



**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADAS À MEMBRANA
CELULÓSICA BACTERIANA: ENSAIO PRÉ-CLÍNICO NA REPARAÇÃO DE
RUPTURA DE TENDÃO CALCÂNEO EM COELHOS**

MARCELLO DE ALENCAR SILVA

TERESINA-PI

2017

Marcello de Alencar Silva

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADAS À MEMBRANA
CELULÓSICA BACTERIANA: ENSAIO PRÉ-CLÍNICO NA REPARAÇÃO DE
RUPTURA DE TENDÃO CALCÂNEO EM COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia - RENORBIO como requisito
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maria Acelina Martins
de Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Ângela Faustino
Jozala

Teresina-PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S586c Silva, Marcello de Alencar.
Células-tronco mesenquimais associadas à membrana celulósica bacteriana : ensaio pré-clínico na reparação de ruptura de tendão calcâneo em coelhos / Marcello de Alencar Silva. -- 2017.
73 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Teresina, 2017.
“Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Maria Acelina Martins de Carvalho.”
“Coorientação: Prof^ª. Dr^ª. Ângela Faustino Jozala.”

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Engenharia tecidual. 3. Celulose.
I. Título.

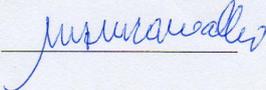
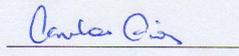
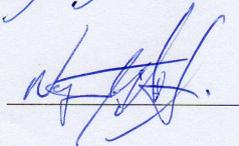
CDD 616.75

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Marcello de Alencar Silva

TÍTULO DO PROJETO: “Células-Tronco Mesenquimais Associadas à Membrana Celulósica Bacteriana: Ensaio Pré-Clinico na Reparação de Ruptura de Tendão Calcâneo em Coelhos.”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Carla Eiras - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto – UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Prof. Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa - UEMA (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 26 de setembro de 2017.

HORÁRIO: 14h

LOCAL: Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco -
NUPCelt/UFPI

Dedico

*Aos meus pais, **Antonio Leite e Conceição Alencar**, melhores amigos e eternos incentivadores dos meus projetos de vida.*

*As minhas irmãs, **Nádia e Natália**, por juntas representarem em minha vida o modelo de lealdade, amizade, caráter e amor infinito.*

*A minha sobrinha, **Maria Fernanda**, que ao me ver atarefado e concentrado na redação da tese, sempre deixava tudo mais sereno ao demonstrar o seu amor dizendo que me ama mais que mil galáxias e todos os grãos de areia do mundo!*

*Aos amigos **Acácia, Jean e Kelly**, por entrarem na minha vida no momento certo, e por se tornarem fontes de incentivos constantes.*

*A minha namorada **Layanna**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pois ao seu lado minha conquista tem um significado maior.*

*Aos meus alunos, **sem distinção**, por toda confiança depositada e motivação que recebi durante esta jornada.*

*Aos meus **pacientes**, pela compreensão em todas as vezes que necessitei me ausentar em decorrência das demandas do doutorado.*

Muitíssimo obrigado! Vocês foram minha fortaleza para a elaboração deste trabalho!

Agradecimentos especiais

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho, que me encorajou a olhar para além do horizonte, mostrando através do próprio exemplo de vida e atuação, as trilhas mais seguras para alcançar os resultados do trabalho almejado. Por mostrar-me que nossas conquistas são frutos de esforços diários, e que a garra e a determinação dimensionam os nossos sonhos.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Angela Faustino Jozala, por contribuir na produção da membrana celulósica bacteriana utilizada neste estudo e por me ajudar nos esclarecimentos necessários sobre este biomaterial.

Aos professores Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa e Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto, pelos conhecimentos repassados sobre cultivo celular e acompanhamento em diversas etapas desta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos e respeito.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por dar sentido, força e orientação a esta realização e por colocar as pessoas certas no meu caminho.

A Universidade Federal do Piauí e a Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, pela oportunidade de realizar este curso de Doutorado.

Ao Coordenador do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO – Ponto Focal Piauí, Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Junior.

Ao Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) por permitir nas suas dependências o desenvolvimento deste trabalho.

A Faculdade Integral Diferencial – FACID pelo afastamento das minhas atividades docentes e de coordenação de curso sempre que necessário para atender as demandas do Doutorado. Em especial à Diretora Geral Profa. Maria Joseci Lima Cavalcante Vale e Coordenadora Geral de Graduação Profa. Nívea Maria Ribeiro Rocha.

Ao Prof. Dr. Fernando Aecio de Amorim Carvalho por disponibilizar o Laboratório de Atividade Antileishmania - LAA para os ensaios de MTT, atividade fagocítica e expressão de óxido nítrico.

A Profa. Márcia Rizzo por me acolher tão generosamente no departamento de Histologia – UFPI, e por todas as manhãs que estivemos juntos discutindo as lâminas histopatológicas do trabalho, além de colocar a sua equipe à disposição.

Aos Professores Drs. Luiz de Sousa Santos Júnior, Bartolomeu Cruz Viana Neto e técnico Edgar, pelo apoio nas análises realizadas através do microscópio eletrônico de varredura do Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada – LMMA – UFPI.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO pelos conhecimentos e experiências repassadas.

Aos Pós graduandos do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) por contribuírem com seus conhecimentos específicos: Gustavo, Cristiano Jackson, Yulla Klinger, Camila Ernanda, Patrícia, Dayseane Bezerra, Elis Regina, Huanna Waleska.

A Dra. Lucilene dos Santos Silva, Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa, Dra. Mirna Luciano de Gois da Silva, Dra. Andressa Almeida Santana Dias, Dra. Andressa Rego da Rocha, Mariá Andrade de Carvalho Rocha, por ajudarem em etapas cruciais desta pesquisa.

*A minha ex-aluna Patrícia Regina Sousa, pela dedicação, auxílio e critério na tradução dos artigos enviados aos periódicos **PEER J** e **Cell & Tissue Research**.*

Ao Médico Veterinário Herminio José da Rocha Neto pela condução dos procedimentos cirúrgicos desta pesquisa.

As funcionárias do Programa de Pós Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO - Ponto focal Piauí: Deusilene e Eliane.

As Funcionárias do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt): Fabiana Mousinho, Janete, Flávia e Maria do Carmo.

Mensagem

“Mude.

*Mas comece devagar, porque a direção
é mais importante que a velocidade.*

*Mude de caminho, ande por outras ruas,
observando os lugares por onde você passa.*

Veja o mundo de outras perspectivas.

Descubra novos horizontes.

Não faça do hábito um estilo de vida.

Ame a novidade.

Tente o novo todo dia.

*O novo lado, o novo método, o novo sabor,
o novo jeito, o novo prazer, o novo amor...*

Mude.

Dê uma chance ao inesperado.

Abrace a gostosura da Surpresa.

Sonhe só o sonho certo e realize-o todo dia.

Lembre-se de que a Vida é uma só...

Abra seu coração de dentro para fora.

Se você não encontrar razões para ser livre, invente-as.

Exagere na criatividade.

*E aproveite para fazer uma viagem longa,
se possível sem destino.*

Experimente coisas diferentes, troque novamente.

Mude, de novo.

Experimente outra vez.

*Você conhecerá coisas melhores e coisas piores,
mas não é isso o que importa.*

*O mais importante é a mudança,
o movimento, a energia, o entusiasmo.*

Só o que está morto não muda!”

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	09
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Lesões tendíneas.....	17
2.2 Biotecnologia na engenharia de tecidos	17
2.2.1 <i>Celulose bacteriana</i>	18
2.2.2 <i>Toxicidade de biomateriais</i>	20
2.2.3 <i>Respostas inflamatórias a biocompósitos</i>	20
2.3 Células-tronco	21
2.3.1 Células-tronco mesenquimais de medula óssea	21
3 CAPÍTULO I	23
Biocompatibilidade de células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelhos associadas à membrana celulósica bacteriana.....	24
4 CAPÍTULO II	50
Ensaio pré-clínico para reparação de ruptura do tendão calcâneo em coelhos utilizando células-tronco mesenquimais associadas à membrana celulósica bacteriana.....	51
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS	67
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE A	72
APÊNDICE B	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	Celulose bacteriana
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CTMMO	Células-tronco mesenquimais de medula óssea
CTM	Células-tronco mesenquimais
D-MEM	Meio de cultivo - Dulbecco's Modified Eagle Medium
HLA	Human leukocyte antigen
iPSCs	Células-tronco pluripotentes induzidas
LPS	Lipopolissacarídeo
MCB	Membrana celulósica bacteriana
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Medula óssea
MTT	Tetrazólio de 3 - (4,5 - dimetiltiazol -2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo
NO	Óxido Nítrico
PA	Paraformolaldeído
PBS	Solução tampão fosfato de sódio
RPMI 1640	Meio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)
Qtracker [®] 525	Nanocristais fluorescentes
SFB	Soro fetal bovino
TSC	Célula tronco progenitora do tendão
UFC-F	Unidade formadora de colônia fibroblastóide

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Fotomicrografia do cultivo e expansão das CTMMO: (A) células de coelho recém isoladas da medula óssea em placa de 12 poços (objetiva 4x, barra: 50µm) (B) células em processo de adesão no quinto dia de cultivo celular realizado em placa de 12 poços (objetiva 20x, barra: 25µm), (C) células dispostas paralelamente em formato fibroblastóide com confluência de 80% no décimo dia de cultivo celular em placa de 12 poços (objetiva 10x, barra: 50µm), (D) e (E) processo de adesão e expansão citoplasmática com confluência de 80% em garrafa de 25cm² após tripsinização e 15º dia de cultivo celular (objetiva 10x, barra: 50µm), (F) células com morfologia fibroblastóide dispostas paralelamente e em colônias com 80% de confluência em garrafa de 25cm² após tripsinização e 20º dia de cultivo celular (objetiva 10x, barra: 50µm).....33
- Figura 2.** Curva de crescimento em duplicata de células-tronco derivadas da medula óssea de coelho durante 15 dias após descongelamento cultivadas na concentração 1x10⁴cel/mL. As fases em evidência: LAG (1º ao 4º dia), LOG (5º ao 11º dia) e declínio da cultura (12º ao 15º dia).....34
- Figura 3.** Ensaio de UFC-F na placa de 24 poços: fotomicrografia de colônias de CTMMO coradas com Giemsa, após dois dias de cultivo celular confluência de 80% e colônias com mais de 30 células por campo (objetiva 20x, barra: 25 µm).....34
- Figura 4.** Fotomicrografias apresentando a diferenciação de CTMMO: (A) diferenciação condrogênica de CTMMO (objetiva 20x, barra: 25 µm), (B) controle negativo para diferenciação condrogênica por 14 dias (objetiva 10x barra: 25 µm).....35
- Figura 5.** Fotomicrografias apresentando a diferenciação de CTMMO: (A) diferenciação osteogênica de CTMMO mostrando deposição rica em cálcio na matriz extracelular (objetiva 10x, barra: 25µm), (B) controle negativo para diferenciação osteogênica por 21 dias (objetiva 10x, barra: 25µm).....36
- Figura 6.** Fotomicrografia apresentando a diferenciação adipogênica de CTMMO mostrando vacúolos lipídicos presentes no citoplasma corados em vermelho intenso com Oil Red (objetiva 40x, barra: 25µm).....36
- Figura 7.** Fotomicrografia de CTMMO aderidas na membrana celulósica bacteriana: (A) adesão de CTMMO após em sete dias de cultivo celular, destaque para o início da formação da UFC-F sobre a MCB (objetiva 20x, barra: 25µm), (B) colônias de CTMMO com 14 dias de cultivo celular (objetiva 10x, barra: 50µm).....37

Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando ancoragem das CTMMO à membrana celulósica bacteriana: (A) e (B) análise após 24 horas de cultivo celular, aumento de 10.000x e 20.000x respectivamente, (C) e (D) com sete dias de cultivo, aumento 10.000x e 15.000x respectivamente, (E) e (F) após 14 dias de cultivo celular, 40.000x e 16.000x respectivamente.....38

Figura 9. Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos na presença da membrana celulósica bacteriana. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata (controle: média 0.28567, desvio padrão 0.03161; MCB: média 0.36100, desvio padrão 0.03474). ABS – Absorbância, C – Controle e MCB – Membrana celulósica bacteriana, $*p < 0,05$40

Figura 10. Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados na presença da membrana celulósica bacteriana. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata (controle: média 100.0000, desvio padrão 0.0000, LPS: média 150.8889, desvio padrão 1.0541; MCB: média 109.6300, desvio padrão 11.0047). Teste T-Student realizado para comparação entre grupos com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo $*p < 0,05$. C – Controle, LPS – Lipopolissacarídeo e MCB – Membrana celulósica bacteriana.....39

Figura 11. Cristais de Formazan na Membrana celulósica bacteriana cultivada com A) Células-tronco mesenquimais de medula óssea B) Macrófagos peritoneais. Visualização em aumento 40x.....39

Figura 12. Efeito da membrana celulósica bacteriana sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais de medula óssea e macrófagos peritoneais de mamíferos. A) Viabilidade de células-tronco mesenquimais em membrana celulósica bacteriana (controle: média 100.0000, desvio padrão 0.0000, MCB: média 94.4533, desvio padrão 1.1926); B) Viabilidade de Macrófagos murinos em membrana celulósica bacteriana (controle: média 100.0000, desvio padrão 0.0000, MCB: média 97.7867, desvio padrão 3.3200). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Teste T-Student realizado para comparar os grupos com o controle (DMSO 0,2 % em meio DMEM/RPMI) sendo $*p < 0,05$. C – Controle e MCB – Membrana celulósica bacteriana.....40

CAPÍTULO II

Figura 1. Ultrassonografias dos tendões calcâneos de coelhos em processo de reparação pós ruptura parcial ($3,5\text{mm} \pm 0,05$), animais controle (C), tratamento com enxerto de MCB (T1), infusão de CTMMO (T2) e associação da MCB com CTMMO (T3), (a) visão longitudinal da falha tendínea induzida logo após lesão, (b) área hipoecóica e edema após 10 dias, (c) área hipoecóica e aumento do edema tendíneo após 30 dias, (d) área da falha tendínea associada a enxerto de MCB, (e) edema e área hipoecóica após 10 dias da falha, (f) redução do edema e da área hipoecóica após 30 dias da falha tendínea, (g) área hipoanecóica representando falha tendínea induzida logo após procedimento de infusão de CTMMO, (h) imagem sugestiva do início do preenchimento e recuperação da falha tendínea após 10 dias da infusão de CTMMO, (i) limites tendíneos mostram recuperação total após o 30º dia da terapia celular, (j) descontinuidade tendínea com área hipoanecóica logo após infusão de CTMMO e enxerto de MCB (l) ecogenicidade e ecotextura do tendão mostram processo reparativo com diminuição da área hipoecóica e ausência de edema após 10 dias, (m) restauração completa da falha tendínea após 30 dias da infusão de CTMMO e associação com MCB.....55

Figura 2. Área da ruptura do tendão calcâneo de coelhos, coloração Tricrômio de Masson. (a) tendão íntegro na coloração magenta e fibras colágenas jovens coradas em azul (★) e em azul pálida componentes da matriz extracelular (☞) (objetiva 10x). (b) Tecido com grande população celular (★), vasos neoformados (detalhe na fotomicrografia aresta superior direita), colocação azul mostra fibras colágenas imaturas (☞) (objetiva 10x). (c) Nota-se a MCB localizada no lado direito da micrografia (★) e no centro o tecido conjuntivo frouxo não modelado com áreas multifocais de hemorragia (detalhe na aresta superior à direita). Fibras colágenas individuais em processo de polimerização (☞) na coloração azul mais intensa (objetiva 10x). Detalhe da micrografia mostrando grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas individualizadas com arranjo desordenado. (d) Áreas de transição de colágeno mais maduro (★) e imaturo (☞) no tecido de granulação, com grande quantidade de células fibroblastóides (objetiva 10x). (e) Tecido de granulação jovem mostrando grande deposição de colágeno não modelado (★) (coloração azulada) e grande população celular com características morfológicas fusiforme e presença de macrófagos. Processo de polimerização das fibras colágenas (azul índigo) (objetiva 10x). (f) Área de transição do tecido colágeno maduro e imaturo (★) (objetiva 20x). (g) Mostra modelagem das fibras colágenas individuais e onduladas sofrendo modelagem (objetiva 40x). (h) Características similares entre o tecido conjuntivo denso recém-formado (★) e pré existente (☞) (objetiva 4x).....57

Figura 3. Rastreamento das CTMMO na área de ruptura tendínea. Marcação com Qtracker (objetiva 10x, barra: 200µm). (a) Área de reparação tendínea após 10 dias da infusão de CTMMO (T1). (☞) Tendão pré existente, (☞) área de ancoragem do tecido conjuntivo jovem, (★) tecido conjuntivo em modelação e densa população celular. (b) tecido conjuntivo

formado após 30 dias da infusão de CTMMO, nota-se a diminuição da população celular. **(c)** Área de intensa atividade celular (★), ancoragem do tecido conjuntivo formado após 10 dias (ë) no tendão pré existente (⊕). **(d)** tecido conjuntivo denso em processo avançado de modelagem com população celular diminuta (★), nota-se área de ancoragem do tecido conjuntivo em modelação ao pré existente (⊕), tecido conjuntivo denso modelado pré existente (⊕).....58

RESUMO

Os avanços na medicina regenerativa estão reconfigurando-se por meio da utilização de biomateriais e associações entre matrizes celulares e outros componentes capazes de acelerar o processo reparador de forma a proporcionar integridade ao tecido lesionado. Atualmente, é intensa a atuação de pesquisadores na busca de um biomaterial que ofereça condições de biocompatibilidade, integrabilidade e capaz de manter as propriedades do tecido a ser reparado. Neste sentido, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar e avaliar o comportamento das células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMO) de coelho associada à membrana celulósica bacteriana (MCB) e o seu potencial de reparação da ruptura parcial do tendão calcâneo. Os cuidados com os animais e os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPI, parecer 021/14 e 268/16). Foram coletadas amostras de medula óssea de coelhos, isoladas células-tronco mesenquimais, realizados ensaios de unidade formadora de colônia fibroblástica (UFC-F), indução da diferenciação celular osteogênica, condrogênica e adipogênica, integração celular à MCB observadas em intervalos de 1, 7 e 14 dias, além de testes de citotoxicidade (indução de NO), toxicidade (MTT) desta membrana e atividade fagocítica. As CTMMO foram marcadas com Qtracker[®] e foram infundidas em falhas tendíneas induzidas no tendão calcâneo de coelhos. Foram utilizados 12 coelhos, distribuídos em dois grupos de 6 (G1 e G2), nos quais os tendões calcâneos dos membros posteriores foram lesionados parcialmente. Nos animais do G1, o membro posterior direito correspondeu ao controle (C) e o membro posterior esquerdo ao tratamento 1 (T1), que compreendeu ao enxerto da MCB envolvida no tendão calcâneo pós indução da lesão. Nos animais do G2, o membro posterior direito, tratamento 2 (T2), foi realizado a infusão de CTMMO na região da falha tendínea, e no membro posterior esquerdo, o tratamento 3 (T3), enxerto de MCB associada a CTMMO. Em todos os animais deste experimento foram realizados exames ultrassonográficos em três momentos, pré, imediatamente pós-lesão e ao final dos tratamentos, além de análise histopatológica da disposição de colágeno, após eutanásia. Verificou-se no ensaio de UFC-F células com morfologia fibroblástica organizadas em colônias distribuídas pela área de superfície da cultura. Na curva de crescimento celular foram observadas duas fases (lag e log) no decorrer de 15 dias. A multipotencialidade das células foi evidenciada, pela diferenciação em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. Quanto à associação com a MCB, as CTMMO apresentaram boa integração a este biomaterial. No ensaio de atividade fagocítica houve ativação significativa de macrófagos e o incremento na síntese de óxido nítrico, bem como na análise com MTT, a MCB não apresentou efeito citotóxico. As CTMMO marcadas mostraram-se em atividade nos sítios da lesão tendínea. A análise ultrassonográfica e histológica, mostrou reparação total dos tendões calcâneos tratados com CTMMO associadas à MCB. Pode-se concluir que a associação entre a membrana celulósica bacteriana e CTMMO de coelhos possui potencial biointegrativo e capacidade reparativa com melhor organização das fibras colágenas recém-formadas.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, engenharia tecidual, celulose.

1 INTRODUÇÃO

As patologias relacionadas às degenerações, fraturas, neoplasias, tem crescido na medida em que aumenta a expectativa de vida da população mundial, tornando-se um grande desafio para setores da área da saúde, em que muitas vezes há necessidade de realização de intervenção cirúrgica para substituição ou reconstrução de áreas teciduais.

Com o crescente papel da biotecnologia, surgem alternativas que envolvem a utilização de células-tronco na promoção da saúde. Este é um desafio contemporâneo que diversos pesquisadores buscam construir bases sólidas no desenvolvimento biotecnológico a fim de tornar a terapia celular um dos grandes potenciais de reconfiguração da saúde. Diversos biomateriais vem sendo desenvolvidos com diferentes propriedades físico-químicas e mecânicas, incluindo aplicabilidade na regeneração tecidual, sistemas de liberação de medicamentos, novos enxertos vasculares, ou suportes para engenharia de tecidos *in vitro* e *in vivo* (RICHARDSON *et al.*, 2016; DIMARINO; CAPLAN; BONFIELD, 2013; XI *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2013).

Quando a estrutura biológica não pode ser reparada, os enxertos tornam-se uma alternativa viável para o restabelecimento da função e, demandam a necessidade do estudo de materiais que possam ser utilizados como suporte ou substitutos teciduais (GUASTALDI; APARECIDA, 2012, LANDIN *et al.*, 2013). O estudo das interações entre células-tronco e substratos na engenharia tecidual, é de grande importância, para a determinação das propriedades biológicas dos implantes. A adesão das células-tronco ao substrato influencia na morfologia, proliferação e viabilidade celular (FAVI *et al.*, 2013).

As células-tronco ganharam notoriedade no meio científico, por possuírem características peculiares no reparo tecidual. Os pesquisadores têm principalmente trabalhado com 3 tipos de células-tronco: células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), células-tronco derivadas do cordão umbilical e células-tronco mesenquimais (CTM) (CHANG *et al.*, 2016, KOBOLAK *et al.*, 2016, SHI *et al.*, 2017).

Os conflitos éticos que envolvem a utilização de células-tronco embrionárias estimularam os pesquisadores a desenvolverem protocolos de indução a pluripotência de células-tronco somáticas. Os avanços com essa tecnologia são promissores, mas ainda requerem mais estudos a fim de consolidar a utilização destas células no processo regenerativo nos diversos tecidos. As células-tronco provenientes do cordão umbilical possuem características de células multipotentes, e podem ser utilizadas no tratamento de doenças de origem hematopoética, mas, por possuir baixo número de células neste nicho, faz-

se necessário o desenvolvimento de estratégias para expansão *ex vivo* eficiente, além do alto custo para criopreservar ao longo dos anos este material em biobancos (RATAJCKAZ, 2015).

Por conseguinte, pesquisadores tem dado ênfase em estudos com CTM. Estas células, apresentam-se indiferenciadas em seus diversos nichos mesmo na fase adulta, e servem como sistema interno de reservatório e reparo, dividindo-se para substituir células que foram danificadas como resultado da senescência, lesão ou doença, mantendo o volume normal de órgãos e tecidos. Quanto a identificação, caracterização fenotípica, propriedades biológicas e potencial regenerativo dessas células, estudos avançados tem mostrado boas perspectivas para o campo da engenharia tecidual (KOBOLAK *et al.*, 2016).

O crescente desenvolvimento de pesquisas sobre as aplicações de biomateriais é responsável por impulsionar esse mercado (GRAND VIEW RESEARCH, 2016). Os biomateriais poliméricos estão entre os mais empregados no contexto biomédico, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes às dos materiais biológicos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Os polímeros estruturados em forma de fibras estão se tornando cada vez mais atraentes, pois em geral, as fibras apresentam estrutura semelhante à matriz extracelular dos tecidos biológicos, podendo vir a mimetizar de forma bastante fidedigna as propriedades físico-químicas e estruturais dos tecidos biológicos (BAUER *et al.*, 2013; NAUMENKO *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2017).

No campo da regeneração tecidual, a membrana celulósica bacteriana pode atingir arquitetura semelhante ao tecido conjuntivo, que por sua vez desperta o interesse sobre investigações no controle da adesão e proliferação celular (ZANATTA, 2012; KOUROUPIS, 2016).

O objetivo dessa pesquisa foi caracterizar as células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelhos e avaliar o comportamento destas células quando associadas à membrana celulósica bacteriana, verificando a adesão, capacidade de ativação de células do sistema imune, citotoxicidade e toxicidade do biomaterial. Ademais, analisar o potencial reparador das CTMMO associadas a MCB transplantadas, por acesso cirúrgico, na ruptura parcial induzida nos tendões calcâneos em coelhos, verificando a modelagem do tecido conjuntivo e preenchimento da falha tendínea em dois períodos (10 e 30 dias).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões tendíneas

A reparação e o restabelecimento morfofuncional dos tendões dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos, como vascularização, migração e adesão celular, além das manobras operatórias e da terapia utilizada (DOCHEVA *et al.*, 2015). Em processos reparativos do tendão calcâneo, a sutura tem sido o principal tratamento para tendões lacerados ou avulsionados (BROWN; SHIPLE; SCARPONE, 2016).

A reparação de tendões continua a ser um enorme desafio para o cirurgião ortopédico. Embora a organização longitudinalmente linear das fibras de colágeno e fascículos resultem em rigidez ideal e força em tensões baixas sob carga de tração, esta organização faz o reparo de tendões rompidos ou dilacerados extremamente difícil (WALDEN *et al.*, 2017). Usar material mais resistente na sutura aumenta o sucesso no pós-operatório, mas ainda não descarta a possibilidade de re-ruptura ou do início do movimento precoce sem riscos de promover a formação de um novo GAP (NI *et al.*, 2013).

A invasão do tecido de granulação na descontinuidade do tendão promove o desenvolvimento de aderências comprometendo a qualidade do procedimento cirúrgico. Para evitar problemas associados com a imobilização prolongada (aderências do tendão) e formação de GAP, a reparação de tendão pode ser aumentada com fatores biológicos para promover a resistência inicial e diminuir o tempo de cura total (ISLAM *et al.*, 2017). Já foi descrita na literatura a introdução de fatores de crescimento para aumentar a força de recuperação em reparos de tendão em modelos animais (ZUZZOVA, M.; KRISOVA, S.; ZERT, Z., 2013; GONZÁLEZ *et al.*, 2015). No entanto, o preenchimento da fenda originada pela ruptura do tendão ainda é alvo para testes com diversos materiais.

Uma nova abordagem preconizada é a engenharia de tecidos, que é o desenho com base laboratorial e desenvolvimento de tecidos vivos e órgãos para substituir ou apoiar a função de partes lesionadas do corpo (PEACH, M.S., 2017). Na engenharia de reconstrução de tendões, as células-tronco oferecem potencial para o preenchimento da falha tendínea, podendo ser associada a biomateriais reduzindo o tempo de reabilitação no pós-cirúrgico.

2.2 Biotecnologia na engenharia de tecidos

No início da década de 50, quando os biomateriais passaram a ser usados de forma mais sistemática, o objetivo era a obtenção de materiais biocompatíveis, capazes de substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente. Posteriormente, buscou-se aumentar a vida do implante por sua interação com a interface do

tecido hospedeiro. Em seguida, a meta era o desenvolvimento de materiais biodegradáveis, com capacidade de serem incorporados ou absorvidos (após dissolução) pelo tecido hospedeiro. Pesquisadores tem trabalhado com o conceito de biomimética, que significa literalmente, a imitação da vida, buscando assim, materiais que participem de forma ativa no processo de recuperação, atuando no tecido de forma específica, com estimulação em nível celular (HOLZAPFEL *et al.*, 2013; HASAN *et al.*, 2017; PUPPOLO *et al.*, 2017).

A engenharia de tecidos é uma tecnologia com aplicações clínicas encorajadoras, com grandes impactos econômicos e implicações para o tratamento dos pacientes (ABBOTT; KAPLAN, 2016). O propósito nesta área é estabelecer uma nova tecnologia clínica que tornarão possíveis tratamentos médicos para doenças que têm sido difíceis de curar pelos métodos atualmente existentes (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os desafios da engenharia de tecidos envolvem abordagens interdisciplinares, e muitos problemas ainda envolvem a eficácia de alguns parâmetros como métodos, fontes celulares, construção dos suportes, semeadura das células, ambiente de cultura, análise da produção de matriz extracelular, propriedades mecânicas da construção célula-suporte e modelos *in vivo* apropriados (FLOREA *et al.*, 2016).

Avanços no campo de biomateriais e suas aplicações médicas indicam a importância e o potencial de vários polissacarídeos de origem microbiológica no desenvolvimento de novas classes de materiais biomédicos (FLOREA *et al.*, 2016; LEE; DAI, 2017; MURDOCK; BADYLAK, 2017). Dentre estes, tem-se a celulose bacteriana, que possui nanoestrutura fibrilar única, que determina propriedades físicas e mecânicas características, que lhe conferem papel bastante promissor na medicina moderna e nas pesquisas biomédicas (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015; WANG, 2017; WU; CHENG, 2017).

Algumas questões a respeito da celulose bacteriana (CB) necessitam maiores investigações. A estrutura da membrana celulósica bacteriana proporciona condições favoráveis à adesão celular, mas, ainda não há indicações claras do mecanismo de regeneração tecidual, acreditando-se que seja promovida pela sua nanoestrutura característica (KIM *et al.*, 2011). Desta forma, novos estudos *in vitro* e *in vivo* se fazem necessários, pois poderão prover o entendimento de sua interação com os tecidos biológicos.

2.2.1 Celulose bacteriana

Os polímeros são os materiais mais procurados na engenharia de tecidos, e também os mais empregados na prática médica, devido às semelhanças com características estruturais do tecido e também por apresentarem uma elevada versatilidade mecânica (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013). Dentre as principais vantagens desses biomateriais destacam-se a facilidade

de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios e outros), o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas (ALMEIDA; WOICIECHOWSKI; WOSIACKI, 2013).

Na engenharia tecidual, busca-se o desenvolvimento de polímeros que proporcionem efetiva interação com os tecidos, favorecendo respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no local de implantação, mimetizando as características da matriz extracelular e exercendo um papel ativo na restauração tecidual (KUCINSKA-LIPKA; GUBANSKA, 2015; PUPPOLO *et al.*, 2017).

A celulose é o biopolímero mais abundante no mundo, com uma produção estimada de 10^{11} toneladas por ano e possui grande importância econômica, além disso pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários, e seres procariontes (FLOREA *et al.*, 2016).

A celulose bacteriana é um polissacarídeo extracelular secretado principalmente pela *Gluconacetobacter xylinus*, uma bactéria estritamente aeróbia e gram-negativa, quimioheterotrófica, que pode ser cultivada em um meio líquido a partir de várias fontes de carbono e nitrogênio, e basicamente utiliza a glicose como substrato. Em um meio de cultura apropriado este microrganismo produz fibras muito finas de celulose que se entrelaçam formando uma película com estrutura nanofibrilar (MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2011; LI *et al.*, 2012; PANESAR *et al.*, 2012).

Com propriedades singulares e bastante promissoras, a CB desperta interesse em muitos pesquisadores de diversas áreas, das quais se destacam a medicina regenerativa e a biomedicina. As características fundamentais presentes na CB que tornam este biomaterial atrativo na engenharia tecidual são: elevada hidrofiliabilidade, capacidade de retenção de água, porosidade (517,9 a 1582,0nm), o que permite a adesão celular e difusão do meio de cultivo e matriz extracelular dentro da estrutura do *scaffold*, elevada resistência (0,76 a 4,32 kN/m), degradável, preservação da sua arquitetura aproximadamente até 325°C, estabilidade mecânica e maleabilidade da fibras ultrafinas reticuladas, que entrelaçam-se formando uma rede tridimensional a qual possibilita uma permeabilidade seletiva. A pureza química, possibilidades de agregarem substâncias à matriz de CB, cristalinidade (75 a 91%), também são apreciadas por pesquisadores (CAVKA *et al.*, 2013; VIEIRA, 2013; ASHOK *et al.*, 2015; KIRDPONPATTARA *et al.*, 2015).

2.2.2 Toxicidade de biomateriais

Um material tóxico é definido como aquele que libera um resíduo químico em quantidade suficiente para matar células, direta ou indiretamente por meio da inibição de vias metabólicas principais. O número de células afetadas é proporcional à dose e potência do resíduo químico. Com a crescente oferta de biomateriais pela indústria biotecnológica, surge a necessidade de análises que esclareçam as possíveis reações citotóxicas destes biomateriais com possíveis aplicações em sistemas biológicos (ZOUBOU *et al.*, 2013; SCHMALZ; WIDBILLER; GALLER, 2016).

Sabe-se que as células-tronco quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente. A base dos ensaios de citotoxicidade está na avaliação da interferência induzida pelo biomaterial nos processos metabólicos celulares e na investigação dos processos que podem vir a intervir no crescimento/multiplicação celular, ou até mesmo culminar na morte celular (ÁVILA; *et al.*, 2014).

Segundo Boersema (2016), a citotoxicidade pode ser avaliada por diferentes métodos de acordo com o dano celular ocorrido: alterações nas membranas plasmáticas podem ser avaliadas por meio de corantes como o azul de Trypan, Alamar Blue, alterações nas funções metabólicas das mitocôndrias, as quais podem ser mensuradas pelo método colorimétrico de MTT (tetrazólio de 3 - (4,5 - dimetiltiazol -2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo).

2.2.3 Respostas inflamatórias a biocompósitos

Os sistemas imunológicos inato e adaptativo desempenham um papel distinto e significativo ao reagir contra qualquer material estranho que é considerado nocivo. Em ambos os tipos de respostas, existem numerosos fatores humorais e celulares que são essenciais para as respostas imunológicas eficientes. As reações aos biomateriais após sua implantação, determinam o sucesso da integração e o desempenho biológico de dispositivos biomédicos, implantes ortopédicos e *scaffolds* de engenharia tecidual (VISHWAKARMA, 2016).

Após o implante do biomaterial, a resposta inflamatória do hospedeiro é um fator importante que afeta particularmente a regeneração do tecido, em que o estresse oxidativo inicial e a ativação subsequente de macrófagos, desempenham um papel chave na regulação da resposta inflamatória (HORTENSIUS; EBENS; HARLEY, 2016).

Os materiais biocompatíveis devem possuir sinergia física, química e biológica no microambiente celular em que se encontram. A ativação imunológica da via clássica ou da via alternativa, pode secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias que dificultam as interações

entre o material e o tecido endógeno e, conseqüentemente, a regeneração do tecido, enquanto que macrófagos podem envolver o tecido e segregar citocinas anti-inflamatórias para manter a estabilidade do ambiente, o que é propício para regeneração. Além disso, os macrófagos podem secretar uma série de fatores de crescimento e quimiocinas para promover a migração e o recrutamento de células-tronco. Assim, o equilíbrio entre a via clássica e as vias alternativas regulam a interação de biomateriais em sistemas biológicos (YU *et al.*, 2016).

2.3 Células-tronco

É amplamente aceito na comunidade científica que as células-tronco podem ser divididas em dois grandes grupos: células-tronco embrionárias e células tronco não-embrionárias. Derivadas da massa celular interna de blastocistos, as células-tronco embrionárias podem se diferenciar em células das três camadas germinativas. O interesse de pesquisadores e clínicos por estas células permanecem limitados por questões bioéticas e controvérsias no que diz respeito à formação de teratomas (WANG; QU; ZHAO, 2012; SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016).

Quanto a sua potencialidade, as células-tronco são classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As totipotentes apresentam como característica a capacidade de gerar todos os tecidos do organismo e do folheto embrionário; as classificadas como pluripotentes podem gerar todas as linhagens celulares, porém não originam células da membrana extra embrionária; as multipotentes originam células do próprio tecido isolado e diversas células de tecidos somáticos, enquanto as unipotentes originam apenas células provenientes do mesmo tecido (FAITA *et al.*, 2016).

As células-tronco mesenquimais adultas são células-tronco somáticas presentes em pequenas quantidades em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos (PINTO FILHO *et al.*, 2013; MO *et al.*, 2016). Estas células emergem durante o desenvolvimento e são caracterizadas pela perda de pluripotência e capacidade de diferenciação restrita a alguns tipos de tecidos. Uma característica inerente das CTM é seu alto grau de plasticidade, capazes de gerar células maduras de órgãos distintos. Apesar desta plasticidade, estas células parecem não dar origem a tumores quando injetadas e ainda, promover a manutenção das células viáveis e regenerar tecidos lesados (KROURY; SCADDEN, 2015).

2.3.1 Células-tronco mesenquimais de medula óssea

Pioneiramente, foi descrito por Friedenstein, células-tronco mesenquimais da medula óssea que durante cultivo, apresentaram-se fusiformes e proliferaram-se em colônias. Estas

células são capazes de aderir ao plástico e, diferenciar-se sob condições específicas *in vitro* em tipos celulares (osteoblastos, condroblastos, adipócitos). Posteriormente, essas células obtidas da medula óssea pós-natal, foram denominadas células estaminais mesenquimais ou células-tronco do estroma. A presença de células mais ou menos semelhantes tem sido demonstrada em muitos outros tecidos: fígado, músculo, polpa dentária, tecido adiposo, coração, rins, dentre outros. (SICILIANO *et al.*, 2016; WUCHTER; WAGNER; HO, 2016; CORNELISON; PERDIGUERO, 2017; FETER *et al.*, 2017).

A medula óssea, derivada do mesoderma, possui células multipotentes hematopoiéticas responsáveis pela renovação de células sanguíneas, e progenitoras multipotentes denominadas células-tronco mesenquimais (CTM). Estas células têm duas características importantes. A primeira refere-se à capacidade de diferenciar-se em tipos celulares distintos, tais como células de tecidos específicos do mesênquima, incluindo osso, cartilagem, músculo, estroma da medula óssea, a tendão/ligamento, gordura, derme e outros tecidos conjuntivos. A segunda característica reside na capacidade das CTM secretarem um amplo espectro de macromoléculas bioativas que são imunoreguladoras e servem para estruturar microambientes regenerativos em áreas de lesão de tecido. Assim, estas células agem no reparo e regeneração dos diversos tipos de tecido e cujas características são definidas a partir do seu nicho específico, com potencial para serem utilizadas na reconstrução de tais tecidos mesenquimais através dos princípios e práticas de engenharia de tecidos (CAPLAN, 2014; GAO *et al.*, 2016).

A medula óssea, se destaca por ter sido o primeiro tecido empregado em terapia celular, tornando-se o tecido mais utilizado e caracterizado para estudos das propriedades das células-tronco mesenquimais (PINTO FILHO *et al.*, 2013).

As células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMO) mostram-se excelentes células para o uso clínico-terapêutico por diversos fatores: são facilmente acessíveis; pode-se atingir o volume de células necessário em pouco tempo, por meio da replicação em cultura, permite o uso autólogo ou o tratamento de vários pacientes com uma única amostra, já que a expressão de antígenos do HLA é pobre, possibilita a utilização dessas células sem a necessidade da tipagem HLA, tornando-as prontas para o uso em qualquer paciente. Mesmo após congeladas, preservam suas características, o que permite a criação de bio-bancos (WABIK, JONES, 2015).

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com os resultados apresentados, este trabalho contribui com esclarecimentos sobre o comportamento *in vitro* das CTMMO de coelhos quando cultivadas sobre scaffold de membrana celulósica bacteriana e dados relativos a toxicidade deste biomaterial. Verificou-se que as células-tronco mesenquimais isoladas a partir da medulla óssea de coelhos possuem grande potencial proliferativo demonstrado na avaliação da cinética celular por meio da curva de crescimento o que, nos permitiu identificar as fases de adaptação, crescimento exponencial e estabilidade da proliferação na cultura celular com boa viabilidade celular e atividade proliferativa, mesmo após descongelamento.

As CTMMO foram capazes de diferenciar-se em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. Apresentaram-se aderentes ao plástico e a membrana celulósica bacteriana, formando colônias na cultura celular com morfologia fibroblastóide e integrando o citoplasma à MCB após sete dias de cultivo. Quanto à citotoxicidade da MCB, verificou-se que não houve diferença significativa na ativação de células do sistema imune nem ativação de óxido nítrico.

A expansão das CTMMO sobre scaffold de membrana celulósica bacteriana pode se tornar uma alternativa promissora para a reconstrução de vários tipos de lesões teciduais.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, R.D.; KAPLAN, D.L. Engineering Biomaterials for Enhanced Tissue Regeneration. **Current Stem Cell Reports**, v. 22, n.2, p. 140-146, 2016.
- ALMEIDA, D.; WOICIECHOWSKI, A.L.; WOSIACKI, G. Propriedades Físicas, Químicas e de Barreira em Filme Formados por Blenda de Celulose Bacteriana e Fécula de Batata. **Polímeros**. p. 1-9, 2013.
- ASHOK, B. *et al.* Properties of cellulose/Thespesia lampas short fibers bio-composite films. **Carbohydrate Polymers**. v. 127, p. 110-115, 2015.
- ÁVILA, H.M. *et al.* Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Microbiol Biotechnol**. v.98, p. 7423-7435, 2014.
- BAUER, S. *et al.* Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, v. 58, p. 261–326, 2013.
- BOERSEMA, G.S.A. *et al.* The effect of biomaterials used for tissue regeneration purposes on polarization of macrophages. **BioResearch**. v.5, n.1, p.7-14, 2016.
- BROWN, M.N.; SHIPLE, B.J.; SCARPONE, M. Regenerative approaches to tendon and ligament conditions. **Phys Med Reahbil Clin**. V.27. p. 941-984, 2016.
- CAPLAN, A.I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. **Journal of Cellular Physiology**. USA, v. 213, pg. 341-347, 2014.
- CAVKA, A. *et al.* Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. **Biotechnology for Biofuels**. v.25, n.6, p. 1-10, 2013.
- CHEN, Q; LIANG, S; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in polymer science**, v. 38, n. 3, p. 584-671, 2013.
- DIMARINO, A.M.; CAPLAN, A.I.; BONFIELD, T.L. **Frontier in Immunology**, v.4, n.1, p. 1-9, 2013.
- DOCHEVA, D. *et al.* Biologics for tendon repairs. **Advanced drug delivery Reviews**. V. 84, p. 222-239, 2015.
- EDGAR, L. *et al.* Heterogeneity of scaffold biomaterials in tissue engineering. **Materials**, v.9, p. 1-21, 2016.
- FAVI, P.M. *et al.* Cell proliferation, viability, and in vitro differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. **Materials Science and Engineering:C**. v.33, n.4, p.1935-1944, 2013.
- ISLAM, A.; MBIMBA, T.; YOUNESI, M.; AKKUS, O.; Effects of substrate stiffness on the tenoinduction of human mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**. V. 58, p. 244-253, 2017.

PINTO FILHO, S.T.L. *et al.* Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**. v.20, p.49-59, 2013.

FAITA, T. *et al.* Membrana amniótica: fonte alternative de células-tronco mesenquimais em diversas espécies animais. **Revista Veterinária Brasileira**. v. 36, n.6, p. 520-525, 2016.

FLOREA, M. *et al.* Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain. **PNAS Plus**. p. 3440-3448, 2016.

GONZÁLEZ, J.C. *et al.* Autologous leukocyte-reduced platelet-rich plasma therapy for Achilles tendinopathy induced by collagenase in a rabbit model. **Scientific reports**. p. 1-11, 2015.

GRAND VIEW RESEARCH, Brazil Biomaterials Market Forecast – Estimated To Achieve Two Billion By 2018. Disponível em < <http://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/biomaterials-industry>> Acesso em: 04-08-2016.

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H. Fosfato de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, p. 1352-1358, 2012.

HOLZAPFEL, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013.

HORTENSIUS, R.A.; EBENS, J.H.; HARLEY, B.A.C. Immunomodulatory effects os amniotic membrane matrix incorporated into collagen scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**. V.104, n. 6, p. 1332-1342, 2016.

KFOURY, Y.; SCADDEN, D. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. **Cell Stem Cell**, v.16, n.5, p. 239-253, 2015.

KIM, J. *et al.* Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/ Chitosan composite for potential biomedical application. **J Polym Res**, v.18, p. 739-744, 2011.

KIRDPONPATTARA, S. *et al.* Structural modification and characterization of bacterial cellulose-alginate composite scaffolds for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v.132, p.146-155, 2015.

KOBOLAK, J. *et al.* Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial microengineering of their niche. **Methods**. p. 62-68, 2016.

KOUROUPIS, D. *et al.* Generation of stem cell-based bioartificial anterior cruciate ligament (ACL) grafts for effective ACL rupture repair. **Stem Cell Research**. p. 1-10, 2016.

KUCINSKA-LIPKA, J.; GUBANSKA, I. Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future prospectives. **Polym. Bull**. v.72, p. 2399-2419, 2015.

- LANDIM, A. *et al.* Equipamentos e tecnologias para saúde: oportunidades para uma inserção competitiva da indústria brasileira. **BNDES Setorial**, n. 37, mar. 2013, p. 173-226, 2013.
- LI, Y. *et al.* Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.96, p.1479-1487, 2012.
- LIN, P.S. *et al.* Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**. v.20, n.5, p. 2191-2219. 2013.
- MI, H-Y; JING, X; TURNG, L-S. Fabrication of porous synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. **Journal of Cellular Plastics**, v. 51, n. 2, p. 165-196, 2015.
- MO, M. *et al.* Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potencial. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.73, p.3311-3321, 2016.
- MOOSAVI-NASAB M; YOUSEFI M. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. **Iran J Biotech**, v.9, n. 2, p. 94-101, 2011.
- NI, M. *et al.* Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. **Biomaterials**, v34, p. 2024-2037, 2013.
- PANESAR, P.S; CHAVAN, Y; CHOPRA, H.K; KENNEDY, J.F. Production of microbial cellulose: response surface methodology approach. **Carbohydr Polym** v.87,p. 930-934, 2012.
- PEACH, M.S. *et al.* Engineered stem cell niche matrices for rotator cuff tendon regenerative engineering. **Plos One**. V.12, n.4, p.1-19, 2017.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.K; MORAES, A. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.
- QIAN, D. *et al.* Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Repair Necrotic Pancreatic Tissue and Promote Angiogenesis by Secreting Cellular Growth Factors Involved in the SDF-1 α /CXCR4 Axis in Rats. **Stem Cells International**. p. 1-20, 2015.
- RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M.; KUMBHAR, J.V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.99, p.2491-2511, 2015.
- RATAJCZAK, M.Z. A novel view of the adult bone marrow stem cell hierarchy and stem cell trafficking. **Leukemia**, v. 29, p. 776-782, 2015.
- RICHARDSON, S.M. *et al.* Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. **Methods**, v.99, p. 69-80, 2016.
- SCHMALZ,G.; WIDBILLER,M.; GALLER,K.M. Material tissue interaction – from toxicity to tissue regeneration. **Operative Dentistry**. v.41, n.2, p. 117-131, 2016.
- SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. **Cell Transplantation**. v. 25, p. 829-848, 2016.

VISHWAKARMA, A. *et al.* Engineering immunomodulatory Biomaterials to tune the inflammatory response. **Trends in Biotechnology**. v.34, n.6, p.470-482 ,2016.

WABIK, A.; JONES. P.H. Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells. **The EMBO Journal**. V.34, p. 1164-1179, 2015.

WALDEN, G. *et al.* A clinical, biological, and biomaterials perspective into tendon injuries and regeneration. **Tissue Engineering: Part B**. v.23, n.1, p. 44-58.

WANG, S.; QU, X.; ZHAO, R.C. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*. v.5, p.1-9, 2012.

WEI, X. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 747-754, 2013.

WUCHTER, P.; WAGNER,W.; HO, A.D. Mesenchymal Stromal Cells (MSC). IN: **Regenerative Medicine – From protocol to Paciente**. 3 ed. 2016. Switzerland: Springer, 2016.

XI, J. *et al.* Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: Progress and future. **Burns & Trauma**, v.1, n.1, p. 13-20, 2013.

YU, Y.; WU, R.; YIN,Y.; CHEN, F. Direction immunomodulation using biomaterials for endogenous regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**. v.4. p.569-584, 2016.

ZANATTA, G. *et al.* Viability of mesenchymal stem cells during electrospinning. **Braz J Med Biol Res**. v.45, n.2, p. 125-130, 2012.

ZOBOU,H. *et al.* In vitro cyrotoxicity evaluation of a novel root repair material. **Basic Research Biology**. v.39, n.4, p. 478-483, 2013.

ZUFFOVA, K.; KRISOVA, S.; ZERT, Z. Platelet rich treatment of superficial digital flexor tendon lesions in racing Thoriughbreds. **Veterinarni Medicina**. V.58, n.4, p. 230-239, 2013.

**Apêndice A – Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA/UFPI)**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



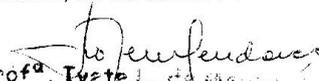
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Biocompatibilidade, imunomodulação e toxicidade da membrana celulósica bacteriana integrada às células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelhos- CTBIOMAT”**, registrada nº **268/16**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. MARIA ACELINA MARTINS DE CARVALHO– Morfofisiologia Veterinária/CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica (ou Ensino)-encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **20/01/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Fevereiro/ 2017 à Junho/ 2017
Espécie/Linhagem/raça	Rato isogênico
Nº de Animais	12
Peso/ Idade	6 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da UFPI.

Teresina, 20 de Janeiro de 2017.


 Prof.ª Ivete L. da Silva
 Comissão de Ética em Experimentação Animal
 Universidade Federal do Piauí

Apêndice B – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UFPI)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 30 de Maio de 2014.

Ilma.

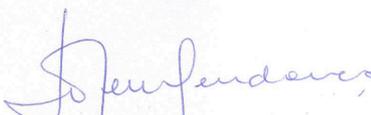
Profa. Dra. MARIA ACELINA MARTINS DE CARVALHO
Departamento: Morfofisiologia Veterinária- CCA/UFPI

Senhora Pesquisadora

Em reunião na presente data (30 de Maio de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **021/14**, o projeto de pesquisa intitulado **"Células-tronco mesenquimais associadas à membrana celulósica bacteriana: Ensaio pré-clínico para a reparação de ruptura de tendão calcâneo em coelhos"**, sob a sua responsabilidade. Informamos que no projeto serão usados 24 Coelhos (Machos).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora