Tabela 4: Análise estatística das áreas das curvas de proliferação.....	74
Tabela 5: Análise estatística do tamanho médio dos poros dos arca-bouços de PMMA.....	80
Tabela 6: Análise estatística dos valores da porosidade total (%P) dos arca-bouços de PMMA.....	81
Tabela 7: Análise estatística dos valores de módulo de Young dos arca-bouços de PMMA.....	83
Tabela 8: Protocolos de eletroporação e condições experimentais de transfecção.....	128
Tabela 9: Análise estatística da fluorescência das CTMs-PH transfectadas com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando os protocolos A e B. ....	131
Tabela 10: Análise estatística da fluorescência das CTMs-PH transfectadas com plasmídeo pCX-EGFP após 24h e 168 h (7 dias) em cultivo.....	132



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AGM	Aorta-gônada-mesonefrons
ANOVA	Análise de variância
BEG	Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
CAR	Células Reticulares abundantes em CXCL-12
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CFC	Células formadoras de colônia
CT (s)	Célula (s) tronco
CTA (s)	Célula (s) tronco pós-natais/adultas
CTE(s)	Célula (s) troco embrionária (s)
CTF (s)	Células tronco fetais
CTPHs(s)	Células tronco progenitoras hematopoiéticas
CTM(s)	Célula (s) tronco mesenquimais
CTMs-PH	Célula (s) tronco mesenquimais da placenta humana
DECH	Doença de enxerto contra hospedeiro
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECT	Enxerto contra tumor
EPO	Eritropoietina
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>green fluorescent protein</i> )
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês; <i>human leucocyte antigen</i> )
HU	Hospital Universitário
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPSC ou iPS	Célula (s) reprogramadas ou CT de pluripotência induzida
LaBCeV	Laboratório de Biologia Celular Vegetal
MdC	Meio de cultivo: IMDM suplementado com 10% de SBF e 100.000U/L de Pen/Est
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Medula óssea
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF- $\beta$	Fator de crescimento $\beta$ derivado de plaqueta
PEG	Polietilenglicólico
Pen/Est	Penicilina e estreptomicina
PFA	Paraformaldeído

PH	Placenta humana
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido polietileglicólico
PLG	Poliglicólico
PLGA	Polilaticoglicólico
PMMA	Polimetilmetacrilato
PS	Poliestireno
SBF	Soro bovino fetal
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
TCH	Transplante de células hematopoiéticas
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMO	Transplante de medula óssea
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	27
1.1. OBJETIVOS .....	31
1.1.1. Objetivo Geral .....	31
1.1.2. Objetivos Específicos.....	31
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	33
2.1. CÉLULAS-TRONCO .....	33
2.1.1. Células tronco mesenquimais .....	34
2.2. O NICHOS DAS CÉLULAS-TRONCO.....	35
2.2.1. O nicho hematopoiético na medula óssea .....	37
2.3. PLACENTA HUMANA .....	39
2.3.1. A placenta humana como fonte de células-tronco .....	41
2.3.2. A placenta como órgão hematopoiético durante o desenvolvimento .....	41
2.3.3. O nicho hematopoiético na placenta .....	42
2.4. TRANSPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS .....	42
2.4.1. Problemática associada ao SCUP.....	44
2.4.2. Estratégias para superar as limitações do SCUP como fonte de células hematopoiéticas para transplante .....	45
2.5. SISTEMAS DE CULTIVOS TRIDIMENSIONAIS E BIOMATERIAIS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS .....	45
2.5.1. Biomateriais e arcabouços para engenharia de tecidos.....	46
2.5.2. Poli(metacrilato de metila) (PMMA) .....	47
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
3.1. APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA DA UFSC E NO CENTRO DE OBSTETRÍCIA DO HU .....	51
3.2. DOS DOADORES E DOS CRITÉRIOS DE SELEÇÃO .....	51
3.3. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS DE PLACENTA.....	51
3.4. ISOLAMENTO, CULTIVO PRIMÁRIO E SUBCULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA.....	52
3.5. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS ISOLADAS DA PLACENTA HUMANA .....	54
3.5.1. Ensaios de potencial de diferenciação nas linhagens mesodermiais .....	54
3.5.1.1. Ensaio de potencial de diferenciação adipogênica.....	55
3.5.1.2. Ensaio de potencial diferenciação osteogênica.....	55
3.5.2. Ensaio de células formadoras de colônia (CFC) .....	56

3.6. CURVAS DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	56
3.7. CONFECÇÃO DO ARCABOUÇO DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA)	57
3.7.1. Escolha do material e testes de citocompatibilidade	58
3.7.2. Primeira fase da síntese: Poliestireno como elemento porogênico	58
3.7.3. Fase de otimização do método de confecção: cristais de NaCl como elemento porogênico	59
3.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MECÂNICA DOS ARCABOUÇOS DE PMMA	60
3.8.1. Análise da macro e microestrutura	60
3.8.2. Porosimetria	60
3.8.3. Porosidade total	60
3.8.4. Ensaio de resistência a tensão e deformação (modulo de Young)	61
3.9. CULTIVOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA EM AMBIENTE 3D NOS ARCABOUÇOS DE PMMA	61
3.9.1. Teste de cultivo 3D nos arcabouços	61
3.9.2. Microscopia eletrônica de varredura	62
3.9.3. Microscopia confocal	63
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>67</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA	67
4.1.1. Ensaios de diferenciação nas linhagens mesodermis	68
4.1.2. Ensaios células formadoras de colônia (CFC)	71
4.2. CURVAS DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	72
4.3. CONFECÇÃO DO ARCABOUÇO DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA)	75
4.3.1. Escolha do material e testes de citocompatibilidade	75
4.3.2. Primeira fase da síntese: Poliestireno como elemento porogênico	76
4.3.3. Fase de otimização do método de confecção: cristais de NaCl como elemento porogênico	76
4.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MECÂNICA DOS ARCABOUÇOS DE PMMA	77
4.4.1. Porosimetria	80
4.4.2. Porosidade total	81
4.4.3. Ensaio de resistência a tensão e deformação (modulo de Young)	82



4.5. CULTIVOS TRIDIMENSIONAIS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA NOS ARCABOUÇOS DE PMMA.....	84
<b>4.5.1. Teste de cultivo 3D nos arcabouços de PMMA.....</b>	<b>84</b>
<b>4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</b>	<b>85</b>
<b>4.5.3. Microscopia confocal.....</b>	<b>88</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>101</b>
6.1. CONCLUSÕES.....	101
6.2. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO A - TCLE: Coleta das amostras de placenta humana para isolamento das CTMs.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO B - Sobre os critérios de inclusão e exclusão.....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO C - Desenho experimental.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO D – Transfecção das CTMs-PH com plasmídeo pCX-EGPF mediante eletroporação.....</b>	<b>127</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O transplante de células hematopoiéticas (TCH) constitui o único tratamento baseado em células-tronco (CTs) integralmente estabelecido na clínica, com mais de cinco décadas de reconhecimento e plena consolidação (HENIG; ZUCKERMAN, 2014). É visto com grande potencial curativo, sendo utilizado para tratar mais de 80 doenças hematológicas, tanto neoplásicas quanto não neoplásicas com origem em disfunções imune ou metabólica (HOROWITZ, 2016).

Tradicionalmente, as fontes de células-tronco/progenitores hematopoiéticos (CTPHs) utilizadas para transplante têm sido o sangue de medula óssea e o sangue periférico mobilizado (BLUME; THOMAS, 2016). Entretanto, o uso dessas fontes para TCH requer uma estreita compatibilidade imunológica (entre receptor e doador) quanto ao antígeno HLA (Antígeno Leucocitário Humano do inglês; *human leucocyte antigen*) (PARK; SEO, 2012). Isso estabelece a problemática do encontro de possíveis doadores compatíveis, o que impõe certa limitação ao uso desse recurso terapêutico (ALWASAIKI; BREDESON, 2014).

Assim, o uso há quase três décadas do sangue de cordão umbilical e placenta (SCUP) como uma fonte alternativa de CTPHs tem significado uma amenização do problema do encontro de doadores HLA compatíveis (BALLEN, K. K.; GLUCKMAN; BROXMEYER, 2013).

Não obstante, o reduzido volume de SCUP que se encontra disponível nas redes vasculares do cordão umbilical e placenta determina uma baixa quantidade absoluta de CTPHs disponível para transplante (BALLEN, K., 2017).

Em vista disso, um conjunto de estratégias têm sido utilizadas nos últimos anos com intuito de superar as limitações impostas pela baixa quantidade absoluta de CTPHs (ROCHA; BROXMEYER, 2010; STABA KELLY *et al.*, 2010). Essas estratégias incluem a utilização de mais de uma unidade de SCUP para transplante, regimes preparatórios especiais, tratamentos das células com moléculas estimuladoras previamente ao transplante e métodos de expansão *ex vivo* de CTPHs (DELANEY; RATAJCZAK; LAUGHLIN, 2010).

Especificamente, as abordagens de expansão *ex vivo* de CTPHs buscam aumentar a quantidade absoluta de CTPHs mediante a multiplicação clonal dessas células *in vitro* (XIE; ZHANG, 2015). Os protocolos de expansão *ex vivo* podem ser baseados em sistemas de cultivo em suspensão com adição de citocinas hematopoiéticas específicas, ou em sistemas de co-cultivo com células-tronco mesenquimais (CTMs), tendo em vista que essas células participam da

regulação do comportamento das CTPHs no microambiente medular (VAIDYA; KALE, 2015).

Contudo, ainda não tem sido possível controlar eficientemente a multiplicação clonal das CTPHs mediante esses protocolos de expansão *ex vivo*, na medida em que a elevada taxa de multiplicação e diferenciação dos progenitores provoca a diluição da população de CTs (FLORES-GUZMAN; FERNANDEZ-SANCHEZ; MAYANI, 2013).

Por outro lado, no contexto da engenharia de tecidos, a possibilidade de reproduzir a organização funcional tridimensional (3D) dos tecidos *in vivo* é vista como uma abordagem necessária para controlar os processos de multiplicação das células de maneira eficiente (VACANTI, J. P.; VACANTI, 2014).

Em vista disso, vários sistemas de cultivos 3D vêm sendo desenvolvidos, os quais podem estar baseados, ou não, na utilização de arcabouços como interface de crescimento das células (EVANGELATOV; PANKOV, 2013). Esses arcabouços, quando presentes, podem ser confeccionados a partir de uma vasta gama de biomateriais disponíveis, de origem natural e sintética (KEANE; BADYLAK, 2014).

Assim, sabendo que o nicho hematopoiético na medula óssea (MO) também está funcionalmente organizado de maneira 3D (MORRISON, SEAN J.; SCADDEN, DAVID T., 2014), novas propostas buscam o desenvolvimento de protocolos de expansão *ex vivo* de CTPHs em sistemas de cultivo 3D (CHOI; MAHADIK; HARLEY, 2015).

Sendo assim, a possibilidade de mimetizar o nicho hematopoiético como uma unidade interconectada e coordenada de ação requer, inicialmente, a construção de arcabouços de crescimento celular que mimetizem a arquitetura espacial do microambiente medular (CHOI *et al.*, 2015).

Particularmente, o poli(metacrilato de metila) (PMMA), o qual é um polímero sintético, tem sido utilizado na área biomédica com diversas finalidades, incluindo a fabricação de próteses ósseas, já que apresenta algumas vantagens quanto às suas propriedades mecânicas, além da biocompatibilidade e da relativa facilidade de síntese (ALI; KARIM; BUANG, 2015).

Por outro lado, vários estudos demonstraram que a placenta também representa um órgão hematopoiético durante o desenvolvimento embrionário, com grande capacidade de expansão das CTPHs (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; GEKAS *et al.*, 2005).

Ainda, células com características típicas padronizadas em cultivo de CTMs têm sido encontradas na região das vilosidades coriônicas da

placenta, onde reside o nicho hematopoiético nesse órgão (CASTRECHINI *et al.*, 2010).

Interessantemente, um estudo recente observou maior capacidade de expansão de CTPHs em co-cultivo com CTMs isoladas da placenta humana (CTMs-PH) quando comparado com células isoladas da medula óssea (LUAN *et al.*, 2013).

Diante do exposto acima, este trabalho teve como finalidade a padronização de um sistema de cultivo tridimensional de células-tronco mesenquimais da placenta humana isoladas da região das vilosidades coriônicas, baseado em um arcabouço de PMMA como modelo de nicho hematopoiético *in vitro*.



## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar um sistema de cultivo tridimensional de células-tronco mesenquimais da placenta humana em arcabouços de poli(metacrilato de metila) como modelo de nicho hematopoiético.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- Reproduzir o isolamento, a expansão e a caracterização (padronizada em cultivo) de CTMs de placenta humana;
- Padronizar a confecção de arcabouços de poli(metacrilato de metila) que reproduzam aspectos genéricos da arquitetura do nicho hematopoiético na medula óssea;
- Caracterizar estrutural e mecanicamente os arcabouços de poli(metacrilato de metila);
- Analisar, através de técnicas de microscopia confocal e eletrônica de varredura, a interação e a morfologia das CTMs-PH nos arcabouços de poli(metacrilato de metila).





## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CTs) são definidas de acordo com duas características funcionais: a capacidade de automanutenção<sup>1</sup> e diferenciação (POTTEN; LOEFFLER, 1990). Assim, as CTs são consideradas células indiferenciadas com grande capacidade de multiplicação clonal, isto é, de dar origem, através do processo de divisão celular, a duas novas células que conservam as propriedades funcionais de CT. Além disso, as CTs de um determinado tecido são caracterizadas por terem a capacidade de dar origem, através da diferenciação das células descendentes, a todas as células funcionalmente especializadas (linhagens) do tecido (LOEFFLER; ROEDER, 2002).

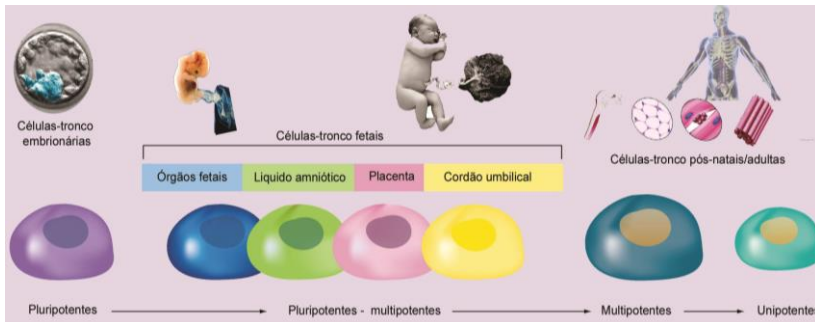
Por outro lado, as CTs são classificadas de acordo com dois critérios: a ontogenia e o potencial de diferenciação. Assim, em função do critério da ontogenia, as CTs são classificadas como células-tronco embrionárias (CTEs), aquelas isoladas da massa celular interna (MCI) do embrião em blastocisto, as CTs fetais e as neonatais (CTF) derivadas dos nichos proliferativos dos órgãos do feto em desenvolvimento ou do recém-nascido e as CTs adultas ou pós-natais (CTP/A), as quais são derivadas dos órgãos e/ou tecidos do indivíduo após o nascimento, como ilustrado na figura 1 (BONGSO; LEE, 2005).

Quanto ao potencial de diferenciação, as CTs são classificadas como totipotentes, aquelas que têm a capacidade de dar origem a um organismo completo, incluindo os tecidos extraembrionários, como os blastômeros resultantes das primeiras divisões do zigoto. Já as células pluripotentes, são aquelas com a capacidade de dar origem a todos os tecidos do organismo, com exceção dos tecidos extraembrionários, como as CTE. Por sua vez, as células multipotentes são aquelas com a capacidade de diferenciação em vários de tipos celulares, como por exemplo, as células-tronco/progenitoras hematopoiéticas (CTPHs) e as unipotentes, células que se diferenciam em apenas um único tipo celular, como as CT germinais, que dão origem aos gametas (BISSELS *et al.*, 2016).

---

<sup>1</sup> Embora o termo comumente utilizando na literatura para referir-se ao processo de multiplicação clonal das CTs seja autorrenovação, este não reflete os acontecimentos que, de fato, ocorrem quando as CTs dividem-se para gerar duas novas CTs (POTTEN; LOEFFLER, 1990).

**Figura 1: Tipos e fontes de CTs.** Da esquerda para a direita: as CTE são células pluripotentes isoladas a partir das células da massa celular interna (azul) do embrião em etapa de blastocisto, as CTF (centro) são células multipotentes isoladas dos órgãos do feto ou do recém-nascido e as CTP/A são células multipotentes derivadas dos órgãos e/ou tecidos do indivíduo após o nascimento.



Fonte: adaptado de PAPPÀ; ANAGNOU, 2009.

Além desses tipos, também é possível incluir, nessa classificação, as denominadas células reprogramadas ou CT de pluripotência induzida (iPSC ou iPS do inglês; *induced pluripotent stem cells*), as quais são resultantes da aplicação de metodologias de manipulação genética de células adultas e as CTs cancerígenas obtidas de tecidos tumorais (NASSAR; BLANPAIN, 2016). Entretanto, essas não seguem o critério da ontogenia.

### 2.1.1. Células tronco mesenquimais

As denominadas células estromais (ou células osteogênicas da medula óssea) foram identificadas por Alexander Friedenstein e seus colaboradores nas décadas de 60-70, a partir do sangue de medula óssea. Essas células foram, inicialmente, caracterizadas por ter potencial osteogênico, aderentes ao recipiente de cultivo tecidual ou celular, morfologia fibroblastóide e capazes de formar colônias (agregados com mais de 50 células), independente da densidade (BIANCO, PAOLO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

Entretanto, posteriormente constatou-se que a população de células estromais da medula óssea (MO) é constituída por uma população bastante heterogênea de células que incluem os fibroblastos, os adipócitos, os pericitos e os macrófagos (BIANCO, P. *et al.*, 2001).

Em 1991, Caplan aplica o termo de célula-tronco mesenquimal (CTM) para designar, uniformemente, todas as células dos tecidos esqueléticos (osso, cartilagem e gordura) que apresentam as características de células estromais (CAPLAN, 1991). Embora o acolhimento desse termo implicou uma simplificação na identificação das células, trouxe, por outro lado, um conjunto de problemas.

Como proposta para resolver essas conjunturas, o Comitê de Células-Tronco e Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs a adoção de um conjunto mínimo de critérios para caracterizar o que eles denominaram de células mesenquimais estromais multipotentes. Assim, de acordo com essa posição, as CTMs devem ser aderentes ao plástico nos sistemas padronizados de cultivo celular, devem expressar os marcadores de superfície CD105 (englobina), CD90 (antígeno 1 de células do timo, Thy-1) e CD73 (ecto-5'-nucleotidase) e não apresentar expressão para marcadores hematopoiéticos e endoteliais como CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR. Todavia, essas células devem ter a capacidade de diferenciação nas linhagens mesodermis osteo, adipo e condrogênica (DOMINICI *et al.*, 2006).

Por outro lado, alguns estudos têm observado que as CTMs também apresentam propriedades imunomoduladoras, capazes de controlar a resposta imunológica (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

Ainda, existem evidências que as CTMs possam existir em todos os tecidos e órgãos (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Tudo isso tem estimulado o isolamento de CTMs com fins de pesquisa biomédica a partir do tecido adiposo, da polpa do dente, das glândulas salivais, do sangue periférico e menstrual, do endométrio e do cordão umbilical e da placenta (ASHRI; AJLAN; ALDAHMAH, 2015; HASS *et al.*, 2011; ULRICH; MURALITHARAN; GARGETT, 2013).

## 2.2. O NICHU DAS CÉLULAS-TRONCO

Em 1978, Raymond Schofield introduziu a ideia de nicho como conotação às características funcionais de um microambiente especializado que determina o comportamento das CTs. Assim, segundo a proposta original, o nicho tem como função a capacidade de preservar as características funcionais de CT enquanto permaneçam em contato (SCADDEN, 2014).

Atualmente, o nicho de vários tecidos e órgãos de espécies-modelo tem sido estrutural e funcionalmente caracterizado, incluindo o nicho hematopoiético na medula óssea (LI; XIE, 2005).

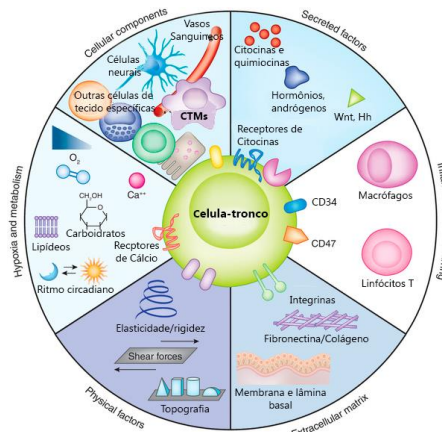
A grande maioria dos nichos estudados são compostos por uma relação funcional de moléculas e células. As moléculas podem ter função estrutural como parte da matriz extracelular (MEC), permitindo o ancoramento físico das CTs, e também funções de regulação bioquímica sobre o comportamento (REZZA; SENNETT; RENDL, 2014).

Por outro lado, as células do nicho regulam o comportamento das CTs mediante o contato célula-célula e pela secreção de moléculas bioativas como citocinas, fatores de crescimento, interleucinas, hormônios etc (FERRARO; CELSO; SCADDEN, 2010).

Ainda, as CTs também secretam moléculas regulatórias autócrinas, que regulam o próprio comportamento, além de moléculas parácrinas, que influenciam o comportamento das células do nicho. Todavia, as CTs e as células dos nicho estabelecem relações funcionais sistêmicas, sendo ambas influenciadas por sinais endócrinos e circadianos, figura 2 (DRUMMOND-BARBOSA, 2008).

Contudo, as CTs e seus nichos interagem reciprocamente, estabelecendo unidades funcionais que permitem a manutenção e a regeneração local do tecido (LANE; WILLIAMS; WATT, 2014).

**Figura 2: Os componentes dos nichos das CTs.** Os nichos das CTs nos tecidos estão compostos por uma relação funcional de moléculas que oferecem uma interface físico-química de interação com as CTs, e diferentes tipos de células que interagem direta ou indiretamente com as CTs, regulando seu comportamento. Além desses, elementos externos ao microambiente local são também importantes moduladores do comportamento das CTs.



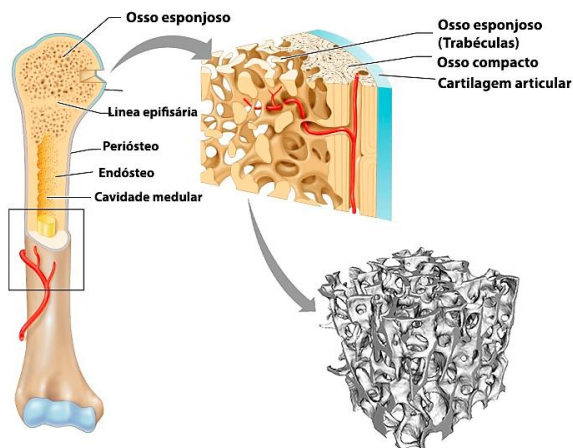
Fonte: adaptado de LANE; WILLIAMS; WATT, 2014.

### 2.2.1. O nicho hematopoiético na medula óssea

As CTPHs são originadas a partir de células precursoras do mesoderma e transitam entre várias regiões anatômicas ao longo do desenvolvimento embrionário (MIKKOLA; ORKIN, 2006). Na maioria dos mamíferos estudados, incluindo o ser humano, antes do nascimento, as CTPHs migram desde o fígado fetal para a região medular dos ossos, onde se estabelecem de maneira definitiva (CIRIZA *et al.*, 2013). Portanto, na vida pós-natal/adulta, o processo hematopoiético ocorre, exclusivamente, na MO, onde residem as CTPHs em seus nichos especializados.

Especificamente, o tecido hematopoiético na MO está distribuído nos espaços delimitados pelas trabéculas do osso esponjoso (TRAVLOS, 2006). Novas tecnologias de imagem e métodos de reconstrução assistidos por computador têm permitido diferentes abordagens morfométricas e análises mecânicas do osso esponjoso, oferecendo uma ideia detalhada da arquitetura espacial dessa região, como observado na figura 3 (OFTADEH *et al.*, 2015; PARKINSON; FAZZALARI, 2013).

**Figura 3: Macro e microarquitetura do osso esponjosos.** No osso adulto típico, debaixo da região de osso compacto, está a região de osso esponjoso a qual é formada por arranjos de trabéculas (reconstrução computacional em cinza). Os espaços entre as trabéculas são preenchidos por tecido hematopoiético. Alguns parâmetros morfométricos dessa região de diferentes ossos humanos são descritos na tabela 2.



Fonte: adaptado de MARIEB; HOEHN, 2015 e PARKINSON; FAZZALARI, 2013.

**Tabela 1: Propriedades estruturais e mecânicas do osso esponjoso.**

<b>Região anatômica</b>	<b>Espessura trabecular</b>	<b>Separação trabecular</b>	<b>Módulo de compressão</b>
Calcâneo	170 $\mu\text{m}$	540 $\mu\text{m}$	-
Fêmur distal	200 $\mu\text{m}$	450 $\mu\text{m}$	10,88 GPa
Vértebra lombar	233 $\mu\text{m}$	1470 $\mu\text{m}$	2,1 GPa
Crista ilíaca	151 $\mu\text{m}$	747 $\mu\text{m}$	-
Valores médios (literatura)	188 $\pm$ 36 $\mu\text{m}$	802 $\pm$ 462 $\mu\text{m}$	3,78 GPa

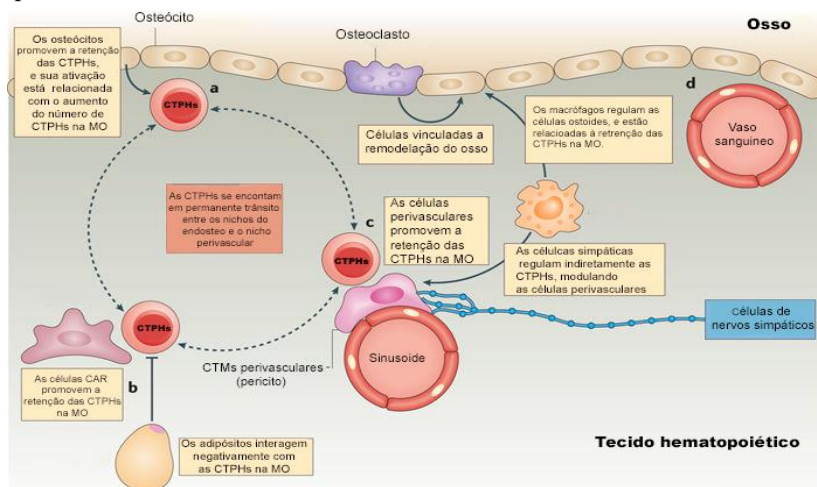
No nicho medular, as CTPHs são responsáveis pela manutenção da homeostase hematopoiética, com uma capacidade de reposição de cerca de 2 bilhões de células diariamente (DYGAI; ZHDANOV, 2014).

Através de metodologias de condicionamento genéticos, tem sido possível identificar diferentes tipos de células, as quais interagem com as CTPHs, tendo importante efeito na homeostase hematopoiética na MO (MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T., 2014). Assim, os osteoblastos das superfícies do endósteo e das trabéculas, as diferentes subpopulações de células estromais, além das células endoteliais vasculares dos vasos e sinusoides medulares, têm sido identificadas como importantes reguladores do comportamento das CTPHs na MO. Além destes, outros tipos de células como os macrófagos, os adipócitos e as células dos nervos simpáticos também são considerados moduladores do comportamento das CTPHs no microambiente medular (YU, V. W.; SCADDEN, 2016). Cada um desses tipos celulares interatua diretamente através do contato célula-célula e/ou indiretamente através da secreção de citocinas ou fatores de crescimento com as CTPHs as quais integram e processam sistematicamente todos os sinais (HOFFMAN; CALVI, 2014).

Por outro lado, estudos recentes têm identificado que as CTPHs residem em duas localizações específicas, onde exercem funções bem diferentes: na região perivascular, isto é, nas proximidades dos vasos sanguíneos e sinusoides medulares, onde são mais ativas, e nas regiões adjacentes ao endósteo, onde se encontram em estado quiescente (BOULAIS; FRENETTE, 2015).

Contudo, o tecido hematopoiético na MO pode ser entendido como sendo funcionalmente organizado de maneira 3D (NOMBELA-ARRIETA; MANZ, 2017).

**Figura 4: O nicho hematopoético na medula óssea.** Vários tipos de células praticam da regulação do comportamento das CTPHs nos nichos (endosteal e perivascular) na MO, incluindo as CTMs, como as células estromais perivasculares, os osteoblastos e os osteoclastos, as células endoteliais, os macrófagos, as células CAR, as células de nervos simpáticos e as células de Schwann não mielinizantes. Cada um desses tipos de células tem influência positiva ou negativa através do contato célula-célula ou mediante secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas entre outros.



Fonte: adaptado de MERCIER; RAGU; SCADDEN, 2012.

Além da MO, a placenta também tem sido identificada como sendo um órgão hematopoético, com grande capacidade expansão clonal das CTPHs durante o desenvolvimento (ROBIN *et al.*, 2009).

### 2.3. PLACENTA HUMANA

A placenta humana (PH) é um órgão materno-fetal transitório que participa dos processos de troca de gases, nutrientes, metabólitos e sais minerais entre a mãe e o feto. Todavia, oferece proteção mecânica e proteção contra o estresse oxidativo, além de garantir a imunotolerância ao embrião em desenvolvimento (KUMPEL; MANOUSSAKA, 2012; MALTEPE; FISHER, 2015).

A classificação da placenta entre os diferentes tipos de organismos dá-se de acordo com três características principais: os aspectos

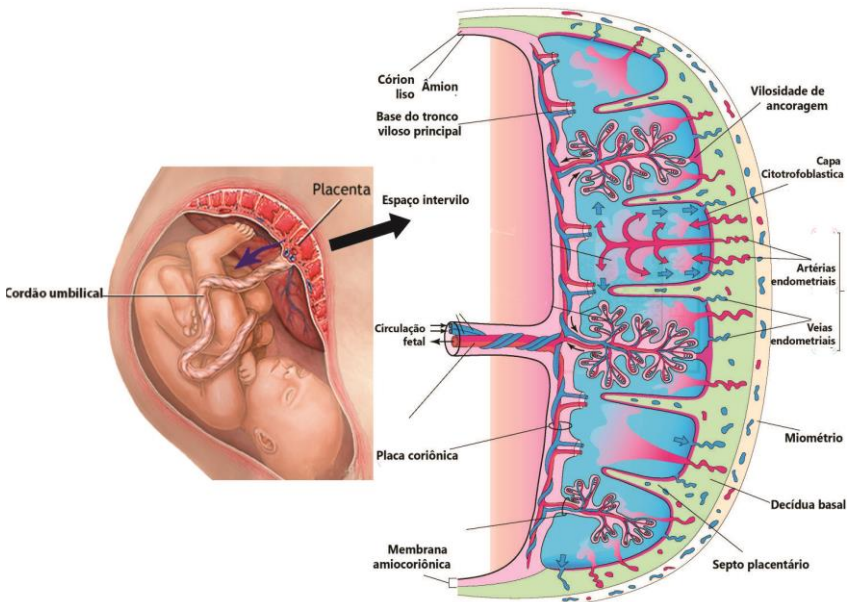
macroscópicos ou anatômicos, a interface materno-fetal e o arranjo das membranas. Assim, de acordo com esses critérios, a placenta humana é classificada como discoidal, hemocorial, corioalantoíde, e vilosa (FILHO; OLIVEIRA, 2012).

Em humanos, o desenvolvimento da placenta começa após o processo de implantação do blastocisto no endométrio decidualizado da mãe entre os dias 6 e 7 da gestação (HUI, 2012).

No final da quarta semana de gestação, começa a circular sangue pela complexa rede vascular das vilosidades coriônicas, movido pelo início dos batimentos cardíacos (WANG, Y.; ZHAO, 2010).

A partir do quarto mês de gestação, a placenta humana está completamente formada, apresentando forma discoide e funcionalmente constituída pela placa coriônica, como ilustrada na figura 5 (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2015).

**Figura 5: Estrutura interna da placenta humana.** A estrutura da placenta a termo é composta por uma porção fetal, o viló coriônico, e por uma porção materna, a decídua basal. No final da terceira semana de gestação, todos os arranjos anatômicos necessários à funcionalidade de intercâmbio de gases e nutrientes entre o feto e a mãe (flecha azul) são estabelecidos.



Fonte: adaptado de MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2015.



### **2.3.1. A placenta humana como fonte de células-tronco**

Diversos estudos vêm demonstrando que a PH constitui uma fonte rica em vários tipos de CTs (MALEK; BERSINGER, 2011).

Ainda, o fato de a placenta ser um órgão descartado após o parto estabelece uma condição que minimiza os conflitos de caráter ético, para obtenção de células para pesquisas biomédicas (MALEK; BERSINGER, 2011).

Em vista disto, vários protocolos para o isolamento de diferentes tipos de CTs da placenta têm sido padronizados (OLIVEIRA; BARRETO-FILHO, 2015).

Especificamente, células com características típicas padronizadas em cultivo de CTMs têm sido isoladas mediante protocolos que envolvem dissociação mecânica e digestão enzimática (PAROLINI; ALVIANO; BAGNARA; BILIC; BÜHRING; *et al.*, 2008).

Por outro lado, análises moleculares das CTMs-PH têm revelado que essas células expressam marcadores de CTE como c-Kit, Oct4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81.

Todavia, outra propriedade favorável das CTMs-PH é sua identidade imunológica. Assim, as CTMs-PH expressam baixos níveis dos alelos HLA-ABC e não expressam HLA-DR, o que minimiza o reconhecimento antigênico da placenta pelo sistema imunológico da mãe.

Além disso, as CTMs-PH apresentam mecanismos de imunomodulação, mediadas por fatores secretados e pelo contato célula-célula (TALWADEKAR; KALE; LIMAYE, 2015).

Assim em conjunto, essas propriedades únicas das CTMs-PH tornam-nas importantes candidatas para usos clínicos (FIERABRACCI *et al.*, 2015).

### **2.3.2. A placenta como órgão hematopoiético durante o desenvolvimento**

Além das funções materno-fetais, foi constatado que a placenta também desempenha um importante papel como órgão hematopoiético durante desenvolvimento (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003).

Todavia, um estudo em modelo de animal encontrou que a placenta apresenta grande capacidade de expansão das CTPHs (GEKAS *et al.*, 2010). Ainda, os pesquisadores destacaram que as CTPHs são encontradas na região da vasculatura labiríntica da placenta, a qual é homologa à região das vilosidades coriônicas em humanos.

Já um estudo recente verificou que células que expressam o gene RUNX1, o qual é crítico para o desenvolvimento das CTPHs, são encontradas nos grandes vasos do mesênquima corioalantoide. (OTTERSBACH; DZIERZAK, 2005). Além disso, esse estudo observou que as CTPHs são detectadas na placenta simultaneamente ao aparecimento na região de aorta-gônada-mesonéfrons (AGM), antes, inclusive, que sejam identificadas na circulação ou no fígado fetal.

Finalmente, a hipótese de a placenta ter a capacidade de originar CTPHs *de novo* foi confirmada no modelo de camundongo por um estudo que utilizou um sistema de *knockout* para o gene *Ncx1*<sup>2</sup>. Nesse estudo, foi observada a presença de células que expressam o marcador de CTPHs CD41, aderidas na superfície luminal das paredes dos grandes vasos do mesênquima corioalantoide (RHODES *et al.*, 2008).

### 2.3.3. O nicho hematopoético na placenta

A constatação de a placenta ser um órgão hematopoético, no qual as CTPHs são formadas *de novo* e expandidas, tem promovido o estudo da fisiologia hematopoética nesse órgão (LEE, L. K. *et al.*, 2010).

Assim, um estudo notificou a presença de CTMs na região das vilosidades coriônicas, onde reside o nicho vascular hematopoético nesse órgão (CASTRECHINI *et al.*, 2010).

Todavia, uma pesquisa em modelo de camundongo identificou que a sinalização do fator de crescimento  $\beta$  derivado de plaqueta (PDGF-  $\beta$ , do inglês *Platelet-derived growth factor  $\beta$* ) secretado pelas células trofoblástica é responsável, em parte, por condicionar o microambiente na placenta, fazendo com que as CTPHs multipliquem-se clonalmente, inibindo sua diferenciação (CHHABRA *et al.*, 2012).

Mais recentemente, no Laboratório de Células-tronco e bioengenharia da UFSC, foi apresentado um modelo de nicho molecular das CTPHs na placenta humana através da identificação de componentes como, colágeno tipo 1, laminina, e fibronectina (GARGIONI, 2014).

## 2.4. TRANSPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS

O emprego do transplante de células hematopoéticas como terapia médica teve início em meados dos anos 1950, sendo que os primeiros estudos foram realizados pelo médico e pesquisador Edward Donnall "Don" Thomas e sua equipe de *Seattle* em 1957 (THOMAS *et al.*, 1957).

---

<sup>2</sup> *Ncx1* é um gene relacionado à capacidade de contração do músculo cardíaco.

Entretanto, grande ceticismo prevaleceu em torno do TMO como terapia até o começo da década de 70, já que a revisão dos estudos da época mostrava que nenhum paciente tinha sobrevivido, a longo prazo, com esse tratamento (BORTIN, 1970).

Apesar disso, Thomas e seus colaboradores prosseguiram seus estudos de transplante em modelo canino, nos quais constataram a necessidade de uma estreita compatibilidade imunológica para ter boas chances de sucesso no TMO (RUDOLPH *et al.*, 1969).

Assim, no ano de 1977, estando disponíveis os primeiros métodos de tipagem HLA, Thomas e sua equipe de *Seattle* publicaram o primeiro trabalho documentando a sobrevivência, a longo prazo, de treze (13) de cem (100) pacientes com leucemia tratados com quimioterapia, irradiação corporal total e TMO (THOMAS *et al.*, 1977).

No Brasil, o primeiro TMO foi realizado no ano de 1979 pelo médico hematologista Ricardo Pasquini no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba (FERREIRA *et al.*, 1985).

Entretanto, o uso de sangue de medula óssea e de sangue periférico mobilizado como fontes de CTPHs para TCH exige uma estreita compatibilidade HLA, sendo necessárias 10/10 ou de 9/10 correspondências alélicas (CHARRON; PETERSDORF, 2013). Isso torna o encontro de doadores compatíveis uma questão de pouca probabilidade, dado o grande número de variantes alélicas HLA existentes na população (ALEJANDRO MADRIGAL; BARBER, 2016).

Em virtude disso, no ano de 1988, o sangue de cordão umbilical e o placentário (SCUP) foram usados pela primeira vez pela Dr<sup>a</sup>. Eliane Gluckman e sua equipe no Hospital Saint-Louis de Paris, na França, para tratar uma criança com anemia de Fanconi, a qual recebeu o processado de seu irmão HLA-compatível (GLUCKMAN, E. *et al.*, 1989).

O uso de SCUP como fonte de CTPHs para transplante apresenta algumas vantagens potenciais quando comparada à utilização de fontes como a MO ou a do sangue periférico mobilizado. Essas vantagens incluem a facilidade de coleta com pouco ou nenhum risco para a mãe ou o recém-nascido, a disponibilidade imediata, o baixo risco de transmissão da infecção, o menor risco de doença de enxerto contra hospedeiro com preservação da capacidade de enxerto contra tumor (ECT), o que é atribuído a uma população menos estimulada de linfócitos T. Todavia, o SCUP exige uma menor rigidez de correspondência HLA, sendo necessárias 6/6 ou 5/6 correspondências alélicas (ROURA *et al.*, 2015).

Contudo, o SCUP tem se estabelecido como uma fonte alternativa de obtenção de CTPHs para transplante, estimulando o estabelecimento

de banco para armazenamento desses recursos biológicos em forma de unidades testadas e criopreservadas.

No ano de 2013, um estudo registrou mais de 300 Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) públicos ao redor do mundo, com mais de 620 mil unidades armazenadas (BMDW, 2013).

No Brasil, no ano 2000, o Instituto Nacional do Câncer (INCa) inaugurou o primeiro BSCUP em território nacional e, em setembro de 2004, o Ministério da Saúde lançou, oficialmente, o programa BrasilCord, uma rede nacional de armazenamento de sangue de cordão umbilical, através da rede SUS, visando a aumentar as chances de localização de doadores para os pacientes que necessitam de transplante de progenitores hematopoiéticos (BRASIL, 2004).

O relatório anual dos dados de produção dos BSCUP, no Brasil, apontou que, atualmente, existe uma rede que conta com treze (13) bancos públicos contendo 1804 unidade armazenadas, além de vinte (20) bancos privados contendo 117.325 unidade armazenadas (ANVISA., 2016).

#### **2.4.1. Problemática associada ao SCUP**

Apesar de o uso, há quase três décadas, do SCUP como uma fonte alternativa de CTPHs ter significado uma amenização ao problema do encontro de possíveis doadores HLA compatíveis, o reduzido volume de que se encontra disponível nas redes vasculares do cordão umbilical e placenta constitui-se com uma limitação desse recurso biológico (BALLEN, K. K. *et al.*, 2013). Isso, por sua vez, determina uma baixa quantidade absoluta de células de CTPHs disponíveis para transplante (BALLEN, K., 2017).

De forma geral, a dose celular mínima recomendada por kg de peso do receptor é de  $3,7 \times 10^7$  células nucleadas e de  $1,7 \times 10^5$  -  $2,5 \times 10^5$  células CD34+ (GLUCKMAN, ELIANE *et al.*, 1997; MIGLIACCIO *et al.*, 2000).

Contudo, tais doses não são sempre alcançadas com o SCUP particularmente para pacientes com mais de 40 - 45 kg de peso corporal (MEHTA *et al.*, 2017).

Portanto, mesmo tendo o SCUP um conjunto de vantagens em relação às fontes tradicionais para o enxerto halogênico de CTPHs em pacientes na falta de um doador HLA compatível adequado, com uma redução de até 50% nas chances de rejeição, o limitado volume compromete a utilização desse recurso terapêutico (PINEAULT; ABU-KHADER, 2015).

## 2.4.2. Estratégias para superar as limitações do SCUP como fonte de células hematopoiéticas para transplante

Na busca de métodos que permitam superar as limitações impostas pelas condições biológicas do SCUP, um conjunto de estratégias vêm sendo utilizadas (ROCHA; BROXMEYER, 2010; STABA KELLY et al., 2010).

Algumas dessas estratégias incluem a infusão de duas ou mais unidades de SCUP, o tratamento das células, prévio ao transplante, com drogas estimuladoras, e métodos de expansão *ex vivo* de CTPHs.

Especificamente, os métodos de expansão *ex vivo* de CTPHs buscam aumentar a quantidade absoluta de CTPHs em sistemas de cultivo células *in vitro*.

Assim, esses protocolos de expansão *ex vivo* podem ser baseados em sistemas de cultivo de células em suspensão com adição de citocinas hematopoiéticas específicas como o Fator de Célula-tronco (SCF, do inglês *Stem Cell Factor*), o ligante de FLT3, TPO (Trombopoietina), Interleucina 6 (IL-6) (HEIKE; NAKAHATA, 2002).

Todavia, os protocolos expansão *ex vivo* podem ser baseados em sistemas de co-cultivo com CTMs, tendo essas células um papel importante como reguladores do comportamento das CTPHs no nicho hematopoiético na MO.

Interessantemente, um estudo observou que as CTMs-PH têm maior capacidade de expansão das CTPHs em sistemas de co-cultivo, em comparação às CTMs da MO, sendo, também, capazes de inibir a proliferação de linfócitos T (LUAN et al., 2013).

A ideia desses protocolos alternativos é mimetizar a fisiologia encontrada nos diferentes nichos hematopoiéticos, nos quais as CTPHs são naturalmente multiplicadas.

Além do uso de citocinas hematopoiéticas e dos sistemas de co-cultura, várias outras abordagens metodológicas têm sido utilizadas com finalidades de expansão *ex vivo* (FLORES-GUZMAN et al., 2013).

## 2.5. SISTEMAS DE CULTIVOS TRIDIMENSIONAIS E BIOMATERIAIS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

A maioria das abordagens *in vitro* com finalidade de expansão *ex vivo* de CTPHs têm sido baseadas em sistemas de cultivo com capacidade de crescimento bidimensional (2D) (GAO, J.-X.; ZHOU, 2011).

Entretanto, nos últimos anos, diversos trabalhos vêm expondo várias limitações dos sistemas de cultivo 2D, já que não é possível recriar

certas condições funcionais dos tecidos e órgãos que estão organizados de maneira tridimensional 3(D) (HAYCOCK, 2011).

Portanto, tendo em vista essas limitações, vêm sendo desenvolvidos diferentes sistemas de cultivo tridimensionais (3D), os quais permitem uma melhor reprodução *in vitro* da organização funcional dos tecidos e órgãos *in vivo* (KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015). (EVANGELATOV; PANKOV, 2013).

A configuração espacial das células nos sistemas de cultivo 3D pode estar baseada, ou não, na incorporação de arcabouços de origem artificial ou sintéticos. Esses arcabouços, quando presentes, oferecem a estrutura física para que as células possam crescer de maneira 3D (MENG *et al.*, 2014).

Pesquisas recentes revelam que aspectos como o padrão de adesão e a taxa de migração, a taxa de apoptose e a quiescência são bioquimicamente regulados de maneira diferentes quando as mesmas células são cultivadas em sistemas 2D ou 3D (DOYLE; YAMADA, 2016).

### **2.5.1. Biomateriais e arcabouços para engenharia de tecidos**

Diversos tipos de biomateriais têm sido utilizados para a confecção de arcabouços para cultivo 3D com propósitos de aplicações em engenharia de tecidos (KEANE; BADYLAK, 2014).

Os arcabouços podem ser elaborados com biomateriais inorgânicos como o titânio e o tântalo, poliméricos e copolímeros de origem natural como o colágeno, a seda, a agarose, o hialuronano e a quitosana (WILLERTH; SAKIYAMA-ELBERT, 2008).

Por outro lado, os arcabouços também podem ser elaborados a partir de polímeros ou copolímeros artificiais como o ácido polilático, poliglicólico ou polilaticoglicólico (PLA, PLG e PLGA, respectivamente), ácido polietilenglicólico (PEG) e poli(metacrilato de metila) (PMMA), entre muitos outros (LEE, E. J.; KASPER; MIKOS, 2014).

Todavia, materiais biocerâmicos, como a hidroxiapatita, também são utilizados na fabricação de arcabouços com fins de engenharia de tecidos (BAINO; NOVAJRA; VITALE-BROVARONE, 2015).

O tipo de biomaterial a ser utilizado na fabricação dos arcabouços deve incluir características como a química, o peso molecular, a solubilidade em água, a relação hidrofobicidade/hidrofilicidade, a molhabilidade e a degradação (BAKER, 2011; GAO, Q. *et al.*, 2016).

Todavia, o *design* dos arcaços deve ser escolhido para permitir a infiltração e o crescimento das células e a difusão dos nutrientes do meio de cultivo (GUO *et al.*, 2015; LIU; XIA; CZERNUSZKA, 2007).

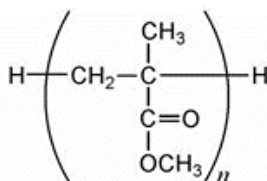
Ainda, vários métodos e novas tecnologias estão disponíveis para assistir a confecção dos arcaços. Dentre os métodos comumente usados estão a liberação por solvente, as técnicas de sacrifício de partículas porogênicas, as espumas de gás, a separação de fases, a eletrofiação, a automontagem e os *designs* assistidos por impressão 3D, além de muitos outros (SUBIA; KUNDU; KUNDU, 2010).

Contudo, as propriedades dos biomateriais, o *design* e os métodos e tecnologias usados na confecção devem permitir a fabricação dos arcaços em função das particularidades desejadas (YANG, 2008).

### 2.5.2. Poli(metacrilato de metila) (PMMA)

O poli(metacrilato de metila) (PMMA) é um polímero orgânico termoplástico insaturado que contém um grupamento éster na sua cadeia (ALI *et al.*, 2015).

**Figura 6: Estrutura química PMMA.** A estrutura química do PMMA é constituída pelo grupamento éster metílico com o ácido 2-metilpropenóico.

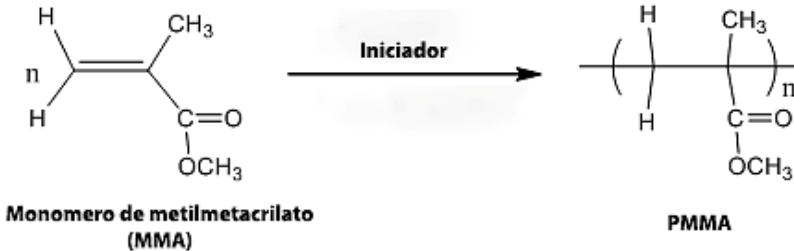


A polimerização do PMMA ocorre pela adição de unidade do monômero metilmetacrilato (MMA) com a presença de um iniciador via radical livre. O mecanismo de reação é composto de três etapas fundamentais: iniciação, propagação e terminação (HOLMES; BOHRER; KOHN, 2008). Esse mecanismo é ativado por um iniciador, que rompe a ligação do grupo vinílico, e promove a reação de polimerização, segundo o esquema da figura 10.

Sendo assim, o PMMA pode ser sintetizado por diferentes técnicas: polimerização em suspensão, polimerização em emulsão, polimerização em massa e polimerização em solução (STICKLER;

RHEIN, 2000). O tipo de polimerização utilizado dependerá, principalmente, da aplicação do produto final.

**Figura 7: Reação de polimerização do PMMA.** O PMMA resulta da polimerização do MMA via radical livre com a presença de um iniciador.



O PMMA apresenta um conjunto de propriedades físico-químicas (descritas na tabela 2) que o tornam muito atrativo em função de uma variedade de aplicações.

**Tabela 2: Propriedades físicas e mecânicas do PMMA.**

Propriedades	Valores
Peso Molecular	100,117g/mol
Ponto de ebulição	100°C
Ponto de derretimento	-48°C
Densidade	0,943g/cm <sup>3</sup>
Solubilidade em H <sub>2</sub> O	1,5g/100 mL de H <sub>2</sub> O
Rigidez (modulo de Young)	3,1GPa (compacto)

Especificamente na área biomédica, o PMMA e seus derivados têm sido utilizados com bastante sucesso como cimento de osso em tratamentos ortopédicos e odontológicos além de ser usado na fabricação de lentes de contato (ALI *et al.*, 2015; FRAZER *et al.*, 2005).

Interessantemente, em um estudo no qual foram desenvolvidas peças de PMMA porosas com diferentes tamanhos de poros, a fim de estimular o reparo de osso em processos traumáticos, foi observado que os arcabouços com tamanho de poro de até 3mm apresentam maior invasão de células osteoides, resultando em uma melhoria de reparo (CIMATTI *et al.*, 2015).



Por outro lado, dois estudos nos quais foram produzidos arcabouços copoliméricos de PMMA, como cimento de reparo de osso, observaram que as propriedades mecânicas (valor de módulo de Young) desses arcabouços eram similares ao do osso esponjoso (DURGALAKSHMI; BALAKUMAR, 2015; HE *et al.*, 2012).

Finalmente, um estudo relatou uma estratégia relativamente fácil de produção de arcabouços porosos de PMMA para enxerto de preenchimento de osso utilizando quitosana como elemento porogênico, a qual é totalmente solubilizada e removida com água destilada na última etapa do processo (HAN; MA; NIE, 2011).

Com base no que foi exposto acima o PMMA, em virtude de suas propriedades de biocompatibilidade e mecânicas, além de sua facilidade de polimerização, torna-se um material atrativo para utilização na confecção de arcabouços com a finalidade de desenvolver um modelo de nicho hematopoiético *in vitro*.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA DA UFSC E NO CENTRO DE OBSTETRÍCIA DO HU

Todos os procedimentos referentes a este trabalho de mestrado estão amparados pelo parecer ético aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob os protocolos 311/2008 1962/11-CEPSH/PRPG. Da mesma maneira, todos os procedimentos de análise, divulgação de informação e aspectos técnicos ficam inclusos no previsto pela resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012.

Todas as informações do objeto da pesquisa, suas diretrizes e regulamentações foram devidamente apresentadas e aprovadas pelos responsáveis dos diferentes centros colaboradores do Hospital Universitário.

#### 3.2. DOS DOADORES E DOS CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

As mães doadoras dos materiais biológicos (placentas) foram gestantes internadas no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. As pacientes doadoras e/ou seus responsáveis foram devidamente esclarecidos quanto à natureza e aos objetivos da pesquisa que, após concordarem em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ver anexo A). Após terem assinado esse termo, prosseguia-se a consulta aos prontuários médicos das gestantes. Para a inclusão das doadoras nesta pesquisa, seguiu-se um conjunto adaptado de critérios de seleção (ver anexo B) previstos pela resolução RDC nº 56, 16 de dezembro de 2010.

#### 3.3. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS DE PLACENTA

Uma vez confirmado o parto e imediatamente após a dequitação da placenta, foi solicitada à equipe do Centro Obstétrico a vestimenta adequada e o acesso à sala de expurgo, onde o material era separado, preservado em saco plástico e mantido em condição refrigerada. Uma vez coletadas<sup>3</sup>, as placentas (n=3) foram inicialmente analisadas mediante

---

<sup>3</sup> As amostras de placenta (n=3) foram coletadas em momentos diferentes ao longo do período 2016/1.

observação macroscópica da anatomia da placenta e do cordão umbilical. Logo, prosseguia-se a amputação do cordão umbilical com uma tesoura no ponto de inserção da placenta. A seguir, realizavam-se entre 3 a 4 cortes radiais profundos a partir do ponto de amputação, subdividindo, assim, a superfície fetal da placenta em porções. Depois, realizava-se a remoção do âmnio de cada porção mediante *peeling* mecânico iniciando pelo ponto de amputação. À continuação, realizava-se a separação do córion do tecido subjacente com tesoura e pinça.

Finalmente, entre 3 a 6 pequenos fragmentos de tecido com uma profundidade de aproximadamente 0,5 cm, em relação à superfície fetal (correspondente à região do vilão), foram coletados e colocados em um tubo Falcon de 50 mL contendo solução tampão (PBS pH 7,2) refrigerado e transportados ao Laboratório de Células-tronco e bioengenharia, em recipiente térmico.

Uma vez no laboratório, todo o processamento subsequente de digestão dos fragmentos, assim como todos os outros procedimentos relativos aos cultivos e subcultivo celular eram realizados na cabine de segurança biológica, em ambiente estéril.

#### 3.4. ISOLAMENTO, CULTIVO PRIMÁRIO E SUBCULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA

Um fragmento de cada vez foi colocado em placa de Petri onde, inicialmente, foram lavados de 3 a 5 vezes com PBS pH 7,2 refrigerado e estéril até a máxima remoção possível de sangue. Logo, todos os vasos proeminentes e possíveis coágulos foram cuidadosamente removidos com pinça. Cada fragmento foi mecanicamente dissociado, tanto quanto possível, utilizando pinça e tesoura. Aproximadamente 4 g de tecido dissociado foram, então, distribuídos em dois tubos Falcon de 15 mL e submetidos a tratamento enzimático durante 25 minutos com 4 mL de Tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO, código 25200-072) em banho maria a 37 °C, observando a reação a cada 5 minutos até evidenciar o início de formação de gel.

Após a etapa anterior, o tratamento enzimático foi neutralizado (bloqueio da enzima) pela adição de aproximadamente 4 mL de meio de cultivo (MdC) composto por Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, código 12200-036) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Vitrocell, lote 02/15) e 100.000U/L de penicilina e estreptomicina (Pen/Es) (Gibco, código 15240-062), em cada tubo, e mantidos cinco minutos em banho maria a 37 °C.

A seguir, os fragmentos parcialmente digeridos foram centrifugados a 400 x G durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* formado foi suspenso em MdC. Uma segunda centrifugação foi realizada.

Finalmente, o tecido tratado (fragmentos de tecido parcialmente digeridos e células isoladas) foi suspenso em MdC e, então, semeados em garrafas (4-6) de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, código 430372) com 5 mL de MdC e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C, com umidade relativa de 95% e ar atmosférico suplementado com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após os 2 a 3 primeiros dias de cultivo, o MdC era cuidadosamente removido para não desprender os fragmentos de tecidos parcialmente aderidos ao plástico e substituído por MdC fresco. Com essa primeira troca de meio, também eram descartadas as células não aderentes ao plástico (principalmente células sanguíneas remanescentes).

Desse modo, as presumidas CTMs da placenta foram selecionadas pela adesão ao plástico como condição primária da caracterização padronizada. A partir desse momento, o meio de cultivo foi, então, trocado a cada 3 ou 4 dias até atingir uma confluência<sup>4</sup> de 80 - 90%. Durante todo esse período, o padrão de crescimento e a morfologia das células foram regularmente observadas sob microscopia de contraste de fase.

Dessa etapa em diante, as células multiplicadas e já individualizadas foram utilizadas para expansão para nova passagem, ou congeladas para estoque, conforme segue: as culturas (cada garrafa) foram inicialmente lavadas com 3 mL de PBS pH 7,2 a 37 °C e logo tratadas com 2 mL de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, código 25300-062) a 37 °C e mantidas na incubadora de CO<sub>2</sub> durante dois minutos para desprender as células do plástico da garrafa de cultivo. Transcorrido esse tempo, as células foram visualizadas sob microscópio para verificar o desprendimento das células da superfície da garrafa. Logo, as células em suspensão foram transferidas a tubo Falcon de 15 mL, onde a reação foi neutralizada pela adição de 3 mL de MdC e incubada em banho maria durante 5 minutos a 37 °C. A seguir, as suspensões de células foram centrifugadas a 400 x G durante cinco minutos. Finalmente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi novamente suspenso em MdC, e as células foram semeadas em garrafas de cultivo para nova passagem ou em meio de congelamento composto de SBF e dimetilsulfóxido (DMSO) em uma relação de volume 10:1, respectivamente. A suspensão de células

---

<sup>4</sup> É a relação entre a superfície coberta pelas células reproduzidas e a superfície não coberta da garrafa de cultivo.

em meio de congelamento ( $1 \times 10^6$  células/mL) foi distribuída em criotubos (1,25 mL por criotubo), os quais foram depositados no dispositivo CoolCell® e armazenados no freezer de  $-80$  °C durante, aproximadamente, 24 h. Logo, os criotubos foram transferidos para caixas de estoque devidamente identificadas.

Todos os ensaios experimentais foram realizados nas passagens 4 a 6. Isso foi escolhido em função dos resultados previamente obtidos em nosso laboratório, no qual foi observada uma maior expressão de citocinas hematopoiéticas das CTMs-PH na quinta passagem em comparação com as passagens 1 e 10 (BENEDETTI, 2014).

Assim, as células estocadas nos criotubos eram descongeladas, cultivadas e expandidas até a terceira passagem antes dos experimentos<sup>5</sup> propriamente ditos.

### 3.5. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS ISOLADAS DA PLACENTA HUMANA

#### 3.5.1. Ensaios de potencial de diferenciação nas linhagens mesodermiais

Com o objetivo de verificar se as células isoladas e cultivadas da região das vilosidades coriônicas da PH apresentam o potencial de diferenciação nas linhagens mesodermiais padronizadas, que é uma das propriedades que caracterizam as CTMs em cultivo, foram realizados testes de indução adipogênico e osteogênico.

Para tal, foram semeadas  $19 \times 10^3$  células (densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) em placas de cultivo de quatro poços e cultivadas com MdC em incubadora de CO<sub>2</sub> até atingirem confluência aproximada de 60%. A partir desse momento, dois dos quatro poços da placa de cultivo foram mantidos como controle negativo dos experimentos com trocas de MdC a cada 3 ou 4 dias.

Por outro lado, os outros dois poços de cultivo receberam os tratamentos com os meios indutores específicos, sendo esses também trocados a cada 3 ou 4 dias. As formulações dos meios indutores<sup>6</sup> para indução de ambas as linhagens foram reproduzidas a partir de PELEKANOS *et al.*, 2016.

---

<sup>5</sup> No anexo C se oferece um fluxograma completo do desenho experimental.

<sup>6</sup> Os meios indutores foram preparados e fracionados (5 mL) em tubos Falcon de 15 mL sem a adição de SFB e estocados no freezer. Uma vez que alíquotas eram, previamente, descongeladas aos tratamentos, o SBF era adicionado.

Os experimentos de diferenciação foram realizados em duplicata técnica e amostral para cada uma das amostras.

#### 3.5.1.1. Ensaio de potencial de diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, foi usado um meio indutor composto pela mesma formulação do MdC e suplementado com 10 µg/mL de insulina, 100 nM de dexametasona, 200 µM de indometacina e 500 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX).

A diferenciação adipogênica foi promovida, ao longo de 21 dias de tratamento dos cultivos, em incubadora de CO<sub>2</sub> com trocas do meio indutor a cada 3-4 dias.

Após o período de tratamento, a indução no fenótipo adipogênico foi avaliado pela presença de gotículas lipídicas intracelulares, utilizando para isso a técnica de coloração com *Oil Red O* (Sigma, código O1391) (diluído em isopropanol numa relação de 0,5 % em p/v).

Para isso, o meio indutor dos poços experimentais, assim como o MdC dos poços de controle negativos foram suavemente removidos e as culturas foram lavadas uma vez com PBS e fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma) durante 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz.

Após esse intervalo, o PFA foi removido e os quatro poços de cultivo foram lavados duas vezes com PBS pH 7,2. Logo na etapa de coloração, a solução do corante *Oil Red O* foi adicionada sobre todos os poços (tratados e controles) e incubados durante 5 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz.

Finalmente, o corante foi removido e os poços de cultivo foram lavados de 3 a 4 vezes com PBS pH 7,2.

O experimento foi analisado mediante microscopia de contraste de fase, cuja coloração vermelha/alaranjada é indicativa de acúmulos lipídicos e referida como indução adipogênica positiva.

#### 3.5.1.2. Ensaio de potencial diferenciação osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, foi usado um meio indutor composto pela mesma formulação do MdC e suplementado 10 mM de β-glicerol fosfato, 100 nM de dexametasona, e 50 µM de ácido ascórbico.

A diferenciação osteogênica foi promovida, ao longo de 28 dias de tratamento dos cultivos, em incubadora de CO<sub>2</sub> com trocas do meio indutor a cada 3-4 dias.

Após o período de tratamento, a indução no fenótipo osteogênico foi avaliada pela presença de depósitos extracelulares de cálcio mediante a coloração com Vermelho de Alizarina.

As etapas de fixação, lavagens e coloração dos cultivos nos testes osteogênicos foram realizadas da mesma maneira que nos testes adipogênicos, com a diferença do corante específico segundo o experimento.

O experimento foi analisado mediante microscopia de contraste de fase, cuja coloração vermelha/alaranjada é indicativa de depósitos de cálcio extracelular e referida como indução osteogênica positiva.

### **3.5.2. Ensaio de células formadoras de colônia (CFC)**

Esses testes foram realizados com o objetivo de verificar o potencial de multiplicação clonogênica das CTMs-PH e quantificar sua frequência.

Para isso, foram semeadas 100 células por poço em placas de 6 poços e cultivadas com MdC em incubadora de CO<sub>2</sub> durante 15 dias.

Após esse período, o meio de cultivo foi removido, e os cultivos foram lavados uma vez com PBS e, em seguida, fixadas com PFA 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz.

Logo, o PFA foi removido, e os cultivos foram novamente lavados duas vezes com PBS e submetidos à coloração com Giemsa (diluído em água destilada uma relação de 1:5 (v/v)) durante 5 minutos de incubação em temperatura ambiente e protegido da luz.

Finalmente, o excesso de corante foi removido, e os poços foram lavados de 3 a 4 vezes com PBS.

O experimento foi verificado sob microscopia de contraste de fase, no qual foram quantificados todos os acúmulos com mais de 50 células, considerados como sendo uma colônia, isto é, o resultado da multiplicação de uma única célula.

### **3.6. CURVAS DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR**

Esses testes foram realizados com o objetivo de avaliar a proliferação cumulativa das CTMs-PH das diferentes amostras ao longo de doze dias em cultivo, sendo as células contabilizadas em intervalos regulares de tempo de 48 h por triplicata técnica.

Para isso,  $1 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de cultivo de 6 poços, e os cultivos foram, então, mantidos em incubadora de CO<sub>2</sub>.



A cada 48 h o meio de cada poço de uma triplicata técnica foi removido, e as culturas foram lavadas uma vez com PBS.

Logo, os cultivos foram tripsinizados com 1 mL por poço com Tripsina-EDTA 0,05% durante 2 minutos mantidos na estufa de CO<sub>2</sub>.

A seguir, as células em suspensão foram colocadas em um tubo Falcon de 15 mL, onde a enzima foi bloqueada com a adição de MdC durante 5 minutos em banho-maria. Logo, as células foram centrifugadas a 400 x G durante 6 minutos, o sobrenadante foi descartado, e as células foram novamente suspensas<sup>7</sup> em MdC e homogeneizadas para evitar a presença de grumos remanescentes.

Finalmente, as células foram contadas em câmara de Neubauer (duas alíquotas, 8 quadrantes por alíquota). A quantidade absoluta de cada triplicata foi calculada pela multiplicação da concentração obtida das contagens em câmara Neubauer, pelo volume de diluição das células no tubo Falcon e dividido por três.

Em conjunto com as contagens, também foi avaliada a viabilidade celular mediante o uso do corante vital Azul de Tripán (Gibco, código 15250).

Os valores da média e do desvio padrão das quantificações de cada contagem foram expressos através de um gráfico em função do tempo, assim como os valores da porcentagem de viabilidade celular.

Para as análises estatísticas, foram calculadas as áreas abaixo da curva de crescimento de cada triplicata amostral ao longo do tempo.

Após a caracterização morfológica e funcional das células de cada uma das amostras de placenta (n=3), foi realizado um *pool* contendo a mesma proporção de células da cada amostra, a fim de minimizar as variações individuais entre as mesmas. Este *pool* foi utilizado para a realização de todos os outros experimentos deste trabalho.

### 3.7. CONFECÇÃO DO ARCABOUÇO DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA)

Todo o processo de planejamento, decisões e testes que resultaram na padronização da síntese de arcabouços porosos de PMMA foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC.

---

<sup>7</sup> O volume de suspensão das células em cada etapa de quantificação foi ajustado em função de contabilizá-las adequadamente em câmara de Neubauer.

### 3.7.1. Escolha do material e testes de citocompatibilidade

Como ponto de partida, foi (a partir da sugestão do Prof. Dr. Ricardo Machado) utilizado o PMMA como material para a síntese dos arcabouços, dada a disponibilidade do mesmo e a familiarização do grupo de pesquisa do LCP com a síntese desse polímero.

Tendo em vista as questões mecanobiológicas (EBARA; UTO, 2015; WANG, J. H.; THAMPATTY, 2006), foi inicialmente verificado, mediante consulta na literatura, que o PMMA apresenta um valor de módulo de compressão (Young) de 3,1GPa (ALI *et al.*, 2015), semelhante ao do osso esponjoso na medula óssea (tabela 1).

Uma vez isso constatado, foi realizado um conjunto de testes citocompatibilidade de cultivo das CTMs-PH sob peças compactas de PMMA, para averiguar a capacidade de adesão e proliferação das células nesse material.

Para isso, foram obtidas peças cilíndricas de PMMA com diâmetro de 3,2 cm e 0,5 cm. As peças foram, então, tratadas com um banho de álcool 70% durante 24 h seguido de 10 h de exposição à luz ultravioleta (UV) em cada lado da peça. Após esse procedimento, as peças foram colocadas em placas de cultivo de 6 poços com 3 mL de MdC durante 2 dias para confirmar que o material estava em condição estéril.

Finalmente, alíquotas de células em suspensão ( $1 \times 10^6$  células/mL em alíquota única de 100  $\mu$ L ou 5-8 alíquotas de 20  $\mu$ L) foram semeadas sob a superfície do material. A placa de cultivo foi incubada durante 2 h para permitir a adesão das células ao substrato. Após esse intervalo, MdC foi lentamente adicionado afim de cobrir toda a superfície do material.

Os cultivos foram mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> durante 5 dias e, então, visualizados mediante microscopia de contraste de fases.

### 3.7.2. Primeira fase da síntese: Poliestireno como elemento porogênico

A primeira estratégia utilizada para a confecção dos arcabouços de PMMA, consistiu em utilizar esferas de poliestireno (PS) de granulometrias definidas como elemento porogênico, visando a reprodução de aspectos genéricos da arquitetura da medula óssea humana. Para tanto, esferas de PS de 300-600  $\mu$ m e 710-1180  $\mu$ m foram separadas por peneiramento. As esferas foram colocadas em tubos de ensaio, e a solução do monômero de metacrilato de metila (MMA) contendo o iniciador 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) numa relação de

0,5% em massa foi lentamente adicionada. A reação de polimerização foi conduzida à 70 °C, durante 5 h.

Ao término da reação, ciclohexano, um solvente seletivo do PS, foi adicionado para remoção deste elemento porogênico.

Finalmente, a estrutura macroscópica (externa e interna) destes protótipos foram analisadas.

### **3.7.3. Fase de otimização do método de confecção: cristais de NaCl como elemento porogênico**

Para isso, 5 g de sal grosso comercial, de três granulometrias<sup>8</sup> diferentes obtidos mediante peneiramento (G I: 700 - 1180  $\mu\text{m}$ , G II: 1180 - 1680  $\mu\text{m}$  e, G III: 1680 - 2360  $\mu\text{m}$ ), foram colocados em tubos de ensaios e deixados em estufa de vácuo (160 mmHg) durante 24 h à 60°C para desumidificação. Em seguida, os tubos foram expostos a um ambiente com 95% de umidade durante um período de 48, 120 e 480 h (2, 5 e 10 dias, respectivamente) utilizando, para isso, uma incubadora de CO<sub>2</sub>. Passado o tempo determinado, os tubos foram novamente colados em estufa à vácuo sob as mesmas condições anteriormente descritas para remoção da umidade dos cristais de NaCl fusionados. Em seguida, 2 mL de MMA contendo 0,5% em massa do iniciador AIBN foi lentamente adicionado nos tubos. Os tubos foram tratados com fluxo de N<sub>2</sub> para inércia do meio reacional, vedados e colocados para aquecimento à 70°C durante 5 h em um banho de água com controle de temperatura.

Subsequentemente, os protótipos de arcações foram removidos do tubo de ensaio e colocados em um Erlenmeyer contendo água destilada e deixados em agitação branda à 60 °C durante 72 h, com trocas de água realizadas a cada 12 h.

Finalmente, foram realizadas análises quantitativas para avaliar a remoção dos cristais de NaCl nas diferentes configurações experimentais (granulometria e dias de fusão em ambiente de umidade).

---

<sup>8</sup> Os tamanhos dos cristais de NaCl foram escolhidos em função do tamanho previsto na literatura para os poros da medula óssea e pela granulometria padronizada das peneiras.

## 3.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MECÂNICA DOS ARCABOUÇOS DE PMMA

### 3.8.1. Análise da macro e microestrutura

Os arcabouços das PMMA confeccionados com as três granulometrias de cristais de NaCl (G I, G II e G III) foram, primeiramente, analisados mediante observação macroscópica e em estereomicroscópio quanto a sua macroestrutura física. Por outro lado, a microestrutura foi analisada em MEV (descrito na sessão 3.10.2)

### 3.8.2. Porosimetria

A determinação do tamanho médio dos poros dos arcabouços de PMMA foi calculada pela medida, em programa informático (ImageJ), de 10 poros a partir das imagens de MEV dos arcabouços ( $n = 2$ ) de cada uma das granulometrias de fabricação (G I, II e III), diretamente metalizados com uma camada de ouro.

O cálculo foi realizado a fim de constatar o tamanho final dos poros nos arcabouços fabricados com as diferentes granulometrias de cristais de NaCl, dado que o próprio processo de fusão ocasiona um desgaste parcial das partículas de NaCl, causando redução do tamanho real do poro em relação às dimensões das partículas inicialmente utilizadas na fabricação.

### 3.8.3. Porosidade total

A porosidade total (%P) do material foi obtida a partir de corpos de prova com dimensões definidas. O cálculo da porosidade foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\%P = \frac{V_t - m/\rho}{V_t} * 100$$

onde “m” é a massa do corpo de prova,  $V_t$  é o volume total do corpo de prova e “ $\rho$ ” é a massa específica real do PMMA puro. O valor da %P foi calculado pela média de 5 corpos de prova.

### **3.8.4. Ensaio de resistência a tensão e deformação (modulo de Young)**

O ensaio de compressão foi realizado em corpos de prova cilíndricos de aproximadamente 20 mm de altura e 14 mm de diâmetro. Os corpos de prova foram ensaiados sob compressão em uma máquina universal de ensaio com uma célula de carga de 50 kg e uma taxa de deformação constante de 1mm/s. O módulo de compressão (Young) foi obtido a partir da relação entre tensão e deformação durante a fase de deformação elástica do material. Nesse teste, foram utilizados 3 corpos de prova de cada das granulometrias de fabricação.

### **3.9. CULTIVOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA EM AMBIENTE 3D NOS ARCABOUÇOS DE PMMA**

Para realizar os ensaios comparativos em MEV e microscopia confocal dos cultivos celulares em ambiente tridimensional, neste trabalho, foram utilizados os arcabouços produzidos com as granulometrias G I e G III. Tudo isso em virtude de verificar possíveis diferenças na capacidade de adesão e interação das CTMs-PH em relação ao tamanho do poro. Entretanto, teste de preliminares foram realizados utilizando arcabouços produzidos com as granulometrias G II, já que estes foram os primeiros a serem produzidos.

#### **3.9.1. Teste de cultivo 3D nos arcabouços**

Inicialmente, um conjunto de testes de cultivo nos arcabouços de PMMA fabricados com a granulometria G II foram realizados para verificar, por via indireta, a capacidade de adesão das CTMS-PH em ambiente 3D.

Desse modo, foram semeadas  $2 \times 10^5$  (concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL) nos arcabouços, colocadas em placas de 24 poços e deixadas assentar no substrato durante 2 h. Logo depois desse intervalo, foi suavemente adicionado 1,5 mL de MdC, e as placas de cultivo foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> durante 2 dias.

Logo, os arcabouços foram transferidos para outro poço na mesma placa de cultivo a fim de constatar mudança de pH do MdC provocado apenas pelas células que, eventualmente, ficaram aderidas e proliferaram nos arcabouços.

Após mais 4 dias de cultivo, o MdC nos poços contendo os arcabouços foi constatado acidificado, indicando possível proliferação

celular. A partir desse momento, o MdC foi trocado por 1,5 mL de MdC fresco.

Completando 14 dias de cultivo, os arcabouços foram extraídos do poço com pinça estéril e lavados com banhos de PBS em cada uma das faces para remoção completa do MdC no interior das peças.

Os poços nos quais foram extraídos os arcabouços foram visualizados sob microscópio de luz para constatação de possível proliferação de células.

À guisa de continuação, os arcabouços foram submetidos ao seguinte tratamento: foram colocados em tubos Falcon de 50 mL contendo 3 mL de Tripsina-EDTA 0,05%, sendo as fases do arcabouço banhadas várias vezes. A tripsina foi transferida a um tubo Falcon de 15 mL, e a reação foi neutralizada pelo bloqueio da enzima com 4 mL de MdC durante 5 minutos em banho-maria.

A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 400 x G durante 5 minutos, quando se verificou a formação de *pellet*<sup>9</sup>, o qual foi novamente suspenso em MdC, e as células foram semeadas sobre um novo poço de cultivo, onde constatou-se a presença de células mediante visualização em microscópio de contraste de fase.

Todavia, os arcabouços previamente tratados com tripsina foram realocados em novos poços, nos quais foram adicionados 1 mL MdC para permitir a proliferação de possíveis células remanescentes.

Os cultivos foram, então, mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> durante 7 dias quando foram processados para análise em MEV.

### 3.9.2. Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de MEV foi empregada para verificar a capacidade de adesão, proliferação, migração, síntese de MEC e a morfologia das CTMs-PH nos arcabouços de PMMA. Essas análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LaBCeV) do CCB, BEG.

Para tal, foram semeadas (semeadura por capilaridade)  $2 \times 10^5$  células (concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL) nos arcabouços fabricados com as granulometrias G I e G III de cristais de NaCl em placas de 24 poços, e mantidas na estufa de CO<sub>2</sub> durante 2 h, para permitir que as

---

<sup>9</sup> A obtenção de *pellet* nestes testes indicava a presença das CTMs-PH provenientes exclusivamente dos arcabouços de PMMA, o que representou a primeira evidência (indireta), confirmando a capacidade de cultivo neste modelo de ambiente 3D.

células assentem nas paredes do arcabouço e evitar, com isso, a sedimentação ao fundo dos poços.

Em seguida, foi suavemente adicionado MdC até cobrir a superfície dos arcabouços, e os cultivos 3D foram mantidos durante 2 dias em estufa de CO<sub>2</sub>. Logo, os arcabouços foram transferidos para outros poços permitindo, com isso, a proliferação unicamente das células aderidas ao substrato, e cultivados em estufa de CO<sub>2</sub> durante 12 dias, contabilizando, assim, um total de 14 dias em cultivo.

Após esse período de cultivo, os arcabouços foram lavados com PBS como descritos na seção 3.10.1 e fixados com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de sódio 0,1 M durante 24 h. Em seguida, a solução de fixação foi removida, e os arcabouços foram cortados em pequenos pedaços, os quais foram colocados em tubos Falcon. Esses fragmentos foram, então, tratados com solução de pós-fixação de tetróxido Ósmio 1% durante 2 h e, posteriormente, lavados com solução de Cacodilato de sódio 0,1M.

A seguir, foi realizado o processo de desidratação das amostras com soluções crescentes de álcool (30 °GL, 50 °GL e 70 °GL), durante 15 minutos por graduação alcoólica.

No dia anterior às análises, o processo de desidratação foi completado com tratamentos em álcool 90 °GL e 100 °GL (P.A.), sendo o tratamento com a graduação de álcool 100°GL repetido duas vezes.

Os tratamentos finais, assim como o registro de fotomicrografia eletrônicas, foram realizados nas dependências do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Assim, após o tratamento de desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no equipamento de ponto crítico<sup>10</sup> de CO<sub>2</sub> (Leica EM CPD 030).

Na etapa final, as amostras foram metalizadas com uma cobertura de ouro de 30 nm (metalizador Sputter Leica EM SCD 500) e, então, visualizadas sob microscópio eletrônico de varredura por captura de elétrons secundários com aceleração de 10 ou 15 kV (Jeol JSM-6390LV).

### **3.9.3. Microscopia confocal**

Com o objetivo de verificar a interação, a síntese de moléculas de MEC, a morfologia e sua relação com disposição e orientação dos filamentos do citoesqueleto, tendo em vista as propriedades físicas da rigidez e topografia do material, além de constatar a tridimensionalidade

---

<sup>10</sup> Nesse processo, as moléculas de álcool são substituídas por moléculas de CO<sub>2</sub>.

do crescimento das CTMs-PH no interior dos arcabouços de PMMA, foi utilizado a técnica de visualização por microscopia confocal.

Entretanto, para conseguir a visualização dos elementos do citoesqueleto das CTMs-PH e dos componentes da MEC nos arcabouços poliméricos, foi necessário realizar a marcação desses com uma molécula específica conjugada com outra molécula fluorescente.

Assim, neste trabalho, as células foram coradas quanto aos filamentos do citoesqueleto de actina com Faloidina<sup>11</sup> (diluição 1:10 (v/v) em PBS) conjugada com o a molécula fluorescente Alexa 588. (Invitrogen, código A12380).

Para tal, as CTMs-PH foram cultivadas durante 14 dias seguindo os mesmos procedimentos utilizados no preparo das amostras para MEV.

Após o período de cultivo, os arcabouços foram lavados com PBS (como descritos na seção 3.10.1) e fixados com solução de formaldeído a 3,7% (v/v) durante 30 minutos protegidos da luz. Em seguida, os arcabouços foram cortados em pequenos pedaços, os quais foram colocados em tubos Falcon, onde as células foram permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25%) durante 15 minutos. Logo, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio, compostos por 2% albumina do soro bovino em PBS, durante 90 minutos e após 3 lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com Faloidina durante 20 minutos protegidas da luz e lavadas 3 vezes com PBS, e então analisadas sob microscópio confocal (Leica, modelo TCS SP5), utilizando o programa informático LASX (Leica Microsystems para SO Windows). Assim como as MEV, as análises em microscopia confocal foram realizadas no LCME da UFSC.

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados quantitativos obtidos neste trabalho foram analisados estatisticamente mediante a utilização das plataformas de análise estatística (software) Statistica versão 13 Dell, e GraphPad Prism versão 7, ambas para sistema operacional Windows.

Os dados de cada variável aleatória foram submetidos a comprovação de normalidade através do teste de Shapiro–Wilk seguidos do teste de Grubbs para comprovação de possíveis *outliers*.

---

<sup>11</sup> A Faloidina é uma micotoxina que se une especificamente à actina filamentar (F-actina) e, quando conjugada, a molécula fluorescente é utilizada como marcador específico de filamentos de actina.



Para as análises de inferência estatística, foi utilizado o modelo de análise de variância (ANOVA), precedido do teste de Levene para comprovação do critério de homocedasticidade. Nos casos de constatações de diferença significativa, foi empregado o modelo de correção (teste *post hoc*) de Bonferroni.

Para todos os testes, o intervalo de confiança (IC) considerado foi de 95%, sendo as diferenças estatisticamente significativas para valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).



## 4. RESULTADOS

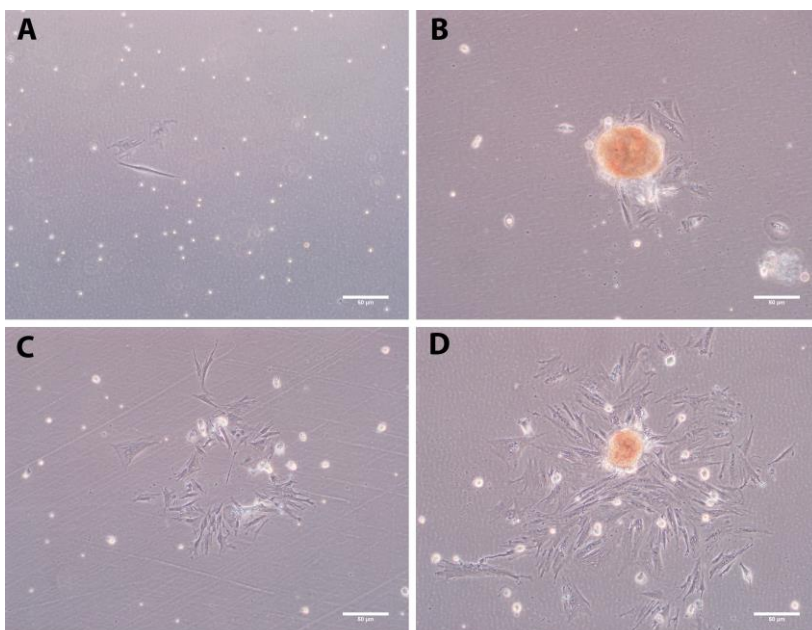
### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA

As CTMs-PH das três amostras coletadas (n=3) foram isoladas pela sua capacidade de adesão ao substrato de cultivo (plástico da garrafa de cultivo). Durante o período de cultivo primário, o MdC foi substituído regularmente, sendo as células não aderentes removidas com o meio descartado.

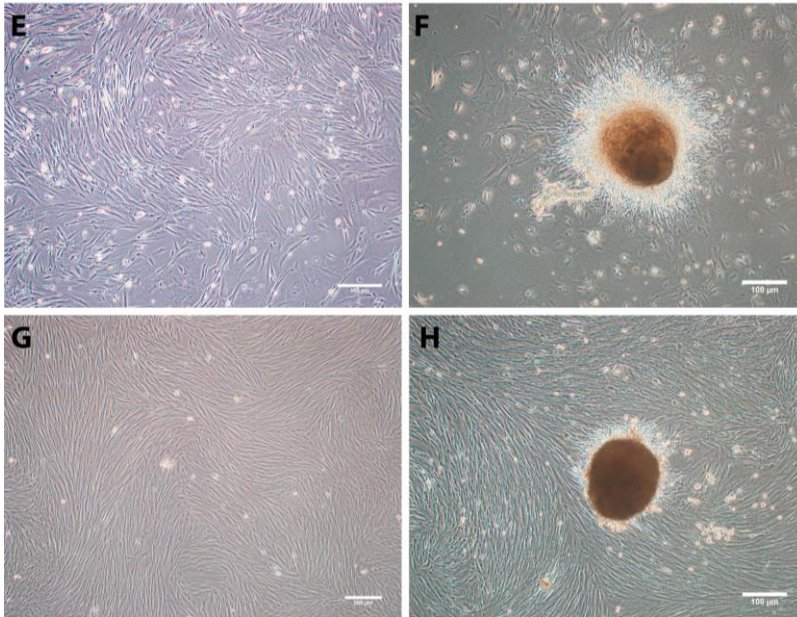
A morfologia fibroblastóide característica das CTMs, assim como a proliferação e a migração das células (tanto individualizadas quanto a partir dos fragmentos) em cultivo foram analisadas através de microscopia de contraste de fase em períodos regulares de tempo (dias 5, 11, 18 e 25) ao longo do cultivo primário, como observado na figura 8.

#### **Figura 8: Morfologia, proliferação e migração das CTMs-PH durante o período de cultivo primário.**

Fotomicrografia de contraste de fase representativa dos cultivos primários (n=3) no dia 5 (A e B) e no dia 11 (C e D), aumento de 200X.



**Continuação da figura 9: Morfologia, proliferação e migração das CTMs-PH durante o período de cultivo primário.** Fotomicrografia de contraste de fase dos cultivos primários no dia 18 (E e F) e no dia 25 (G e H), aumento de 100X.



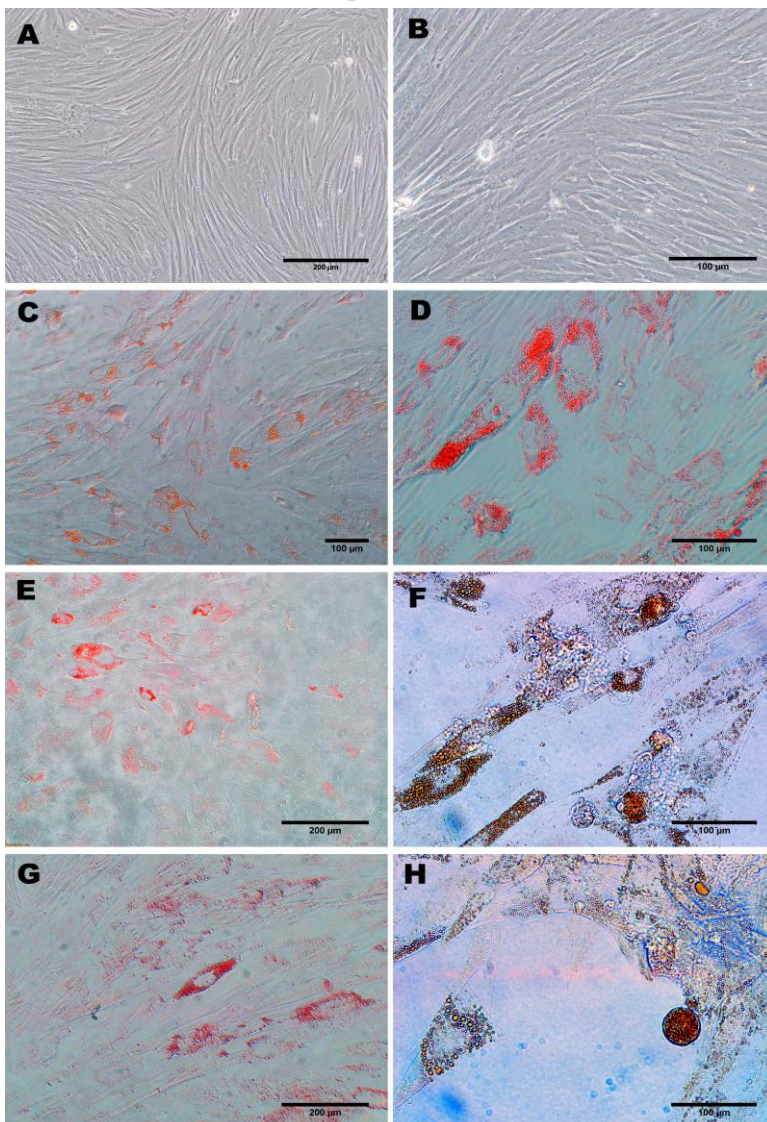
#### 4.1.1. Ensaios de diferenciação nas linhagens mesodermas

Com o objetivo de caracterizar funcionalmente as células isoladas da placenta como sendo uma CTM, foram realizados testes padronizados de diferenciação nas linhagens mesodermas: adipogênica e osteogênica.

Assim, nos ensaios de diferenciação adipogênica, os cultivos foram tratados durante 21 dias com meio indutor adipogênico composto de MdC e suplementado com 10 µg/mL de insulina, 100 nM de dexametasona, 200 µM de indometacina, e 500 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX).

O potencial de diferenciação nessa linhagem foi considerado positivo pela presença de acúmulos lipídicos intracelulares, mediante o tratamento de coloração com *Oil Red O*, como observado na figura 9.

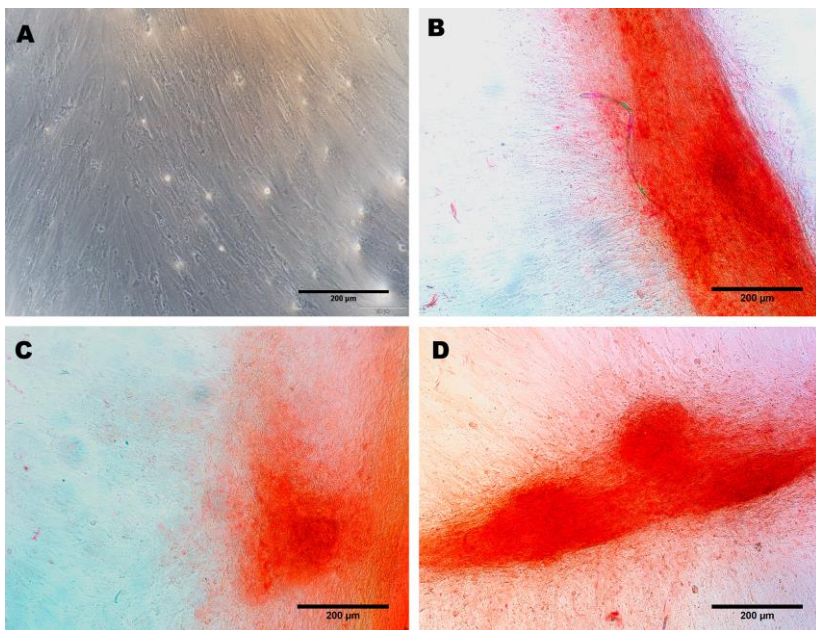
**Figura 9: Diferenciação adipogênica.** Fotomicrografias de contraste de fase dos ensaios de diferenciação adipogênica (n=3) corados com *Oil Red O*. A e B) Controle; cultivo celular mantido com MdC, aumento 200 e 600X, respectivamente. Células da amostra 1 (C e D), amostra 2 (E e F) e amostra 3 (G e H) tratadas com meio indutor adipogênico durante 21 dias, aumento de 200 e 600X respectivamente.



Por outro lado, nos ensaios de diferenciação osteogênica, as células foram tratadas durante 28 dias com meio indutor osteogênico composto por MdC e suplementado com 10 mM de  $\beta$ -glicerol fosfato, 100 nM de dexametasona, e 50  $\mu$ M de ácido ascórbico.

O potencial de diferenciação nessa linhagem foi considerado positivo pela observação de depósitos de cálcio extracelular, mediante a coloração com Vermelho de Alizarina, como observado na figura 10.

**Figura 10: Diferenciação osteogênica.** Fotomicrografias de contraste de fase dos cultivos submetidos a tratamento com meio indutor osteogênico durante 28 dias, e corados com Vermelho de Alizarina. A) Controle; cultivo celular mantido com MdC, aumento de 200X. Cultivos da amostra 1 (B), 2 (C) e 3 (D) tratados com meio indutor osteogênico, aumento de 200X.



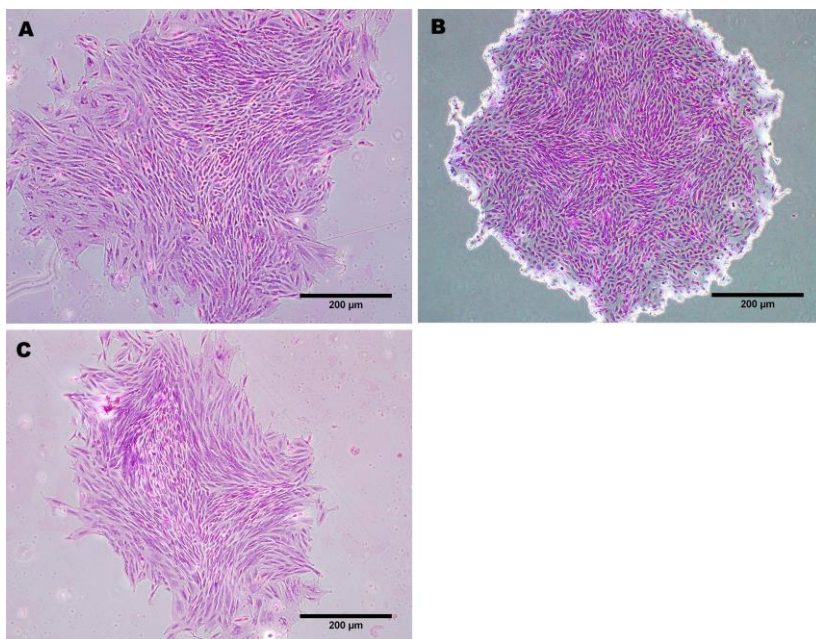
#### 4.1.2. Ensaios células formadoras de colônia (CFC)

Os ensaios funcionais de CFC foram realizados para quantificar a frequência em cada amostra ( $n=3$ ) das células com grande capacidade de multiplicação clonal.

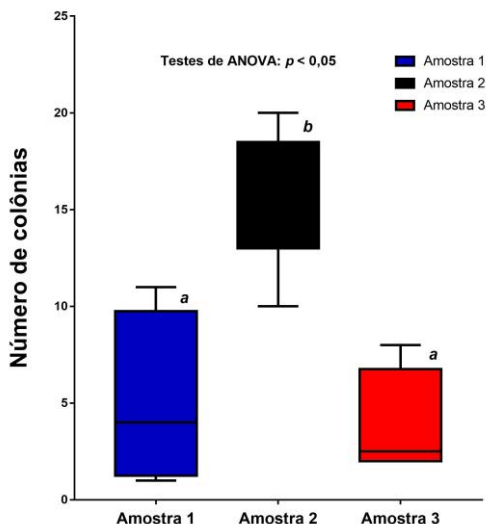
Para isso, foram semeadas  $1 \times 10^2$  células em placas de 6 poços, e os cultivos foram mantidos com MdC durante 15 dias em estufa de  $\text{CO}_2$ .

Após esse período, os cultivos foram submetidos à coloração com Giemsa e observados sob microscópio de contraste de fase para quantificar as colônias (aqueles acúmulos com mais de 50 células), como observado na figura 11.

**Figura 11: Células formadoras de colônias.** Fotomicrografia de contraste de fase de colônias resultante da proliferação de uma única célula com grande capacidade de multiplicação clonal ao longo de 15 dias em cultivo, imagens da amostra 1 (A), amostra 2 (B) e amostra 3 (C); aumento de 100X



**Figura 12: Quantificação das colônias nos ensaios de CFC.** Gráfico comparativo em formato de caixa das quantificações de colônias obtidas após 15 dias em cultivo, de três experimentos independentes para cada uma das amostras,  $n=3$ . Neste gráfico, *a* é estatisticamente diferente de *b*.



**Tabela 3: Análise estatística das colônias obtidas nos ensaios de CFC.**

		Número de colônias		
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Média e desvio padrão		$5 \pm 4,546$	$15,83 \pm 3,488$	$3,75 \pm 2,872$
Teste de ANOVA		$F_{(2,11)} = 16,89$ ; Valor de $p = 0,00004$ ( $p < 0,05$ )		

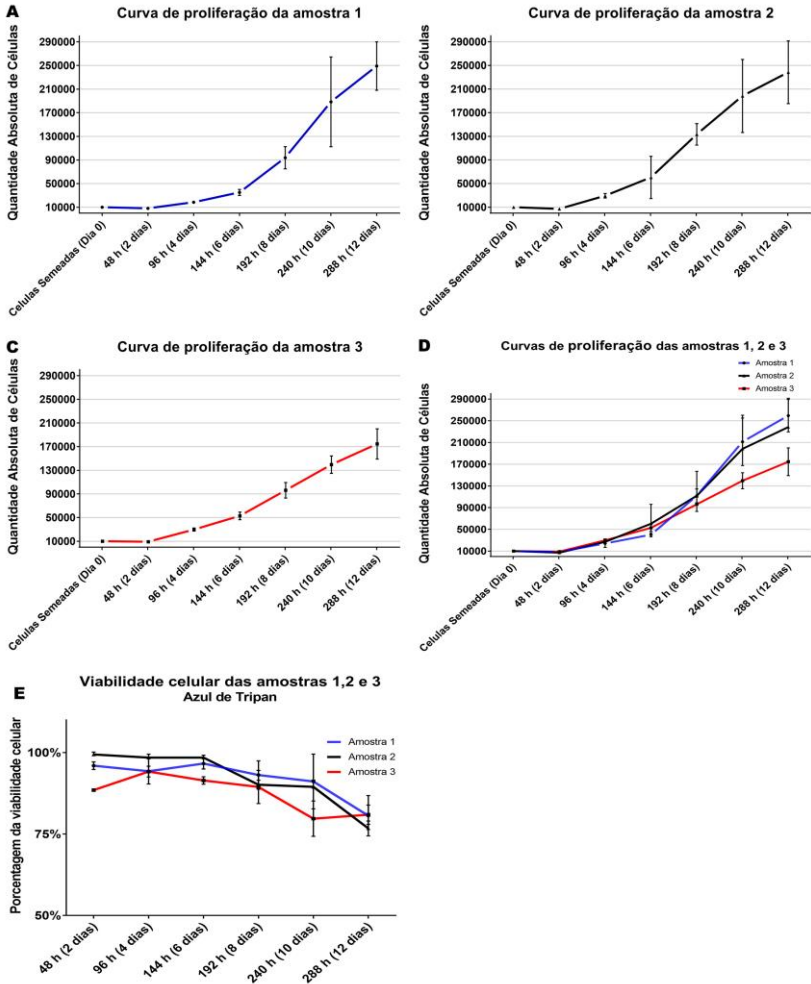
#### 4.2. CURVAS DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de curva de proliferação foram realizados com o objetivo de avaliar o comportamento de multiplicação das CTMs-PH das diferentes amostras ao longo do tempo, ( $n=3$ ).

A cada 48 h, a quantidade absoluta de CTMs-PH em cultivo foi contada em câmara de Neubauer, como o observado na Figura 13. Ainda, utilizou-se a coloração com azul de Tripán para quantificar a viabilidade celular.

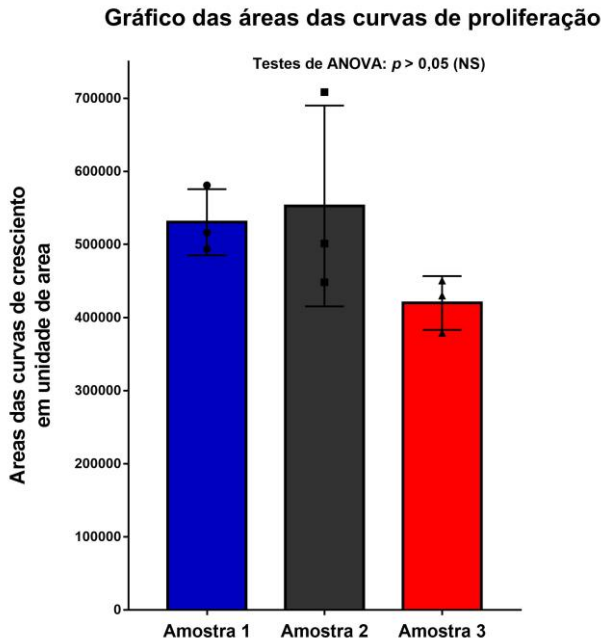


**Figura 13: Curvas de proliferação e viabilidade celular.** A, B e C) Gráficos das curvas de proliferação das amostras 1 (linha azul), 2 (linha preta) e 3 (linha vermelha), respectivamente avaliadas em intervalos de 48 h, de um total de 12 dias em cultivo D) Sobreposição dos gráficos das curvas de proliferação das amostras 1, 2 e 3. E) Gráfico da viabilidade celular das amostras 1, 2 e 3 obtida mediante azul Tripan nos mesmos intervalos avaliados que as curvas de proliferação.



Todavia, a proliferação cumulativa entre as amostras foi comparada através das áreas calculadas debaixo de cada uma das curvas de proliferação, como representado na Figura 14.

**Figura 14: Áreas calculadas das curvas de proliferação.** Gráfico comparativo em formato de coluna das áreas debaixo de cada curva de proliferação (n=3) calculadas com programa informático.



**Tabela 4: Análise estatística das áreas das curvas de proliferação.**

<b>Áreas calculadas das curvas de proliferação</b>			
	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>
<i>Média e desvio padrão</i>	530321 ± 45324	552622 ± 137456	419864 ± 36819
<i>Teste de ANOVA</i>	F <sub>(2,6)</sub> = 2, 039; Valor de $p = 0, 2110$ ( $p > 0,05$ ); NS		

### 4.3. CONFECÇÃO DO ARCABOUÇO DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA)

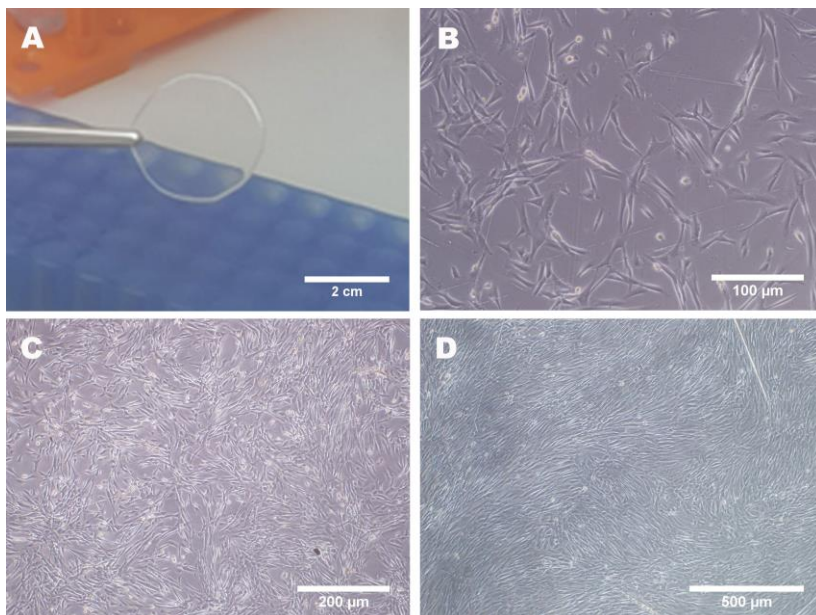
#### 4.3.1. Escolha do material e testes de citocompatibilidade

A confecção dos arcabouços de poli(metacrilato de metila) (PMMA) foi precedido de um conjunto de testes de citocompatibilidade para verificar a capacidade de adesão e proliferação das CTMs-PH neste material, utilizando peças de PMMA compacto com diâmetro de 3,2 cm e 0,5 cm de altura.

Na Figura 15, observa-se uma das peças de material compacto utilizado nos testes de citocompatibilidade, além das células sendo cultivadas nos mesmos.

#### Figura 15: Teste de citocompatibilidade do PMMA compacto.

A) Aspecto macroscópico de uma peça cilíndrica de PMMA compacto utilizada nos testes de biocompatibilidade. B, C e D) CTMs-PH cultivadas durante 5 dias na superfície de peças de PMMA compacto (observadas em diferentes campos das peças já que foram semeadas a partir de pequenas gotas: B campo mais periférico, C medial e D central), aumentos de 400, 200 e 100X, respectivamente

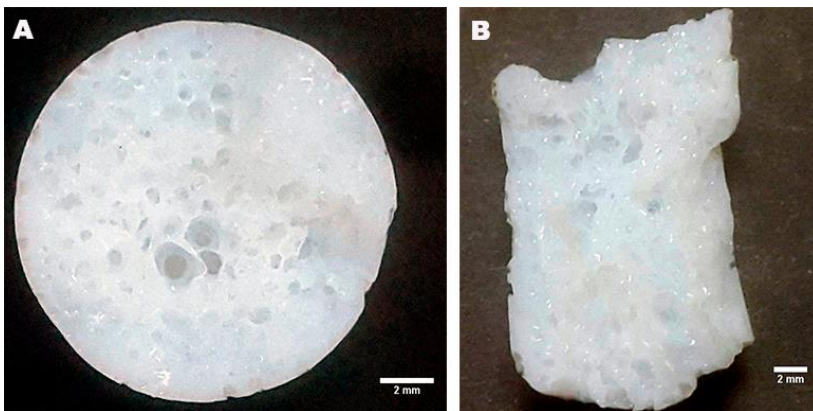


### 4.3.2. Primeira fase da síntese: Poliestireno como elemento porogênico

Após verificar que o PMMA em formato compacto é citocompatível para o cultivo das CTMs-PH, seguiu-se uma primeira fase de confecção dos arcabouços com o *design* desejado utilizando esferas de PS de duas granulometrias (300-600 $\mu\text{m}$  e 710-1180 $\mu\text{m}$ ) como elemento porogênico, como o descrito na sessão 3.8.2, obtendo peças protótipos, como observado na figura 16.

#### Figura 16: Arcabouços protótipos de PMMA fabricados com PS como elemento porogênico.

A e B) Fotografia macroscópica de um corte transversal e longitudinal respectivamente de um arcabouço de PMMA protótipo, após o tratamento com ciclohexano.



### 4.3.3. Fase de otimização do método de confecção: cristais de NaCl como elemento porogênico

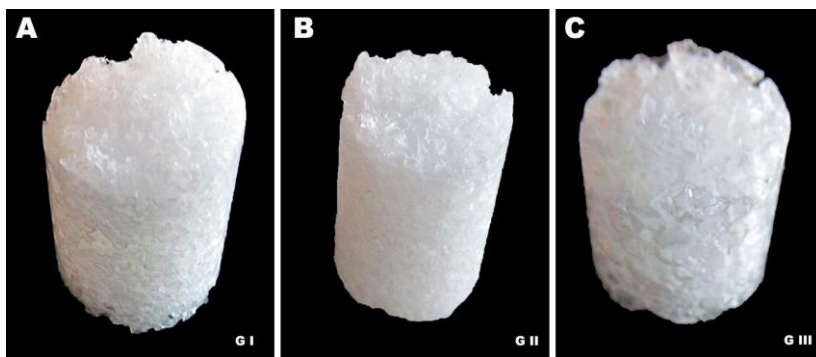
Após apontar a problemática no *design* desejado dos arcabouços associada ao PS como elemento porogênico, seguiu-se uma fase de análise, buscas de alternativas e adaptações no processo de síntese.

Assim, a partir de uma nova adaptação da síntese de PMMA em combinação com uma estratégia que utiliza cristais de NaCl expostos a um ambiente de alta umidade relativa para promover a fusão e, por conseguinte, a interconexão final dos poros gerados após a remoção dos cristais mediante a solubilização em água.

Com isso, foi possível a padronização de síntese dos arcaouços de PMMA em moldes com dimensões definidas, e com poros interconectados utilizando cristais de NaCl de três granulometrias diferentes obtidos mediante peneiramento (G I: 700 – 1180  $\mu\text{m}$ , G II: 1180 - 1680  $\mu\text{m}$  e G III: 1680 – 2360  $\mu\text{m}$ ), como observado na Figura 17.

**Figura 17: Aspecto macroscópico dos arcaouços de PMMA produzidos com o método de fusão de cristais de NaCl.**

Fotografia macroscópica dos arcaouços de PMMA produzidos com as granulometrias de cristais de NaCl G I (A), G II (B) e G III (C).



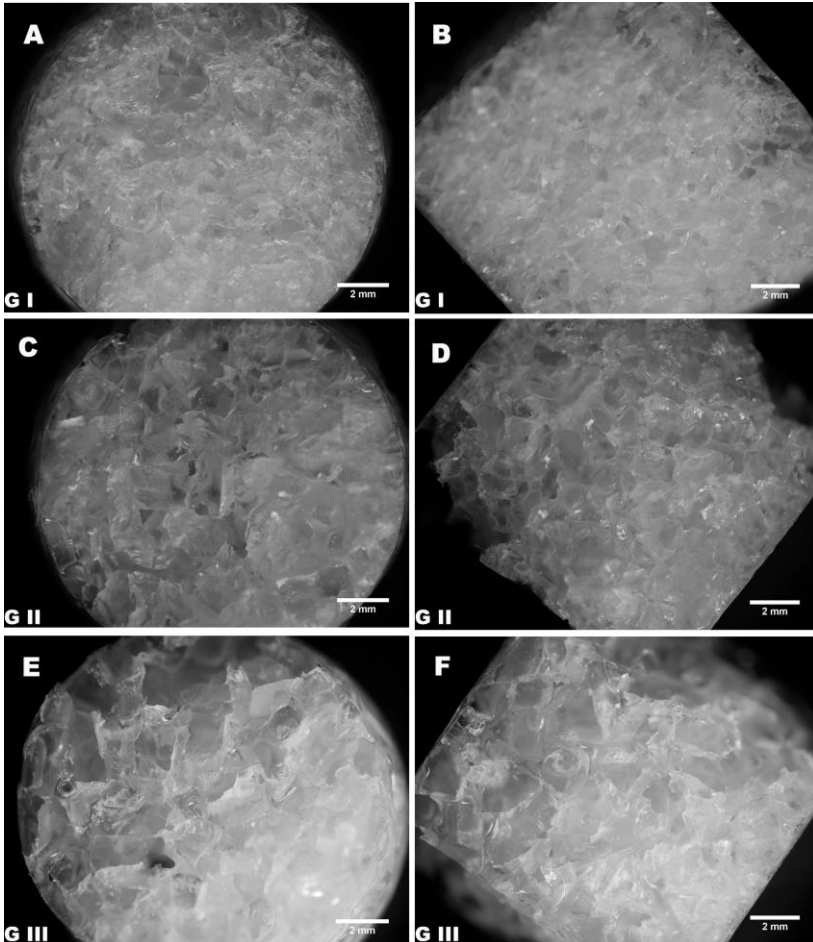
#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MECÂNICA DOS ARCAOUÇOS DE PMMA

Para as análises de caracterização macroestrutural, foi utilizada a visualização em estereomicroscópio dos arcaouços de PMMA fabricados com o método de sínteses de fusão de cristais de NaCl das três granulometrias (G I, G II e G III).

Na Figura 18, observa-se a macroestrutura interna dos arcaouços de PMMA fabricados com as três granulometrias de cristais de NaCl, após a remoção das partículas porogênicas utilizando banhos de água destilada.

**Figura 18: Macroestrutura dos arcabouços de PMMA produzidos com o método de fusão de cristais de NaCl.**

Fotomicrografia em estereomicroscópio da superfície apical e interna dos arcabouços fabricados com as granulometrias de cristais de NaCl G I (A e B), G II (C e D) e G III (E e F), aumento de 2X.

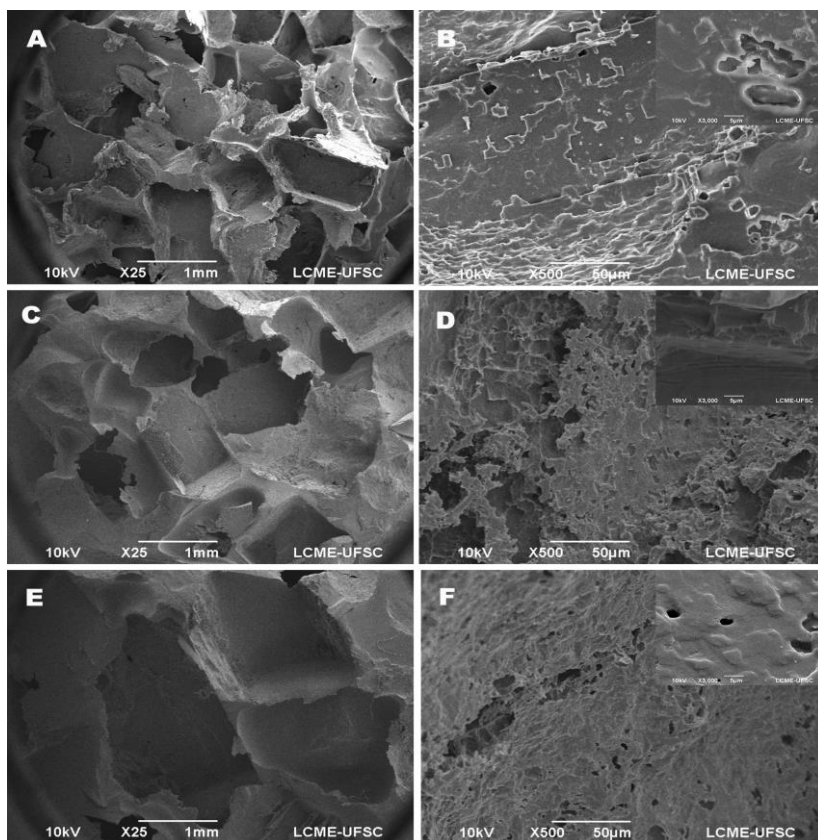


Todavia, para verificar as características microestruturais dos arcabouços de PMMA foram realizadas análises em MEV. Nessas análises, buscou-se também quantificar o tamanho médio dos poros nos arcabouços

produzidos com as diferentes granulometrias de cristais de NaCl, como observado na Figura 19.

**Figura 19: Microestrutura dos arcabouços de PMMA produzidos com o método de fusão de cristais de NaCl.**

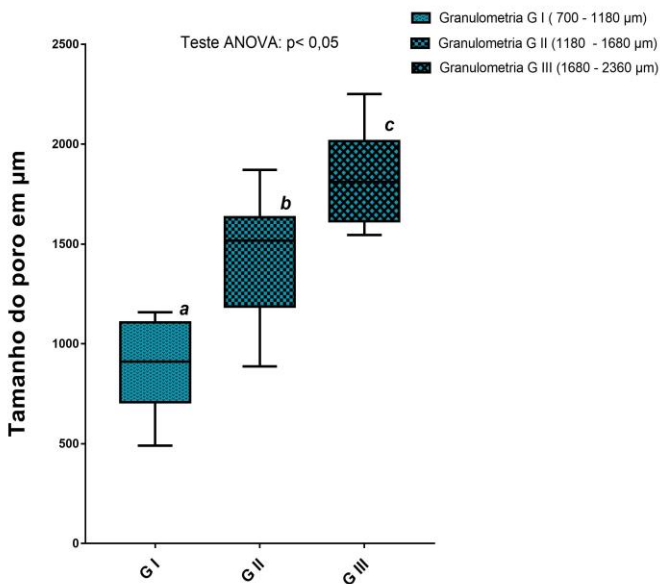
Fotomicrografias de MEV da superfície apical e da microestrutura dos arcabouços fabricados com a granulometria de partículas de cristais de NaCl G I (A e B), G II (C e D) e G III (E e F), aumento de 25 e 500X, respectivamente. Nas margens superiores direitas das micrografias B, D e F, mostram-se com maior aumento, a microestrutura dos arcabouços de PMMA, aumento de 3000X.



#### 4.4.1. Porosimetria

O tamanho médio dos poros nos arcabouços fabricados com as diferentes granulometrias de partículas de cristais de NaCl foi calculado a partir das imagens de MEV.

**Figura 20: Tamanho do poro.** Gráfico em formato de coluna da quantificação de 10 poros para cada uma das granulometrias de fabricação dos corpos de prova a partir das imagens de MEV. Neste gráfico, *a*, *b* e *c* são estatisticamente diferentes.



**Tabela 5: Análise estatística do tamanho médio dos poros dos arcabouços de PMMA**

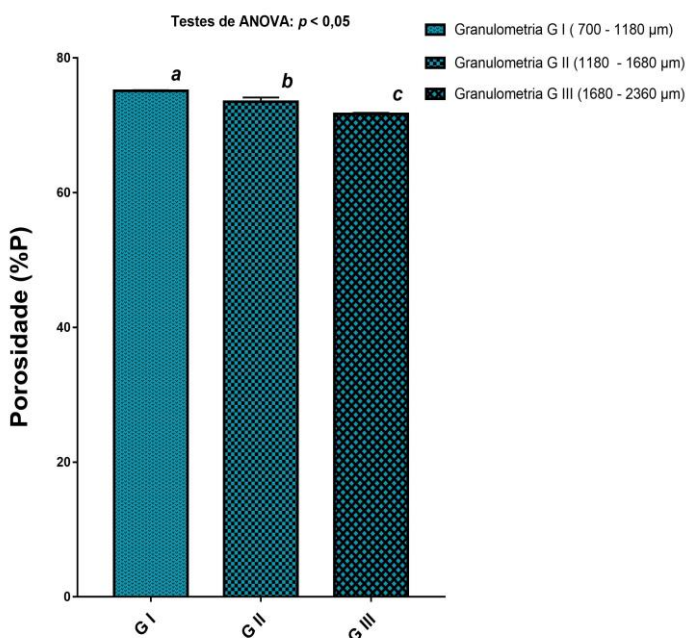
Tamanho do poro (em $\mu\text{m}$ )			
	G I	G II	G III
Média e desvio padrão	875,1 $\pm$ 231,9	1424 $\pm$ 310,3	1832 $\pm$ 260,1
Teste de ANOVA	$F_{(2,27)} = 25,14$ ; Valor de $p < 0,0001$ ( $p < 0,05$ )		



#### 4.4.2. Porosidade total

A porosidade total (%P) dos arcaouços fabricados para cada uma das diferentes granulometrias foi calculada pela fórmula descrita na sessão 3.9.2 a partir de corpos de prova com dimensões definidas.

**Figura 21: Porosidade (%P).** Gráfico em formato de coluna dos valores calculados de porosidade a partir da fórmula descrita na sessão 3.9.2 de peças de arcaouços fabricados com as três diferentes granulometrias. Neste gráfico, *a*, *b* e *c* são estatisticamente diferentes



**Tabela 6: Análise estatística dos valores da porosidade total (%P) dos arcaouços de PMMA**

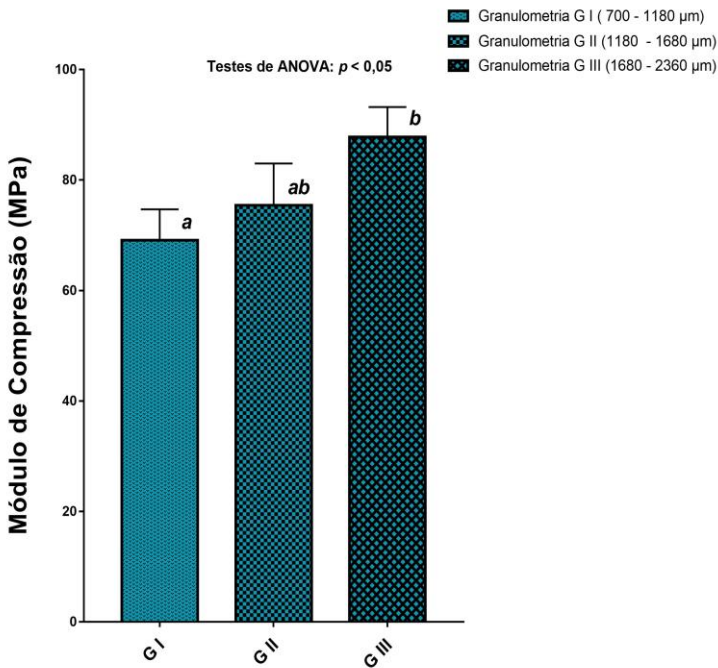
	Porosidade (%P)		
	G I	G II	G III
<i>Media e desvio padrão</i>	75,14 $\pm$ 0,084	73,49 $\pm$ 0,6582	71,71 $\pm$ 0,165
<i>Teste de ANOVA</i>	F <sub>(2,6)</sub> = 56,784; Valor de $p < 0,001$ ( $p < 0,05$ )		

#### 4.4.3. Ensaio de resistência a tensão e deformação (módulo de Young)

Os ensaios de compressão foram realizados com corpos de prova com dimensões definidas (20 mm de altura e 14 mm de diâmetro), os quais foram submetidos à compressão em uma máquina universal de ensaio com uma célula de carga de 50 kg e uma taxa de deformação constante de 1mm/s.

O valor do módulo de Young foi obtido a partir da relação entre tensão e deformação durante a fase de deformação elástica do material.

**Figura 22: Módulo de Young.** Gráfico e formato de coluna dos valores de módulo de compressão (Young) como medida da rigidez dos corpos de prova calculados a partir da relação entre tensão e deformação de 3 amostras para cada uma das granulometrias de fabricação. Neste gráfico, *a* é estatisticamente diferente de *b*.

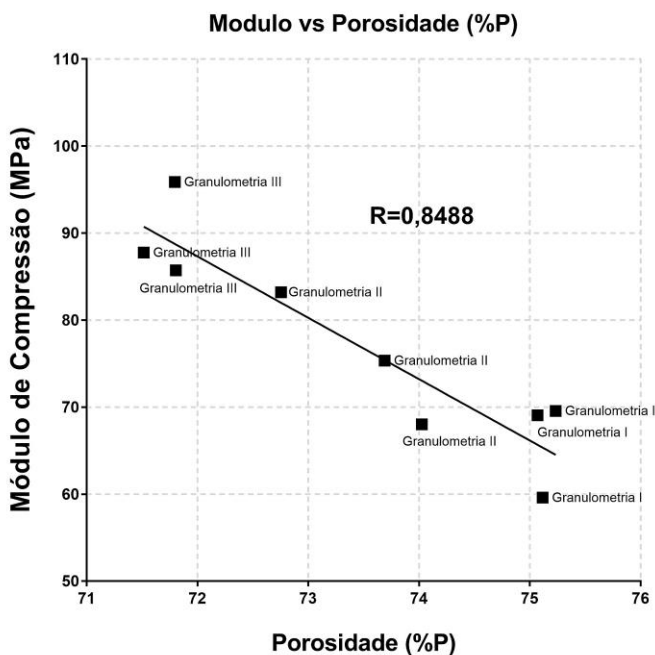


**Tabela 7: Análise estatística dos valores de módulo de Young dos arcabouços de PMMA**

Valor do módulo de Young (MPa)			
	G I	G II	G III
<i>Média e desvio padrão</i>	66,07 ± 5,621	75,53 ± 7,591	89,79 ± 5,373
<i>Teste de ANOVA</i>	F <sub>(2,6)</sub> = 10,87 ; Valor de p=0,010 (p < 0,05)		

**Figura 23: Análise de correlação entre o valor do módulo Young e a porosidade.**

Gráfico de regressão linear simples dos valores do módulo de compressão em função da porosidade calculada. R representa o valor obtido de R quadrado na análise de regressão linear simples.



#### 4.5. CULTIVOS TRIDIMENSIONAIS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA NOS ARCABOUÇOS DE PMMA

##### 4.5.1. Teste de cultivo 3D nos arcabouços de PMMA

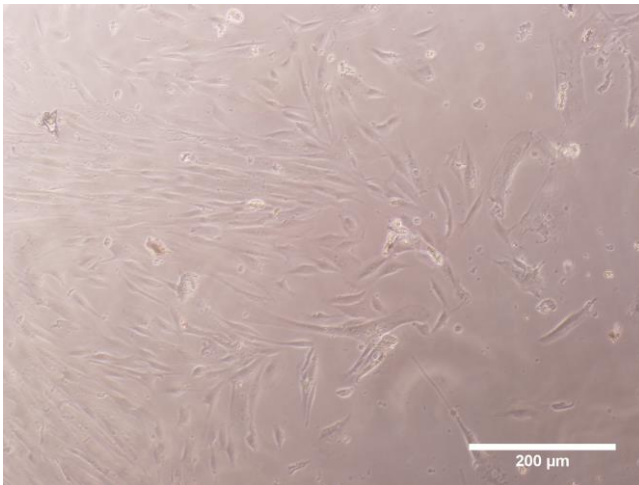
Inicialmente, foram realizados testes de cultivo em ambiente 3D nos arcabouços de PMMA que permitiram constatar por via indireta a capacidade de adesão e interação das CTMs-PH neste modelo de cultivo 3D.

Assim, as células foram cultivadas nos arcabouços de PMMA fabricados com a granulometria G II (1180 - 1680  $\mu\text{m}$ ) de partículas de NaCl, como descrito na sessão 3.9.1.

Após um total de 14 dias em cultivo (ver sessão 3.9.1), os arcabouços foram tratados com Tripsina-EDTA 0,05%, a suspensão foi centrifugada, o *pellet* foi suspenso em MdC, e as células, semeadas em uma placa de 24 poços e mantido em estufa de CO<sub>2</sub> durante três dias, quando foram visualizados sob microscópio de contraste de fase, como observado na Figura 24.

##### Figura 24: Testes de cultivo 3D das CTMs-PH nos arcabouços de PMMA.

A) Fotomicrografia de contraste de fase das CTMs-PH com 3 dias em cultivos (2D), as quais foram previamente cultivadas durante 4 dias nos arcabouços de PMMA (ambiente 3D, aumento de 20X).

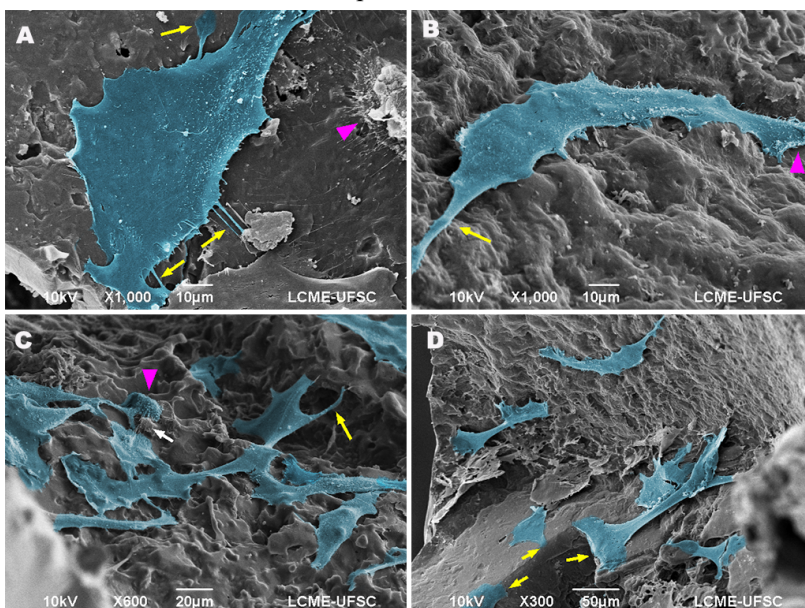


#### 4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A interação das CTMs- PH, após 14 dias em cultivo nos arcabouços de PMMA (granulometrias G I e G III), foi analisada em termos de capacidade de adesão, morfologia, migração e síntese de MEC das CTMs-PH através da técnica de MEV descrita na sessão 3.10.2. As células nas imagens de MEV foram artificialmente coloridas de cor ciano (código 538697, Photoshop CS), como o observado nas Figuras 25, 26 e 27.

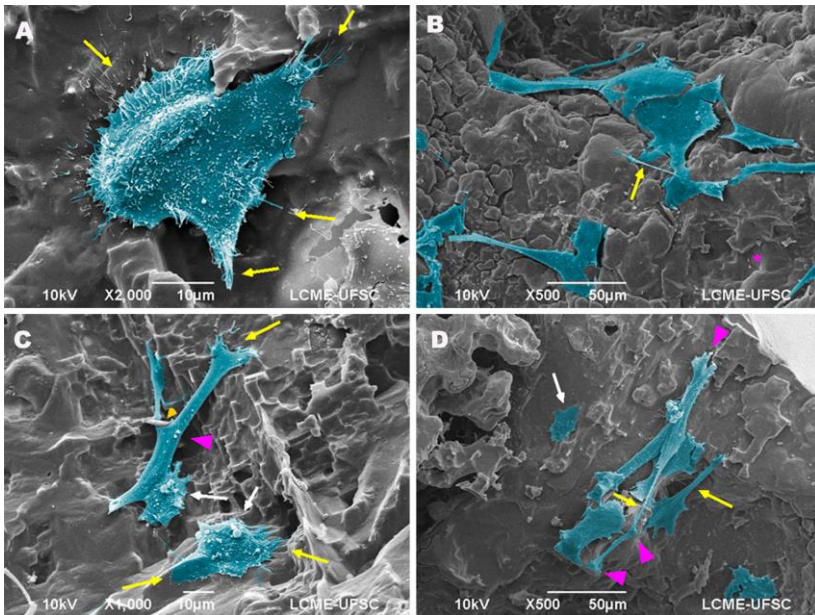
#### Figura 25: CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcabouços de PMMA fabricados com a granulometria G I de cristais de NaCl.

A) Célula individual emitindo lamelipódios e filipódios (flechas amarelas). A cabeça de flecha magenta indica outra célula contendo várias vesículas. B) Célula individual emitindo um longo lamelipódio (flecha amarela), e um conjunto de projeções de membrana (cabeça de flecha magenta). C) Grupo de células, onde a flecha amarela destaca um filipódio de uma célula parcialmente assentada no substrato. A cabeça de flecha magenta destaca uma célula com grande quantidade de vesículas. D) Grupo de células assentadas em diferentes eixos do substrato onde as flechas amarelas destacam porções de células cujo corpo está simultaneamente em diferentes planos da microestrutura do substrato.



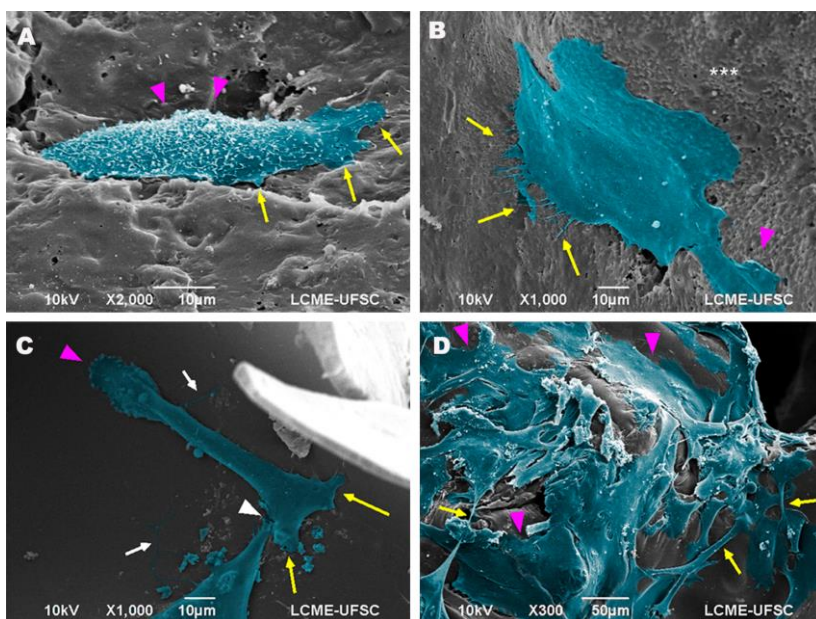
**Figura 26: CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcabouços de PMMA fabricados com a granulometria G II e tripsinizados.**

A) Célula assentada na superfície do substrato, emitindo lamelipódios e filipódios (flechas amarelas). Também, observam-se múltiplas projeções apicais de membrana. B) Grupo de células onde a flecha amarela destaca um delgado filipódio. C) Duas células próximas, onde uma das células (mais central) apresenta uma bifurcação do corpo celular devido ao encontro com uma projeção de polímero (cabeça de flecha laranja). Ainda, a célula encontra-se aderida em três pontos localizados em diferentes planos da microestrutura do substrato. Todavia, se observam vesículas destacadas em ambas as células (flechas brancas) D) Grupo de células parcialmente sobrepostas, emitindo lamelipódios (flechas amarelas). As cabeças de flechas magenta destacam três pontos de adesão de uma das células. A flecha branca destaca uma pequena célula próxima do grupo.



**Figura 27: CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcaibouços de PMMA fabricados com a granulometria G III de cristais de NaCl.**

A) Célula onde se observam lamelipódios periféricos (flechas amarelas) e múltiplas projeções apicais de membrana plasmática (cabeça de flecha magenta). B) Célula assentada e amplamente espreada onde se observam vários filipódios (flechas amarelas) e um lamelipódio (cabeça de flecha magenta). C) Célula (central) com sinais típicos de migração, onde num extremo observa-se uma bifurcação apresentando dois pontos de adesão ao substrato (flechas amarelas), além de um delgado filipódio (flecha branca). No outro extremo, a morfologia apresenta-se oval, contento algumas vesículas (cabeça de flecha magenta). Ainda, na região de contato com a outra célula adjacente (cabeça de flecha branca) visualizam-se delgados filipódios (flecha branca). D) Grupo de células parcialmente sobrepostas, apresentando diversas morfologias: células estendidas (cabeças de flechas magenta), e células com longas porções dos corpos celulares estendidos (flechas amarelas).



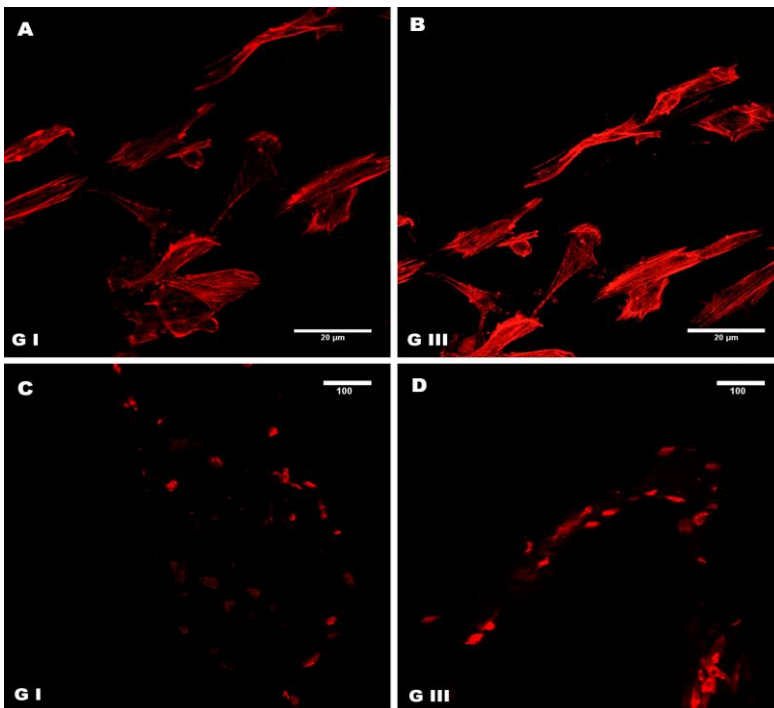
### 4.5.3. Microscopia confocal

Para avaliar a dimensionalidade do crescimento, a morfologia e o depósito de MEC das CTMs-PH cultivadas nos arcabouços de PMMA foi utilizado o recurso de microscopia confocal através da marcação dos filamentos do citoesqueleto com faloidina conjugada com molécula fluorescente (Alexa 588), como visualizado na Figura 28.

A e B) Fotomicrografia confocal em máxima projeção do eixo Z, dos cultivos de CTMs-PH cultivadas nos arcabouços de PMMA A e B)

**Figura 28: Dimensionalidade do crescimento e morfologia das CTMs-PH cultivadas durante 14 dias nos arcabouços de PMMA G I e G III.**

Fotomicrografia confocal em máxima projeção do eixo Z, dos cultivos de CTMs-PH cultivadas nos arcabouços de PMMA (granulometrias G I e G III respectivamente) onde se observam longos feixes paralelos de filamentos de actina (marcados com faloidina Alexa 588, vermelho) nas células individuais, aumento de 63X. C e D) Grupos de células depositadas nas paredes dos poros dos arcabouços de PMMA, aumento de 20X.





Os arcabouços de PMMA foram confeccionados a partir da adaptação de um método de fusão de cristais de NaCl, das granulometrias G I, G II e G III, com a polimerização em massa do monômero MMA e o iniciador AINB em uma relação de 0,5 % de v/v.

Nestes arcabouços, CTMs-PH isoladas das regiões das vilosidades coriônicas, as quais foram caracterizadas pela morfologia, potencial de diferenciação nas linhagens adipogênico e osteogênica, capacidade de formação de colônias e ensaio de curvas de proliferação, se desenvolveram conforme verificado por microscopia eletrônica de varredura e confocal.



## 5. DISCUSSÃO

No contexto da engenharia de tecidos, as atuais propostas de expansão *ex vivo* de CTPHs para transplante buscam a mimetização das relações funcionais dos nichos *in vivo* onde estas células são naturalmente multiplicadas, através de sistemas de co-cultivo tridimensional com CTMs (CHOI *et al.*, 2015; TAKAGI, 2005).

Portanto, a reprodução dessas relações funcionais supõe, primeiramente, o desenvolvimento de uma plataforma 3D de cultivo celular (CHEN, 2016).

Adicionalmente, a placenta também representa um órgão hematopoiético com grande capacidade de expansão das CTPHs durante o desenvolvimento embrionário (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003), contendo CTMs na região das vilosidades coriônicas (CASTRECHINI *et al.*, 2010). Além do mais, o fato da placenta humana ser descartada após o parto a torna uma fonte muito atrativa para obtenção de CTMs, praticamente livre de questionamentos éticos, sendo facilmente acessível (MALEK; BERSINGER, 2011).

Em virtude disso, o consenso inicialmente descrito por Parolini permite isolar células com características típicas padronizada de CTMs por meio de protocolos que envolvem a dissociação mecânica e a digestão enzimática de diferentes regiões da placenta (PAROLINI; ALVIANO; BAGNARA; BILIC; BUHRING; *et al.*, 2008).

Assim, ao utilizar esse protocolo de cultivo de explantes, foi possível estabelecer um padrão de cultivo de células isoladas da região das vilosidades coriônicas da placenta humana selecionadas positivamente pela capacidade de aderência ao plástico de cultivo, apresentando morfologia fibroblastóide. Todavia, durante o período de cultivos primários, foi observado que os fragmentos de tecidos placentários em cultivo, constituem uma fonte rica em CTMs, com grande capacidade de proliferação.

Adicionalmente, quando realizados os ensaios de caracterização funcional, mediante o tratamento das células isoladas em cultivo com meios indutores específicos das linhagens mesodermas adipogênico e osteogênico, essas mostraram ter o potencial de diferenciação nesses fenótipos através de evidências consideradas como positivas.

Ainda, os resultados dos ensaios de células formadoras de colônia (CFC) realizados neste trabalho com as CTMs-PH colocaram em evidência a presença de células com grande capacidade de proliferação em condições de cultivo de baixa densidade celular, sendo essa outra das características padronizadas de CTM em cultivo. Entretanto, foram

observadas diferenças significativas entre as amostras coletadas, fato esse associado a variáveis, como as características genéticas individuais das células que apresentaram maior ou menor tempo de duplicação, sensibilidade frente ao processamento das amostras da placenta ou frente ao congelamento que possa alterar ou comprometer as propriedades das células. Além destes, a própria heterogeneidade da população em cada uma das amostras, isto é, constituídas de diferentes proporções de células-tronco, progenitores e células senescentes, também pode estar associada às diferenças na frequência de células com capacidade de formação de colônias (HASS *et al.*, 2011).

Assim, a partir dos resultados dos ensaios de caracterização morfológica e funcional aos quais as células estudadas neste trabalho foram submetidas se observou que estas cumprem com os critérios padronizados de CTMs em cultivo.

Entretanto, vale ressaltar que outros critérios, como a expressão de marcadores específicos de superfície celular, devem ser realizados para confirmar a identidade destas células como sendo CTMs. Trabalhos anteriores no nosso laboratório que utilizam o mesmo protocolo de isolamento têm confirmado a presença desses marcadores específicos nas células isoladas das regiões da membrana coriônica e das vilosidades coriônicas (BENEDETTI, 2014; HECK, 2012; SILVA, 2012).

Contudo, nossos resultados confirmaram que o protocolo de isolamento celular, realizado pela dissociação mecânica e digestão enzimática de fragmentos de tecido da região das vilosidades coriônicas da placenta, permite, eficientemente, obter células individualizadas que apresentaram características morfológicas e funcionais típicas padronizadas de CTMs em cultivo.

Esses resultados confirmam a hipótese de a placenta humana ser uma fonte rica em CTMs (FUKUCHI *et al.*, 2004).

Os ensaios de curva de proliferação realizados neste trabalho mostraram uma cinética em que se identificaram duas fases no comportamento das populações: uma fase inicial de adaptação ao substrato e às condições de cultivo, quando as células apresentam uma baixa taxa de multiplicação, além de morte celular, em que as contagens, nas primeiras 48 h, foram inferiores à quantidade de células inicialmente semeadas em todos os experimentos; uma segunda fase, a partir das 96 h de cultivo, quando as células apresentam crescimento exponencial, sendo, portanto, uma fase sensível, já que as possíveis diferenças quantitativas nas populações manifestam-se em grande variação nas triplicatas experimentais. No último intervalo de avaliação desta segunda fase observou-se, nas amostras 1 e 2, uma redução da taxa de proliferação

devido, possivelmente, à inibição por contato, uma vez que os cultivos estavam em alta confluência (>90%), com exceção da amostra 3, a qual manteve a taxa de proliferação exponencial.

Ainda, foi observada uma perda gradual de viabilidade celular em função do tempo, o que pode estar associado ao processo de morte celular, pelo estresse ocasionado pela elevada confluência.

Sendo assim, esses dados mostraram uma cinética de proliferação das CTMs isoladas da região das vilosidades coriônicas compatíveis com estudos anteriores, que utilizam CTMs isoladas de outras regiões da placenta humana e do cordão umbilical (MANOCHANTR *et al.*, 2013; ZHONG *et al.*, 2012).

Por outro lado, diferentes objetivos de estudos com CTMs demandam a capacidade de poder marcar células individuais vivas, como por exemplo, estudos de *cell tracking* (seguimento de células) (RIZZO *et al.*, 2017). Nesse contexto, vários recursos têm sido desenvolvidos, incluindo a utilização da marcação com a proteína verde fluorescente GFP, a qual é o produto da expressão de um gene clonado da espécie de água-viva *Aequorea victoria*. A GFP necessita apenas a exposição à luz no espectro de 475-495 nm de longitude de onda para refletir a luminosidade no espectro de 520-560 nm. Ainda assim, o gene da *GFP* pode ser introduzido nas CTMs mediante vários métodos, permitindo, assim, localizá-las ainda viáveis (RAIMONDO *et al.*, 2006).

Sendo assim, o laboratório de Células-tronco e bioengenharia vem padronizando e otimizando um conjunto de métodos e técnicas laboratoriais que constituem proveitosas ferramentas na avaliação de diferentes aspectos da biologia e do comportamento das CTMs-PH. Nesse contexto, a padronização da transfecção de CTMs de placenta humana com GFP foi previamente realizada no nosso laboratório, utilizando o plasmídeo pCX-EGFP que confere às células a expressão da proteína GFP, mediante a comparação de outros métodos (SILVA, 2012). Nesse trabalho, os resultados obtidos mediante a técnica de eletroporação mostraram-se com maior eficiência na taxa de transfecção em relação ao método utilizado de lipossomos.

Neste trabalho, foi realizada a comparação entre dois protocolos de transfecção através do método de eletroporação (denominados A e B) com concentrações de 1 ou 2 µg de DNA segundo o experimento, com o intuito de validação daquelas condições que permitissem obter as taxas relativas mais eficientes de incorporação do DNA plasmídico (resultados em anexo D).

Assim, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi verificado que as condições do protocolo B (um pulso de 990 V com

duração de 40 ms), que utilizam uma concentração de 1 µg de DNA para cada  $5 \times 10^4$  células em reações de 10 µL, permitem obter a taxa mais eficiente de transfecção com o plasmídeo pCX-EGFP em relação a todas as outras condições avaliadas, quando quantificadas a partir das fotomicrografias de fluorescência.

Portanto, para fins deste trabalho, o protocolo B (um pulso de 990 V e duração de 40 ms), utilizando a condição experimental antes mencionada, foi estabelecido como padrão de transfecção das CTMs-PH em cultivo.

Todavia, os resultados das avaliações das CTMs-PH transfectadas com plasmídeo após 7 dias de cultivo mostraram uma diminuição da fluorescência de 8 vezes em relação à fluorescência registrada após 24 h de cultivo.

Entretanto, essa última condição não favoreceu a possibilidade de utilizar CTMs-PH transfectadas em cultivos 3D nos arcabouços de PMMA, já que os tempos de cultivo são de 14 dias, período no qual as células perdem completamente a fluorescência.

Por outra parte, tendo em vista o objetivo geral deste trabalho, o de desenvolver um possível modelo 3D de nicho hematopoiético como futura plataforma de expansão *ex vivo* de CTPHS, buscou-se a confecção de um arcabouço que reproduzisse aspectos genéricos da arquitetura do nicho hematopoiético na medula óssea para o cultivo das CTMs-PH em ambiente 3D.

Para tal, foi escolhido o PMMA como biomaterial a ser utilizado na fabricação dos arcabouços, pois apresenta um conjunto de propriedades mecânicas, químicas e de citocompatibilidade previamente avaliados, que o torna adequado em função do objetivo de mimetizar a arquitetura do osso esponjoso.

Sendo assim, como ponto partida, foram realizados testes de citocompatibilidade para cultivo das CTMs-PH sob peças de PMMA compacto. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar uma boa capacidade de adesão e proliferação das células nesse material, semelhante ao plástico de cultivo padrão.

Portanto, após verificar que o PMMA compacto permite a cultivo das CTMs-PH, seguiu-se o planejamento e a realização de testes para a confecção dos arcabouços de PMMA, tendo em vista a reprodução de aspectos genéricos da arquitetura da medula óssea humana, descritos na tabela 1.

Na primeira estratégia de fabricação dos arcabouços, foram utilizadas esferas de PS de duas granulometrias, como elementos porogênicos. Entretanto, nossos resultados mostraram que os arcabouços

não apresentaram uma porosidade homogênea e, ainda mais, não foi lograda uma interconexão completa entre os poros, conforme pode ser observado na figura 20.

Isso, possivelmente, deve-se ao encapsulamento parcial das esferas de PS com o PMMA durante o processo de polimerização, evidenciado pela coloração esbranquiçada das peças.

Algumas variações, como a adição das esferas de PS após colocar a solução de polimerização nos tubos de ensaio, também foram realizadas em função de corrigir esses problemas. No entanto, não conseguimos obter um controle sobre o tamanho do poro e do grau de interconexão desejado.

Contudo, após verificar a ineficiência do PS como elemento porogênico, seguiu-se uma fase de delineamentos de métodos alternativos que permitissem uma conexão física entre os elementos porogênicos formando rede contínua, a modo de evitar o encapsulamento das partículas individualizadas, e permitir sua completa remoção da matriz polimérica. Somente assim pode-se garantir a formação uma rede completamente interconectada de poros nos arca-bouços.

Assim, a partir de uma nova varredura na literatura, foi encontrado um trabalho que relatava uma estratégia de fabricação de arca-bouços de PLA para engenharia de tecidos utilizando cristais de NaCl como elemento porogênico (MURPHY *et al.*, 2002).

Para promover a interconexão dos poros, os autores expuseram os cristais de NaCl em um ambiente com 95% de umidade relativa. A umidade gradualmente provoca a fusão superficial dos cristais de NaCl estabelecendo uma conexão física entre eles. Assim, com esse método de “fusão de sal”, é possível gerar uma alta taxa de interconexão interna dos poros nos arca-bouços pela completa remoção das partículas porogênicas mediante a solubilização em água, além do controle das propriedades mecânicas e da microestrutura (TAN *et al.*, 2011).

Diferentemente da maioria dos estudos que trabalham com soluções poliméricas para formação da matriz, optou-se, por questão de praticidade, pela realização da polimerização em massa do monômero de metacrilato de metila (MMA) sob cristais de NaCl parcialmente fusionados em câmara de umidade controlada. De modo a garantir que houvesse a formação de uma rede porosa interconectada, testes preliminares foram realizados para avaliar o nível de “fusão” dos cristais de NaCl em relação ao tempo de exposição e à capacidade de remoção dos mesmos após a polimerização do MMA. Dessa forma, modificações e ajustes na estratégia de polimerização do MMA foram realizados.

Contudo, para esta segunda estratégia de confecção dos arcabouços de PMMA, foi adaptada o método de fusão dos cristais de NaCl em ambiente de 95% de umidade relativa com a polimerização em massa do PMMA.

A partir das análises macroscópicas dos arcabouços, em primeiro lugar, foi verificado que, com 120 h (5 dias), a fusão era necessária e suficiente para produzir uma alta interconexão interna dos poros, permitindo a remoção total dos cristais de NaCl. Também foi observado o aspecto transparente dos arcabouços, sendo característico desse polímero. Vale ressaltar que as peças se mostraram com aspecto branco pela dispersão da luz devido à própria natureza anisotrópica das peças. Todavia, foi observada uma regularidade no tamanho dos poros.

Por outro lado, as análises em estereomicroscópio permitiram confirmar a regularidade no tamanho dos poros nos arcabouços elaborados com as três granulometrias de cristais de NaCl (G I, II e III). Essas análises também permitiram constatar uma completa interconexão dos poros. Ainda, os resultados mostraram uma grande eficiência de eliminação dos cristais de NaCl no processo de lavagens com água destilada, permitindo, com isso, uma completa interconexão ente os poros.

A partir dos resultados obtidos por MEV dos arcabouços, foi possível reconhecer as diferenças nos tamanhos dos poros em função das granulometrias das partículas de cristais de NaCl. As análises estatísticas confirmaram diferenças significativas entre os poros das diferentes granulometrias de fabricação, o que representa uma condição favorável em vista das futuras avaliações da capacidade de infiltração e proliferação das células nesses arcabouços.

Ainda, foram observados relevos micro-topográficos de formato geométrico regulares nas paredes internas dos arcabouços. Entretanto, foi constatado, mediante análises do trabalho original (MURPHY *et al.*, 2002), que essas topografias são um artefato, produto da polimerização do PMMA sobre as partículas de cristais de NaCl parcialmente desgastadas pelo tratamento de fusão em ambiente de umidade, dada a natureza da ligação iônica do NaCl.

Também, os resultados dos cálculos da porosidade total (%P) das peças em função das granulometrias dos cristais de NaCl utilizadas mostraram uma relação em que as maiores porosidades são obtidas mediante a utilização de partículas porogênicas de granulometrias menores. Isso ocorre assim, porque a quantidade de partículas porogênicas por unidade de volume é maior para partículas de menor



tamanho, o que disponibiliza um menor volume para a ocupação do polímero por unidade de volume total.

Finalmente, os ensaios de resistência a tensão e deformação (módulo de Young) de corpos de prova, fabricados com as granulometrias G I, II e III realizados nesse trabalho mostraram uma relação proporcional em função das granulometrias, isto é, o valor do módulo de Young foi maior para tamanhos de partícula porogênicas maiores. Isso pode ser interpretado considerando a geometria irregular das partículas porogênicas de cristais de NaCl e sua acomodação nos moldes com geometria definida. Assim, os espaços livres entre as partículas porogênicas acomodadas irregularmente é maior para partículas de maior tamanho. Após a polimerização, esses espaços serão preenchidos pelo polímero, resultando, portanto, em maior volume de polímero por unidade de volume total, o que condiciona uma maior resistência frente à deformação por compressão.

Ainda mais, as análises de correlação confirmaram uma relação inversamente proporcional entre as peças de maior porosidade fabricadas com as menores granulometrias das partículas porogênicas de cristais de NaCl e o valor do módulo de Young.

Essa capacidade de controle de variáveis, como o tamanho do poro, das propriedades mecânicas e da microestrutura na confecção de arcabouços utilizando o método de fusão de cristais de NaCl, foi previamente avaliada em um conjunto de trabalhos (ANNABI *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2011; YU, H. *et al.*, 2008). Ainda, nesses estudos, os resultados apontaram as mesmas relações de controles sobre as variáveis mencionadas obtidas neste trabalho.

Contudo, nossos resultados permitem comprovar a capacidade de controle da microestrutura, do tamanho do poro, da porosidade e do módulo Young dos arcabouços de PMMA com finalidade de engenharia em tecidos mediante uma adaptação da polimerização em massa do PMMA com um método de fusão de cristais de NaCl.

Entretanto, vale ressaltar que as propriedades mecânicas dos arcabouços são diferentes das propriedades do PMMA compacto que é 3 GPa (ALI *et al.*, 2015). Assim, o valor de módulo de compressão do material compacto é que indica a relação da rigidez sob a qual as células poderão exercer força de tração, tendo em vista os processos mecanobiológicos.

As análises de compressão das peças de arcabouços são relevantes na medida em que poderão ser utilizadas em estudos posteriores com finalidades de reparo ósseo, sendo essa, também, uma das linhas de pesquisa do nosso laboratório.

Após ter padronizado o método de confecção e realizado a caracterização física e mecânica dos arcabouços de PMMA, esses foram empregados como interface de crescimento em ambiente 3D para cultivo das CTMs-PH.

Inicialmente, um conjunto de testes foi realizado com o intuito de verificar por via indireta a possibilidade de crescimento das CTMs-PH nos arcabouços. A partir dos resultados obtidos nesses testes, verificamos que houve a formação de *pellet* após o tratamento dos arcabouços com tripsina e que, ao ser suspenso em MdC, e semeados em placas de cultivo, foi permitida a recuperação das células viáveis após um período de cultivo em ambiente 3D.

Assim, esses resultados mostram que os arcabouços de PMMA fabricados, os quais foram padronizados neste trabalho, são citocompatíveis, permitindo o cultivo das CTMs-PH.

Para verificar a capacidade de adesão e a morfologia das CTMs-PH cultivadas em ambiente 3D nos arcabouços de PMMA, foi utilizada as técnicas de MEV.

As análises de MEV revelaram, em primeiro lugar, que as CTMs-PH foram capazes de se estabelecerem no interior dos arcabouços com boa capacidade de adesão neste polímero, colonizando os três eixos espaciais da estrutura do mesmo, observando inclusive células cujos corpos celulares estavam diferentes planos especiais.

Esse resultado corrobora estudos nos quais foram utilizados outros biomateriais (PLLA, PLGA) e modelos de arcabouços para cultivo 3D de CTMs (PAPADIMITROPOULOS *et al.*, 2014; VENTURA FERREIRA *et al.*, 2016)

Interessantemente, com as análises das amostras dos arcabouços da granulometria G II, que foram tripsinizados e posteriormente colocados em poços de cultivo, foi possível observar as células aderidas diretamente no substrato (Figura 34).

Todavia, é possível reconhecer que as CTMs-PH se associam às micro-topografias dos arcabouços como possíveis pontos de adesão. Isso está de acordo com recentes estudos que avaliam a influência das topografias no comportamento das CTs em cultivo, tendo essas uma relevância positiva, já que contribui com a capacidade de adesão das células aos substratos de crescimento (DALBY *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2013). Ainda mais, os mecanismos celulares de adaptação e migração nos substratos de crescimento com relevos micro e nanotopográficos estão estreitamente vinculados aos processos mecanobiológicos (SHAO; FU, 2014; TURNER; J. DALBY, 2014; UNAL *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2017).

Todavia, os resultados das análises morfológicas das CTMs-PH nos arcabouços mostraram uma grande diversidade de morfologias sendo algumas mais espaiadas e outras mais filiformes. Ainda, muitas das células foram observadas emitindo filipódios e lamelipódios, possivelmente com funções exploratórias e migratórias no substrato (KRAUSE; GAUTREAU, 2014; MATTILA; LAPPALAINEN, 2008).

Apesar disso, o aspecto fibroblastóide genérico foi encontrado na maioria das células saudáveis. Entretanto, algumas células apresentaram morfologia irregular ou esférica com grande quantidade de vesículas e emissão de filipódios. Esses aspectos morfológicos irregulares também têm sido observados em outros trabalhos que utilizam arcabouços para cultivo 3D (HATAKEYAMA *et al.*, 2013).

Finalmente, neste trabalho, foi utilizada a técnica de microscopia confocal, para confirmar a capacidade de crescimento em ambiente 3D das CTMs-PH nos arcabouços de PMMA, além de analisar a configuração das fibras do citoesqueleto de actina e morfologia espacial adquirida pelas células.

Assim, as imagens de microscopia confocal (Figura 36), confirmam os resultados de MEV em que as CTMs-PH estão dispostas em uma configuração 3D real no interior dos arcabouços de PMMA. Isso somente foi logrado com a utilização da ferramenta de projeção máxima, o que permitiu a reconstrução do ambiente 3D ao mostrar a capacidade de migração das células para o interior dos arcabouços e sua disposição relativa em diferentes planos de profundidade.

Isso está de acordo com o fato de o arcabouço ser um verdadeiro ambiente 3D, permitindo, dessa maneira, que as células sejam distribuídas nos 3 eixos de crescimento espacial.

Todavia, as análises dos filamentos de actina mediante a marcação com faloidina mostraram uma conformação em forma de longos feixes paralelos que parecem percorrer grandes distâncias no interior das células.

Essa disposição dos filamentos de actina tem sido atribuída a células que estão submetidas à alta tensão interna do citoesqueleto quando cultivadas em substratos rígidos (TOJKANDER; GATEVA; LAPPALAINEN, 2012).

Portanto, tendo em vista que a capacidade de infiltração e adesão das células nos arcabouços poliméricos é um dos fatores que determina sua possibilidade de proliferação e conseqüente organização funcional (HAKKINEN *et al.*, 2011), nosso sistema de cultivo 3D de CTMs-PH em arcabouço de PMMA representa um possível modelo consistente com as propostas de mimetizar o nicho hematopoiético na medula óssea.

A partir de toda as adaptações quanto à estratégia de elemento porogênico, para o estabelecimento de uma rede completamente interconectada de poros pela fusão e posterior remoção de cristais de NaCl, e método de polimerização do PMMA em massa, foi possível padronizar a confecção de arcabouços de PMMA para o cultivo das CTMs-PH.

Neste trabalho, o processamento do tecido da placenta humana a termo para o isolamento, cultivo e subcultivo de células das regiões das vilosidades coriônicas, a caracterização morfológica e funcional dessas células de acordo com os critérios de CTMs. A padronização da confecção dos arcabouços e dos cultivos das CTMs-PH nos mesmos, permitiu a condução de testes preliminares para o desenvolvimento de um possível modelo de nicho hematopoietico visando a expansão *ex vivo* de CTPHs para TCH.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

### 6.1. CONCLUSÕES

- As células obtidas para este estudo, demonstraram propriedade de adesão ao plástico de cultivo e proliferação, seguindo os critérios previstos para CTMs.
- As células de todas as amostras apresentaram morfologia fibroblastóide tanto nos cultivos primários quanto nas subculturas após congelamento e descongelamento, característica de CTMs em cultivo.
- Funcionalmente, as células apresentaram potencial de diferenciação para os fenótipos adipogênico e osteogênico, além da capacidade de formação de colônias quando cultivadas em baixas densidades.
- Foi possível otimizar a fabricação de arcabouços de PMMA com o *design* desejado, que reproduziu a arquitetura genérica do osso esponjoso com poros de tamanhos variados e com alta taxa de interconexão.
- A partir dos ensaios de caracterização física dos arcabouços de PMMA, foi verificada uma relação inversamente proporcional entre as frações de granulometrias das partículas de cristais de NaCl utilizadas na fabricação e a porosidade total. Todavia, as frações de granulometrias relacionaram-se proporcionalmente com o valor do módulo de compressão (Young), mostrando que os arcabouços com tamanho de poros maior são mais resistentes.
- Foi possível cultivar as CTMs-PH nos arcabouços de PMMA fabricados com as três granulometrias de cristais de NaCl, observando grande capacidade de infiltração, adesão, migração, e, supostamente, de sínteses de MEC.
- Foi observado que os filamentos do citoesqueleto de actina das CTMs-PH cultivadas nos arcabouços de PMMA acomodam-se formando longos feixes paralelos, característico de células cultivadas em substratos rígidos.

- Também foi verificada a capacidade de os arcabouços serem uma plataforma de cultivo 3D, na qual as células são capazes de aderir em todos os planos espaciais no interior dos mesmos.
- Sendo assim, reconhece-se esses sistemas de cultivo 3D como um possível modelo de nicho hematopoiético *in vitro* CTPHs a ser explorado.

## 6.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar e comparar a expressão de marcadores padronizados de superfície celular de CTMs em ambiente 2D (presentes: CD73, 90 e 105 e não presentes: CD45, 34 e HLA-DR) e 3D (arcabouços de PMMA).
- Quantificar a proliferação e viabilidade das CTMs-PH em ambiente 3D nos arcabouços de PMMA.
- Realizar os imunomarcados para componentes de MEC, como colágeno tipo I, II, laminina, fibronectina entre outras moléculas típicas da MEC, para serem analisados em microscopia confocal.
- Avaliar e comparar a produção e secreção de citocinas de interesse hematopoiético das culturas de CTMs-PH em ambiente 2 e 3D (arcabouços de PMMA).
- Otimizar o tamanho dos poros nos arcabouços e realizar modificações na superfície do material mediante a copolimerização com outros materiais para uma aproximação organomimética desse modelo *in vitro*.
- Realizar e comparar a expansão de CTPHs do SCUP em co-cultivo com CTMs-PH em ambiente 2D e 3D (arcabouços de PMMA e suas modificações) em diferentes períodos de tempo.
- Realizar e comparar a expansão de CTPHs do SCUP com tratamentos com citocinas hematopoiéticas em co-cultivo com CTMs-PH em ambiente 2D e 3D.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEJANDRO MADRIGAL, J.; BARBER, L. D. Matching inside and outside the HLA molecule in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Haematologica**, v. 101, n. 10, p. 1131-1132, 2016.
- ALI, U.; KARIM, K. J. B. A.; BUANG, N. A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). **Polymer Reviews**, v. 55, n. 4, p. 678-705, 2015.
- ALVAREZ-SILVA, M. et al. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development**, v. 130, n. 22, p. 5437-5444, 2003.
- ALWASAI, T.; BREDESON, C. Peripheral blood stem cells or bone marrow as the graft source for allogeneic hematopoietic cell transplantation? **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 91-99, 2014.
- ANKRUM, J. A.; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nat Biotech**, v. 32, n. 3, p. 252-260, 2014.
- ANNABI, N. et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 16, n. 4, p. 371-83, 2010.
- ANVISA., B. A. N. D. V. S.-. **Relatório de Avaliação dos Dados de Produção dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário - Dados de 2015**. . ANVISA, -. Brasília 2016.
- ASHRI, N. Y.; AJLAN, S. A.; ALDAHMAH, A. M. Dental pulp stem cells: Biology and use for periodontal tissue engineering. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 12, p. 1391-1399, 2015.
- BAINO, F.; NOVAJRA, G.; VITALE-BROVARONE, C. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. 202, 2015.
- BAKER, M. Stem cells in culture: defining the substrate. **Nat Meth**, v. 8, n. 4, p. 293-297, 2011.
- BALLEN, K. Umbilical Cord Blood Transplantation: Challenges and Future Directions. **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 5, p. 1312-1315, 2017.

BALLEN, K. K.; GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. **Blood**, v. 122, n. 4, p. 491-498, 2013.

BENEDETTI, A. L. **Expansão ex vivo de células-tronco/ progenitoras hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e placentário**. Tese de doutorado Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014, 2014.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-92, 2001.

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

BISEL, U. et al. Characterization and Classification of Stem Cells. In: STEINHOFF, G. (Ed.). **Regenerative Medicine - from Protocol to Patient: 2. Stem Cell Science and Technology**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p.1-25.

BLUME, K. G.; THOMAS, E. D. A History of Allogeneic and Autologous Hematopoietic Cell Transplantation. In: (Ed.). **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation**: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p.1-11.

BONGSO, A.; LEE, E. H. Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. **Stem Cells: From Bench to Bedside**, p. 1, 2005.

BORTIN, M. M. A COMPENDIUM OF REPORTED HUMAN BONE MARROW TRANSPLANTS. **Transplantation**, v. 9, n. 6, p. 571-587, 1970.

BOULAIS, P. E.; FRENETTE, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. **Blood**, v. 125, n. 17, p. 2621-9, 2015.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Cria a Rede Nacional de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas (BrasilCord), e dá outras providências**. . Portaria nº. 2.381, de 29 de setembro de 2004. 2004.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.

CASTRECHINI, N. M. et al. Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche. **Placenta**, v. 31, n. 3, p. 203-12, 2010.

CHARRON, D.; PETERSDORF, E. CH 2 - The HLA system in hematopoietic stem cell transplantation. In: (Ed.). **Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. San Diego: Academic Press, 2013. p.19-38.

CHEN, C. S. 3D Biomimetic Cultures: The Next Platform for Cell Biology. **Trends Cell Biol**, v. 26, n. 11, p. 798-800, 2016.

CHHABRA, A. et al. Trophoblasts regulate the placental hematopoietic niche through PDGF-B signaling. **Developmental Cell**, v. 22, n. 3, p. 651-659, 2012.

CHOI, J. S.; MAHADIK, B. P.; HARLEY, B. A. Engineering the hematopoietic stem cell niche: Frontiers in biomaterial science. **Biotechnol J**, v. 10, n. 10, p. 1529-45, 2015.

CIMATTI, B. et al. Physical and mechanical characterization of a porous cement for metaphyseal bone repair. **Acta Ortop Bras**, v. 23, n. 4, p. 197-201, 2015.

CIRIZA, J. et al. The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: Lessons learned and possible clinical applications. **Experimental Hematology**, v. 41, n. 5, p. 411-423, 2013.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-13, 2006.

DALBY, M. J. et al. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1306-15, 2006.

DELANEY, C.; RATAJCZAK, M. Z.; LAUGHLIN, M. J. Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients. **Expert review of hematology**, v. 3, n. 3, p. 273-283, 2010.

DOYLE, A. D.; YAMADA, K. M. Mechanosensing via cell-matrix adhesions in 3D microenvironments. **Experimental Cell Research**, v. 343, n. 1, p. 60-66, 2016.

DRUMMOND-BARBOSA, D. Stem Cells, Their Niches and the Systemic Environment: An Aging Network. **Genetics**, v. 180, n. 4, p. 1787-1797, 2008.

DURGALAKSHMI, D.; BALAKUMAR, S. Analysis of solvent induced porous PMMA-Bioglass monoliths by the phase separation method--mechanical and in vitro biocompatible studies. **Phys Chem Chem Phys**, v. 17, n. 2, p. 1247-56, 2015.

DYGAI, A. M.; ZHDANOV, V. V. Mechanisms of Hematopoiesis Control. In: (Ed.). **Theory of Hematopoiesis Control**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p.1-13.

EBARA, M.; UTO, K. Stimuli-responsive polymeric substrates for cell-matrix mechanobiology. In: SIMMONS, C. A.; KIM, D.-H., *et al* (Ed.). **Integrative Mechanobiology: Micro- and Nano- Techniques in Cell Mechanobiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2015. p.186-202.

EVANGELATOV, A.; PANKOV, R. The Evolution of Three-Dimensional Cell Cultures Towards Unimpeded Regenerative Medicine and Tissue Engineering. In: ANDRADES, J. A. (Ed.). **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. Rijeka: InTech, 2013. p.Ch. 10.

FERRARO, F.; CELSO, C. L.; SCADDEN, D. Adult Stem Cells and Their Niches. In: MESHORER, E. e PLATH, K. (Ed.). **The Cell Biology of Stem Cells**. Boston, MA: Springer US, 2010. p.155-168.

FERREIRA, E. *et al*. Bone marrow transplantation in Brazil. **Hum Immunol**, v. 14, n. 3, p. 324-32, 1985.

FIERABRACCI, A. *et al*. How far are we from the clinical use of placental-derived mesenchymal stem cells? **Expert Opin Biol Ther**, v. 15, n. 5, p. 613-7, 2015.

FILHO, J. O. B. B.; OLIVEIRA, M. S. Placental Structure and Biological Aspects of Fetal Membranes Cultured in vitro. In: CECCHERINI-NELLI, L. e MATTEOLI, B. (Ed.). **Biomedical Tissue Culture**. Rijeka: InTech, 2012. p.Ch. 07.

FLORES-GUZMAN, P.; FERNANDEZ-SANCHEZ, V.; MAYANI, H. Concise review: ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. **Stem Cells Transl Med**, v. 2, n. 11, p. 830-8, 2013.

FRAZER, R. Q. et al. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. **J Long Term Eff Med Implants**, v. 15, n. 6, p. 629-39, 2005.

FUKUCHI, Y. et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v. 22, n. 5, p. 649-58, 2004.

GAO, J.-X.; ZHOU, Q. Cord Blood Stem Cell Expansion Ex Vivo: Current Status and Future Strategies. In: BHATTACHARYA, N. e STUBBLEFIELD, P. (Ed.). **Regenerative Medicine Using Pregnancy-Specific Biological Substances**. London: Springer London, 2011. p.255-269.

GAO, Q. et al. [Strategies to choose scaffold materials for tissue engineering]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 32, n. 2, p. 172-84, 2016.

GARGIONI, R. **Avaliação do nicho molecular de células-tronco hematopoéticas e mesenquimais em placenta humana: caracterização estrutural e ultraestrutural**. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular/Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

GEKAS, C. et al. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. **Dev Cell**, v. 8, n. 3, p. 365-75, 2005.

GEKAS, C. et al. Hematopoietic stem cell development in the placenta. **Int J Dev Biol**, v. 54, n. 6-7, p. 1089-98, 2010.

GLUCKMAN, E. 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. 1174-8, 1989.

GLUCKMAN, E. et al. Outcome of Cord-Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 6, p. 373-381, 1997.

GUO, B. et al. Functionalized scaffolds to enhance tissue regeneration. **Regenerative Biomaterials**, v. 2, n. 1, p. 47-57, 2015.

HAKKINEN, K. M. et al. Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices. **Tissue Engineering. Part A**, v. 17, n. 5-6, p. 713-724, 2011.

HAN, J.; MA, G.; NIE, J. A facile fabrication of porous PMMA as a potential bone substitute. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 7, p. 1278-1284, 2011.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 1, p. 12, 2011.

HATAKEYAMA, W. et al. Effects of apatite particle size in two apatite/collagen composites on the osteogenic differentiation profile of osteoblastic cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1255-1261, 2013.

HAYCOCK, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. **Methods Mol Biol**, v. 695, p. 1-15, 2011.

HE, Q. et al. Porous Surface Modified Bioactive Bone Cement for Enhanced Bone Bonding. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42525, 2012.

HECK, D. **Avaliação da associação células-tronco mesenquimais de placenta humana em biomateriais baseados em celulose bacteriana**. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular/Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

HEIKE, T.; NAKAHATA, T. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1592, n. 3, p. 313-321, 2002.

HENIG, I.; ZUCKERMAN, T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. **Rambam Maimonides Med J**, v. 5, n. 4, p. e0028, 2014.

HOFFMAN, C. M.; CALVI, L. M. Minireview: complexity of hematopoietic stem cell regulation in the bone marrow microenvironment. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 10, p. 1592-601, 2014.

HOLMES, P. F.; BOHRER, M.; KOHN, J. Exploration of polymethacrylate structure-property correlations: Advances towards combinatorial and high-throughput methods for biomaterials discovery. **Progress in polymer science**, v. 33, n. 8, p. 787-796, 2008.

HOROWITZ, M. M. Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation. In: (Ed.). **Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation**: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p.8-17.

HUI, P. Developmental biology of the placenta. In: (Ed.). **Gestational Trophoblastic Disease**: Springer, 2012. p.15-39.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, n. 3, p. 112-118, 2014.

KIM, J. et al. Synergistic effects of nanotopography and co-culture with endothelial cells on osteogenesis of mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 34, n. 30, p. 7257-7268, 2013.

KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 6, p. 746-756, 2015.

KRAUSE, M.; GAUTREAU, A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 9, p. 577-590, 2014.

KUMPEL, B. M.; MANOUSSAKA, M. S. Placental immunology and maternal alloimmune responses. **Vox Sang**, v. 102, n. 1, p. 2-12, 2012.

LANE, S. W.; WILLIAMS, D. A.; WATT, F. M. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 8, p. 795-803, 2014.

LEE, E. J.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Biomaterials for Tissue Engineering. **Annals of biomedical engineering**, v. 42, n. 2, p. 323-337, 2014.

LEE, L. K. et al. Placenta as a newly identified source of hematopoietic stem cells. **Curr Opin Hematol**, v. 17, n. 4, p. 313-8, 2010.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 605-31, 2005.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. 7, p. 1051-1064, 2007.

LOEFFLER, M.; ROEDER, I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. **Cells Tissues Organs**, v. 171, n. 1, p. 8-26, 2002.

LUAN, X. et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34+ cells: A comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 1, p. 32-38, 2013.

MALEK, A.; BERSINGER, N. A. Human placental stem cells: biomedical potential and clinical relevance. **J Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 75-92, 2011.

MALTEPE, E.; FISHER, S. J. Placenta: the forgotten organ. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 31, p. 523-52, 2015.

MANOCHANTR, S. et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. **Intern Med J**, v. 43, n. 4, p. 430-9, 2013.

MATTILA, P. K.; LAPPALAINEN, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 446-454, 2008.

MEHTA, R. S. et al. Engineering cord blood to improve engraftment after cord blood transplant. **Stem Cell Investig**, v. 4, p. 41, 2017.

MENG, X. et al. Stem cells in a three-dimensional scaffold environment. **Springerplus**, v. 3, p. 80, 2014.

MERCIER, F. E.; RAGU, C.; SCADDEN, D. T. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 1, p. 49-60, 2012.

MIGLIACCIO, A. R. et al. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2717-2722, 2000.

MIKKOLA, H. K.; ORKIN, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. **Development**, v. 133, n. 19, p. 3733-44, 2006.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **The Developing Human E-Book: Clinically Oriented Embryology**. Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN 9780323313483.



MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327-334, 2014.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327-34, 2014.

MURPHY, W. L. et al. Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. **Tissue Eng**, v. 8, n. 1, p. 43-52, 2002.

NASSAR, D.; BLANPAIN, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. **Annu Rev Pathol**, v. 11, p. 47-76, 2016.

NOMBELA-ARRIETA, C.; MANZ, M. G. Quantification and three-dimensional microanatomical organization of the bone marrow. **Blood Advances**, v. 1, n. 6, p. 407-416, 2017.

OFTADEH, R. et al. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 137, n. 1, p. 0108021-01080215, 2015.

OLIVEIRA, M. S.; BARRETO-FILHO, J. B. Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and challenges. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 4, p. 769-775, 2015.

OTTERSBAACH, K.; DZIERZAK, E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. **Dev Cell**, v. 8, n. 3, p. 377-87, 2005.

PAPADIMITROPOULOS, A. et al. Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells from Fresh Bone Marrow in a 3D Scaffold-Based System under Direct Perfusion. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102359, 2014.

PAPPA, K. I.; ANAGNOU, N. P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? **Regen Med**, v. 4, n. 3, p. 423-33, 2009.

PARK, M.; SEO, J. J. Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Bone Marrow Research**, v. 2012, p. 7, 2012.

PARKINSON, I. H.; FAZZALARI, N. L. Characterisation of Trabecular Bone Structure. In: SILVA, M. J. (Ed.). **Skeletal Aging and Osteoporosis:**

**Biomechanics and Mechanobiology.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.31-51.

PAROLINI, O. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300-11, 2008.

PAROLINI, O. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, 2008.

PINEAULT, N.; ABU-KHADER, A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. **Exp Hematol**, v. 43, n. 7, p. 498-513, 2015.

POTTEN, C. S.; LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. **Development**, v. 110, n. 4, p. 1001-1020, 1990.

RAIMONDO, S. et al. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. **Journal of Anatomy**, v. 208, n. 1, p. 3-12, 2006.

REZZA, A.; SENNETT, R.; RENDL, M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. **Curr Top Dev Biol**, v. 107, p. 333-72, 2014.

RHODES, K. E. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 3, p. 252-63, 2008.

RIZZO, S. et al. Molecular Imaging of Stems Cells: In Vivo Tracking and Clinical Translation. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 1783841, 2017.

ROBIN, C. et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 4, p. 385-95, 2009.

ROCHA, V.; BROXMEYER, H. E. New Approaches for Improving Engraftment after Cord Blood Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 16, n. 1, Supplement, p. S126-S132, 2010.

RUDOLPH, R. H. et al. Canine mixed leukocyte reactivity and transplantation antigens. **Transplantation**, v. 8, n. 2, p. 141-6, 1969.

SCADDEN, D. T. Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 41-50, 2014.

SHAO, Y.; FU, J. Integrated Micro/nanoengineered Functional Biomaterials for Cell Mechanics and Mechanobiology: A Materials Perspective. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 26, n. 10, p. 1494-1533, 2014.

SILVA, D. A. D. **Avaliação da expressão de genes neph em células-tronco mesenquimais da placenta humana**. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular/Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

STABA KELLY, S. et al. Overcoming the barriers to umbilical cord blood transplantation. **Cytotherapy**, v. 12, n. 2, p. 121-130, 2010.

STICKLER, M.; RHEIN, T. Polymethacrylates. In: (Ed.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.

SUBIA, B.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. **Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications**. INTECH Open Access Publisher, 2010. ISBN 9789533070797.

TAKAGI, M. Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. **J Biosci Bioeng**, v. 99, n. 3, p. 189-96, 2005.

TALWADEKAR, M. D.; KALE, V. P.; LIMAYE, L. S. Placenta-derived mesenchymal stem cells possess better immunoregulatory properties compared to their cord-derived counterparts—a paired sample study. **Scientific Reports**, v. 5, p. 15784, 2015.

TAN, Q. et al. Fabrication of porous scaffolds with a controllable microstructure and mechanical properties by porogen fusion technique. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 2, p. 890-904, 2011.

THOMAS, E. D. et al. Cure of leukemia by marrow transplantation. **Leukemia Research**, v. 1, n. 1, p. 67-70, 1977.

TOJKANDER, S.; GATEVA, G.; LAPPALAINEN, P. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 8, p. 1855-1864, 2012.

TRAVLOS, G. S. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 548-565, 2006.

TURNER, L.-A.; J. DALBY, M. Nanotopography - potential relevance in the stem cell niche. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 11, p. 1574-1594, 2014.

ULRICH, D.; MURALITHARAN, R.; GARGETT, C. **Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies**. 2013.

UNAL, M. et al. **Micro and Nano-Scale Technologies for Cell Mechanics**. 2014.

VAIDYA, A.; KALE, V. Hematopoietic Stem Cells, Their Niche, and the Concept of Co-Culture Systems: A Critical Review. **J Stem Cells**, v. 10, n. 1, p. 13-31, 2015.

VENTURA FERREIRA, M. S. et al. An engineered multicomponent bone marrow niche for the recapitulation of hematopoiesis at ectopic transplantation sites. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 9, n. 1, p. 4, 2016.

WANG, J. H.; THAMPATTY, B. P. An introductory review of cell mechanobiology. **Biomech Model Mechanobiol**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2006.

WANG, Y.; ZHAO, S. **Vascular Biology of the Placenta**. Morgan & Claypool, 2010. ISBN 9781615040452.

WILLERTH, S. M.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. In: (Ed.). **StemBook**. Cambridge (MA), 2008.

WU, Y. et al. The Combined Effect of Substrate Stiffness and Surface Topography on Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Eng Part A**, v. 23, n. 1-2, p. 43-54, 2017.

XIE, J.; ZHANG, C. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 839-853, 2015.

YANG, Y., CUNHA-REIS, C., BAGNANINCHI, P. O., AYDIN H. M. Control and Monitoring of Scaffold Architecture for Tissue Engineering. In: PAUL K. CHU, X. L. (Ed.). **Biomaterials Fabrication and Processing Handbook**: CRC Press, 2008. p.69 - 94.

YU, H. et al. Effect of porosity and pore size on microstructures and mechanical properties of poly-epsilon-caprolactone- hydroxyapatite composites. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 86, n. 2, p. 541-7, 2008.

YU, V. W.; SCADDEN, D. T. Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. **Curr Top Dev Biol**, v. 118, p. 21-44, 2016.

ZHONG, Z. N. et al. Potential of placenta-derived mesenchymal stem cells as seed cells for bone tissue engineering: preliminary study of osteoblastic differentiation and immunogenicity. **Orthopedics**, v. 35, n. 9, p. 779-88, 2012.



**ANEXO A - TCLE: Coleta das amostras de placenta humana para isolamento das CTMs**



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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** “Expansão *ex vivo* de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas do sangue de cordão umbilical em sistemas de co-cultura tridimensional com células-tronco mesenquimais”

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

**Pesquisador (es) participante (s):** Aloisio Luiz Benedetti, Marcio Ferreira Dutra, Carolina Poluceno Silva, Günther Gerhard Gerent, Meice Alexandre Mantovani e Rodrigo Pérez Lucas

**Telefones para contato:** (48) 3721-4742 ou 3721-5155

CEP UFSC: Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401, Prédio Reitoria II-Trindade-Florianópolis-SC Fone:3721-6094

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Engenharia de nicho hematopoiético: avaliação de um sistema de cultura tridimensional de células-tronco mesenquimais da placenta humana em arcabouços de poli(metacrilato de metila) (PMMA)”, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva. A seguir, serão lhe apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida, o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Célula-tronco e

Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37214742.

## **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Este estudo tem por objetivo desenvolver um sistema de cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da placenta humana sobre uma estrutura de poli(metacrilato de metila (PMMA) para possível utilização em co-cultura com células-tronco progenitoras hematopoiéticas (CTPHs). As CTMs são comumente obtidas da medula óssea, mas também podem ser obtidas de diversos outros tecidos, como tecido adiposo, polpa dentária e da placenta. Essa última apresenta a vantagem de ser um material que é descartado após o parto, de fácil obtenção, abundante e que não envolve riscos para o doador. Além disso, as CTMs da placenta apresentam características de reduzida imunogenicidade e potencialidade equivalentes às CTMs de medula óssea. Neste projeto, estamos interessados em desenvolver um sistema de co-cultura que possa ser utilizado para estimular a proliferação/multiplicação das CTPHs utilizando CTMs derivadas da placenta humana cultivadas em estruturas tridimensionais que mimetizam o ambiente natural destas células. Vários estudos demonstraram que as CTMs são células auxiliares importantes no suporte das CTPHs.

Para o objetivo deste trabalho, após o parto e dequitação/expulsão da placenta, serão coletados fragmentos da mesma, transportados para o laboratório e processados para isolamento das CTMs. As CTMs serão mantidas em cultura ou congeladas até a utilização nos experimentos.

Se a Senhora estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a coleta da placenta, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade em todas as etapas da pesquisa. Também garantimos que não haverá qualquer custo e, se houver algum prejuízo decorrente da pesquisa, asseguramos-lhes a indenização dos mesmos. Uma vez que a coleta será após a expulsão da placenta, não há riscos decorrentes da mesma para a Sra. Os riscos envolvidos dizem respeito ao sigilo dos dados e no manuseio do prontuário para verificar se a Sra. atende aos critérios para ser uma doadora da placenta. Para minimizar tanto quanto possível os mesmos, serão tomados todos os cuidados referentes à manutenção do sigilo como, a identificação apenas numérica dos indivíduos participantes assim quanto ao cuidado e manuseio do prontuário o qual será realizado exclusivamente por um dos pesquisadores e no local guarda habitual do mesmo. Também asseguramos-lhes que o material coletado será utilizado exclusivamente



para os fins desta pesquisa, com o qual os pesquisadores comprometem-se a trabalhar cumprindo o previsto na Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012, do CNS. A Sra. tem plena liberdade de recusar-se a participar desta pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da mesma, sem penalização alguma. Para isso, pode entrar em contato através dos telefones citados acima. A Sra. receberá uma via deste TCLE, devidamente assinada pelos pesquisadores.

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

Assinatura do pesquisador:

### **CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Expansão *ex vivo* de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas do sangue de cordão umbilical em sistemas de co-cultura tridimensional com células-tronco mesenquimais”, e concordo em participar do estudo, como voluntário.

**Assinatura do paciente ou responsável:**

\_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_  
Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.



## ANEXO B - Sobre os critérios de inclusão e exclusão



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

#### **SOBRE OS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PACIENTES DOADORES DE PLACENTA E CORDÃO UMBILICAL**

**Título do Projeto:** “Expansão *ex vivo* de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas do sangue de cordão umbilical em sistemas de co-cultura tridimensional com células-tronco mesenquimais”

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

**Pesquisador (es) participante (s):** Aloisio Luiz Benedetti, Marcio Ferreira Dutra, Günther Gerhard Gerent, Meice Alexandre Mantovani e Rodrigo Pérez Lucas

**Telefones para contato:** (48) 3721-4742 ou 3721-5155

#### **Crítérios de inclusão:**

I - Idade materna acima de 18 (dezoito) anos e que tenha se submetido há, no mínimo, duas consultas pré-natais documentadas.

II – Idade gestacional igual ou superior a 35 (trinta e cinco) semanas;

III – Bolsa rota há menos de 18 (dezoito) horas;

IV – Trabalho de parto sem anormalidade; e

V – Ausência de processo infeccioso e ou doença durante a gestação que possa (m) interferir na vitalidade placentária.

**CrITÉrios de exclusão:**

I – Sofrimento fetal grave;

II – Feto com anormalidade congênita;

III – Temperatura materna igual ou superior a 38°C durante o trabalho de parto;

IV – Gestante com situação de risco acrescido para infecções transmissíveis pelo sangue;

V – Presença de processo infeccioso e/ou doença durante o trabalho de parto, que possa (m) interferir na vitalidade placentária;

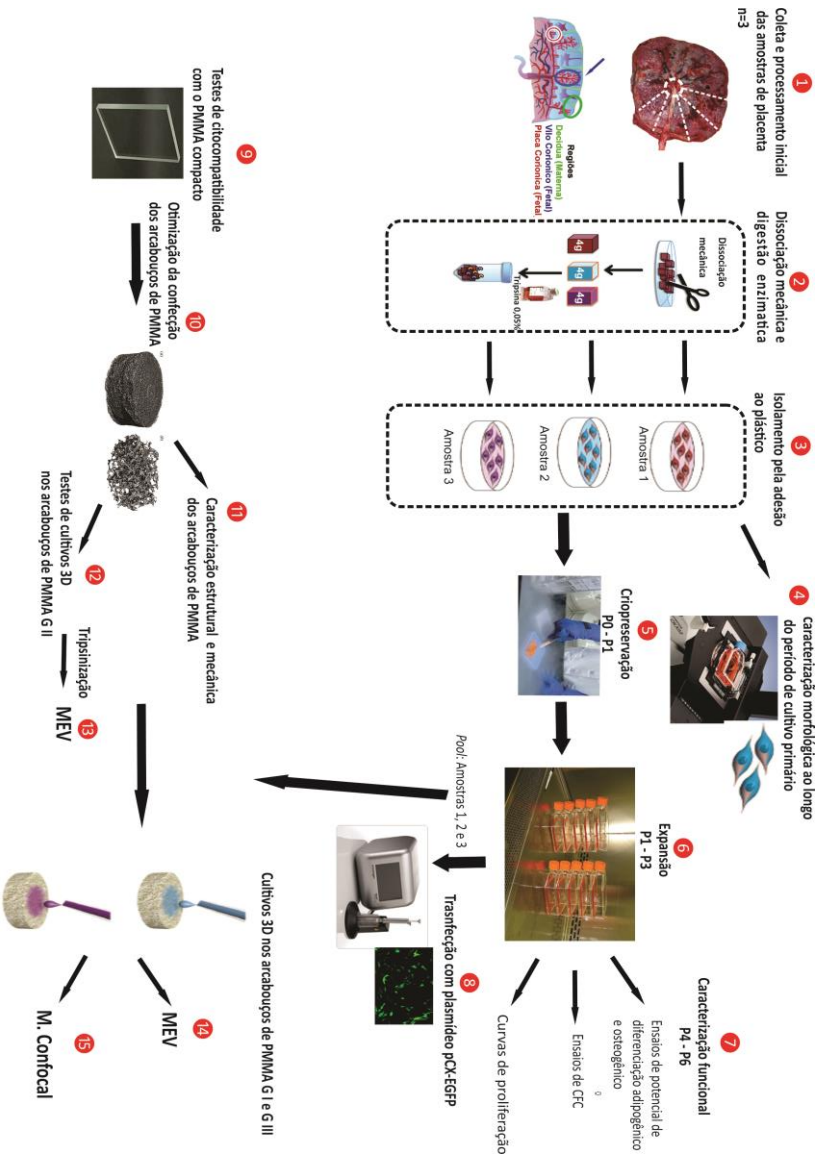
VII – Gestante em uso de hormônios ou drogas que se depositam nos tecidos;

VIII – Gestante com história pessoal de doença sistêmica auto-imune ou de neoplasia; ou

IX – Gestante e seus familiares, pais biológicos e seus familiares ou irmãos biológicos do recém-nascido com história de doenças hereditárias do sistema hematopoiético, tais como, talassemia, deficiências enzimáticas, esferocitose, eliptocitose, anemia de Fanconi, porfíria, plaquetopatias, neutropenia crônica ou outras doenças de neutrófilos, bem como com história de doença granulomatosa crônica, imunodeficiência, doenças metabólicas ou outras doenças genéticas.

Esses aspectos serão buscados na entrevista, após TCLE e no prontuário da paciente.

## ANEXO C - Desenho experimental





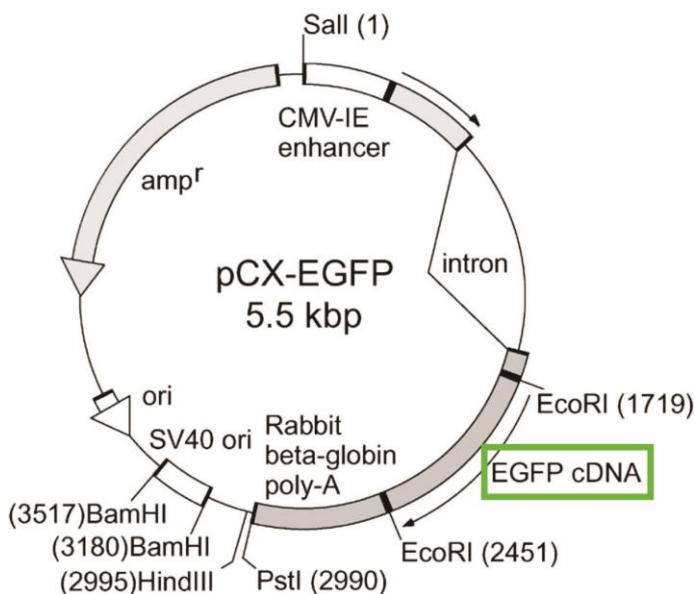
## ANEXO D – Transfecção das CTMs-PH com plasmídeo pCX-EGFP mediante eletroporação

O laboratório de Células-tronco e bioengenharia vem padronizando um conjunto de métodos e técnicas laboratoriais que constituem proveitosas ferramentas na avaliação de diferentes aspectos da biologia e do comportamento das CTMs-PH.

Sendo assim, neste trabalho, foi utilizada a técnica de eletroporação, a qual permite a incorporação de material genético, proteínas ou outras moléculas bioativas nas células mediante a formação de poros na membrana plasmática provocados por pulsos de correntes elétricas no meio de suspensão das células.

Para a realização das transfecções das CTMs-PH, foi utilizado o sistema comercial de eletroporação Neon<sup>®</sup> Transfection System (Invitrogen) e o plasmídeo pCX-EGFP que tem um inserto do gene que codifica a Proteína Verde Fluorescente (GFP, do inglês; *green fluorescent protein*), como observado na Figura 29. Esse vetor genético foi, gentilmente, doado ao laboratório pelo Dr. Masaru Okabe da Universidade de Osaka, Japão.

**Figura 29: Mapa gênico da plasmídeo pCX-EGFP.**



Uma observação de maior importância é que esse plasmídeo não sofre nenhum tipo de recombinação no genoma do hospedeiro, sem causar, portanto, modificação genética. Sendo assim, não caracteriza a produção de um organismo geneticamente modificado (OGM), de acordo com o previsto na Lei Nº 11.105, de 24 de março de 2005.

Ao serem transfectadas com esse plasmídeo, as células começam a expressar o gene e sintetizar a GFP, o que permite sua observação mediante o uso da microscopia de fluorescência.

Todavia, dois protocolos de eletroporação foram comparados para verificar a eficiência relativa de transfecção: Protocolo A (SILVA, 2012); 1400 V com um pulso de 20 ms e, Protocolo B; 990 V com um pulso de 40 ms (Invitrogen<sup>12</sup>), como detalhado na tabela 3.

A concentração de células utilizadas foi de  $5 \times 10^4$  células por reação, seguindo as recomendações do fabricante.

Ainda, foram utilizadas duas concentrações de DNA plasmídico: 1 µg e 2 µg por reação.

Todos os experimentos foram realizados com ponteiras de 10µL, em triplicata.

**Tabela 8: Protocolos de eletroporação e condições experimentais de transfecção.**

Protocolo	Condição experimental Células/DNA
<i>A: 1400 V, um pulso de 20 ms;</i>	$5 \times 10^4 / 1 \mu\text{g}$
<i>B: 990 V, um pulso de 40 ms</i>	$5 \times 10^4 / 2 \mu\text{g}$

Assim, seguindo as instruções do fabricante, as CTMs-PH cultivadas em garrafas e em confluência de 80-90% foram lavadas uma vez com PBS e tripsinizadas com 2 mL Tripsina-EDTA 0,05% durante 2 minutos mantidas na estufa de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células em suspensão foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugadas a 400 x G durante 5 minutos. Logo, o sobrenadante foi removido, e as células foram novamente suspensas em 2 mL de PBS e contadas em câmara Neubauer. A quantidade total de células necessárias foi calculada segundo a quantidade total reações estipuladas. Da mesma maneira, foi calculado o volume total de DNA plasmídico necessário em cada configuração experimental.

<sup>12</sup> Protocolo acessado em 2016 e disponível no link [Invitrogen](#)



Assim, o volume correspondente de células em suspensão foi colocado em tubos *eppendorfs* de 2 mL e centrifugados a 400 x G durante 4 minutos.

O sobrenadante foi removido, e o *pellet* suspenso em tampão de ressuspensão<sup>13</sup>, o DNA foi adicionado, e a suspensão, homogeneizada.

Finalmente, 10 µL dessa solução foram aspiradas com a ponteira de volume especificada e submetidas ao pulso elétrico para cada protocolo específico. As células tratadas em cada reação foram semeadas em um poço (de uma placa de 24 poços) contendo 500 µL de MdC sem antibiótico que previamente tinha sido mantida na estufa de CO<sub>2</sub>.

Uma vez que todas as reações de eletroporação foram concluídas, a placa com as culturas foi mantida na estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Após 24 h de incubação, o meio foi trocado por MdC com antibióticos, e as taxas de transfecção, dos diferentes protocolos, foram analisadas com microscópio Olympus IX71 com sistema de fluorescência utilizando filtro de verde (Excitação de 460 a 490 nm, e Emissão de 520 nm). A fluorescência foi quantificada em programa informático Fiji (ImageJ) a partir de 5 campos de um total de 6 fotomicrografias por experimento.

Além disso, também foi avaliada a intensidade relativa da fluorescência após 7 dias em cultivo.

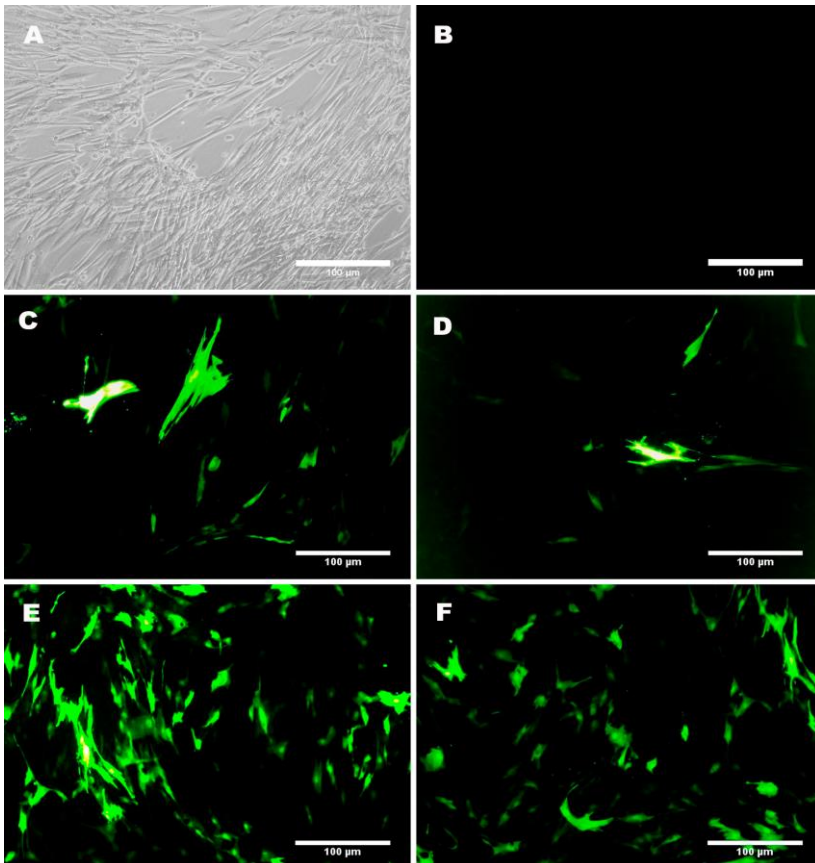
O critério utilizado para determinar o protocolo de maior rendimento foi a eficiência da transfecção quantificada pela intensidade da fluorescência nas primeiras 24 h.

---

<sup>13</sup> O volume de tampão de ressuspensão foi calculado da seguinte maneira: (10µl x quantidade total de reações estipuladas com cada protocolo específico) – (volume de total DNA calculado segundo a concentração).

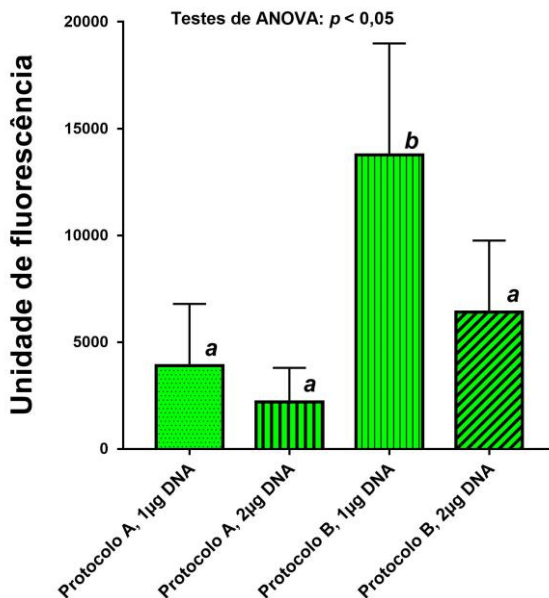
**Figura 30: Fluorescência das CTMs-PH transfectadas com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando os protocolos A e B.**

A) Controle 1, células sem DNA. B) Controle 2, células com DNA. C e D) Fotomicrografia de fluorescência dos experimentos utilizando o protocolo A, com concentração de 1 e 2  $\mu\text{g}$  de DNA, respectivamente, aumento de 400X. E e F) Fotomicrografia de fluorescência dos experimentos utilizando o protocolo B e concentração de 1 e 2  $\mu\text{g}$  de DNA respectivamente, aumento de 400X.



**Figura 31: Fluorescência das CTMs-PH transfectadas com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando os protocolos A e B.**

Gráfico comparativo em formato de coluna da fluorescência como medida da eficiência de transfecção entre os protocolos A e B. Neste gráfico, *a* é estatisticamente diferente de *b*.



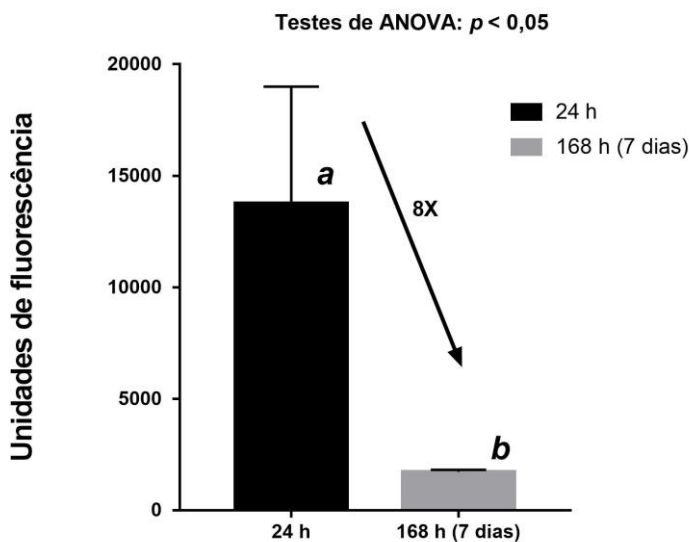
**Tabela 9: Análise estatística da fluorescência das CTMs-PH transfectadas com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando os protocolos A e B.**

		Unidades e fluorescência			
		Protocolo A		Protocolo B	
		1 µg de DNA	2 µg de DNA	1 µg de DNA	2 µg de DNA
Média e desvio padrão		3898 ± 2892	2201 ± 1598	13758 ± 5235	6403 ± 3355
	Teste de ANOVA	F <sub>(3,23)</sub> = 10,48; Valor de p = 0,0005 (p > 0,05)			

Após assumir que os melhores resultados quanto à eficiência da transfecção das CTMs-PH com o plasmídeo pCX-EGFP é obtido com protocolo B com 1 µg de DNA, foram realizados ensaios utilizando essas condições para avaliar a fluorescência das células após 168 h (7 dias) em cultivo, como analisados na figura 18 e tabela 8.

**Figura 32: Fluorescência das CTMs-PH transfectadas com plasmídeo pCX-EGFP após 24h e 168 h (7 dias) em cultivo.**

Gráfico comparativo em formato de coluna da fluorescência das CTMs-PH submetidas à transfecção com plasmídeo pCX-EGFP mediante eletroporação utilizando o protocolo B com de 1 µg de DNA, após 24 h e 168 h (7 dias) em cultivo. Neste gráfico, *a* é estatisticamente diferente de *b*.



**Tabela 10: Análise estatística da fluorescência das CTMs-PH transfectadas com plasmídeo pCX-EGFP após 24h e 168 h (7 dias) em cultivo**

	Fluorescência	
	24 h	Após 168 h (7 dias)
<i>Media e desvio padrão</i>	13758 ± 5235	1720 ± 87,15
<i>Teste t</i>	t=3,856 Valor de p= 0,0084 (p<0,05)	
<i>Fator da redução da fluorescência</i>	8 vezes	