

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

BRUNA CAMBRAIA GARMS

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E MEMBRANA DE LÁTEX

VISANDO UM NOVO MODELO DE BIOCURATIVO

Dourados-MS

2013

BRUNA CAMBRAIA GARMS

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E MEMBRANA DE LÁTEX VISANDO
UM NOVO MODELO DE BIOCURATIVO

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado para obtenção
do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Faculdade de Ciências Biológicas e
Ambientais

Universidade Federal da Grande
Dourados.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alexéia
Barufatti Grisolia

Co-Orientador: Prof^o Dr João Tadeu
Ribeiro Paes

Dourados-MS

2013

BRUNA CAMBRAIA GARMS

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E MEMBRANA DE LÁTEX
VISANDO UM NOVO MODELO DE BIOCURATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:



Prof. Drª Alexéia Barufatti Grisolia



Prof. Drº João Tadeu Ribeiro Paes

Prof. Drº Marcelo Fossa da Paz

Dourados-MS

2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por iluminar os caminhos que me trouxeram até aqui.

Aos meus pais, Álvaro e Gabriela e à minha irmã, Laura, por todo amor e carinho. Por estarem sempre ao meu lado me apoiando e incentivando meus sonhos.

Às minhas avós, Carmen Silvia e Azel, a minha bisa, Grace e a todos os meus familiares.

Aos meus amigos, por estarem ao meu lado sempre, por todo amor e paciência.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, pela oportunidade única, pela confiança a mim depositada, pelo incentivo e ensinamentos oferecidos.

À Mônica Yonashiro Marcelino, pelo apoio incondicional em todo o desenvolvimento desse estudo, incentivos, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, pela importante assessoria oferecida na orientação desse trabalho e o estímulo frente às adversidades.

Ao Felipe Azevedo, Natália Fuoco e Rafael Guilen, pela ajuda nos longos dias de experimentos, pelo incentivo nos momentos de incerteza e pela amizade.

À Profª. Dra. Alexéia Barufatti Grisolia, pela orientação e ajuda na estruturação deste trabalho, pelo apoio, incentivo e confiança a mim depositada.

E a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

À UNESP – Campus de Assis e ao Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1. ARTIGO	6
1.1 Resumo.....	6
1.2 Introdução.....	7
1.3 Materiais e Métodos.....	9
1.4 Resultados.....	13
1.5 Discussão.....	18
1.6 Conclusão.....	21
1.7 Agradecimentos.....	21
1.8 Referências.....	22
2. ANEXO I: “Orientação aos autores”	27
2. ANEXO II: Figuras	38

Caracterização de células-tronco e membrana de látex visando um novo modelo de biocurativo

Garms, B.C¹

¹Universidade Federal da Grande Dourados

Resumo

A engenharia tecidual aplica conhecimentos das ciências biomédicas e engenharia com o intuito de promover a regeneração, reparo ou manutenção da função dos tecidos. Esse campo do conhecimento envolve o emprego de biomaterias, como a membrana de látex, amplamente utilizada em aplicações terapêuticas. Outro alvo de grande interesse na comunidade científica em tratamentos clínicos e pré-clínicos, são as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASC). Dentro desse contexto, buscou-se padronizar as técnicas de cultivo de ASC e a confecção da membrana de látex a fim de desenvolver, a médio prazo, um biocurativo empregando a terapia celular associada ao látex como inovadora opção terapêutica para regeneração tecidual. As ASC foram isoladas, expandidas e diferenciadas em linhagens de osteócitos, condrócitos e adipócitos. As membranas de látex (MLN) foram submetidas a testes de resistência mecânica e demonstraram que a incorporação da polilisina (PLL) ao látex conserva resistência suficiente para aplicação terapêutica do material. O ensaio de citotoxicidade revelou que a MLN reduziu sensivelmente o metabolismo celular, porém ao adicionar PLL, houve uma expressiva redução na viabilidade celular. Os resultados obtidos permitiram caracterizar as ASC e padronizar a confecção da MLN, como metodologias básicas com

potencialidade para aplicações clínicas, como uma nova opção de biocurativo, para emprego, sobretudo, em lesões de difícil cicatrização.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Membrana de látex; Engenharia Tecidual; Biocurativo.

1. Introdução

A engenharia tecidual pode ser entendida como um campo de conhecimento interdisciplinar, resultante da aplicação dos conhecimentos das ciências biomédicas e engenharia, visando a regeneração, reparo ou manutenção da função de órgãos e tecidos lesados pelas mais diferentes etiologias: genéticas, congênitas ou degenerativas [1-4]. O conjunto de princípios e conhecimentos da engenharia tecidual tem sido, portanto, amplamente empregados, sobretudo, em dermatologia [2], odontologia [3] e ortopedia [4].

O emprego de biomateriais como suporte (*scaffolds*) associados à linhagens celulares representa uma importante ferramenta metodológica no contexto da regeneração, reparo e/ou substituição tecidual. Vale citar, como importantes “*scaffolds*” atualmente empregados, gel de plasma rico em plaquetas (PRP) [5], membrana de celulose [6] e membrana de quitosana [7].

A membrana de látex (ML) extraído da seringueira (*Hevea brasilienses*) destaca-se como um *scaffold* para crescimento de diferentes tipos celulares, como fibroblastos e osteócitos. Em um trabalho pioneiro, Mrué [8] demonstrou o potencial da ML em acelerar o processo de neoformação esofágica de cães e apresentou resultados significativos no

aumento da vascularização (neoangiogênese) e epitelização (epitélio pseudoestratificado) [9]. Desde então, a ML tem sido empregada para diferentes fins terapêuticos, tais como, reconstrução do palato em cães [10], regeneração do nervo ciático em ratos [11] e no tratamento de úlceras de diferentes etiologias.

As células-tronco (CT) têm sido, também, amplamente empregadas na regeneração de órgãos e/ou tecidos lesados por diferentes patologias. Embora o mecanismo de ação na regeneração tecidual não esteja bem elucidado, atribui-se às CT papel imunomodulatório, com supressão ou inibição do processo inflamatório e estimulação da angiogênese [12-14]. Estas propriedades tornam estes tipos celulares extremamente atraentes para emprego na regeneração tecidual, seja isoladamente ou associadas a biomateriais.

Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASC), pioneiramente descritas Zuk et al. [15], têm despertado grande interesse no contexto da medicina regenerativa e engenharia tecidual. Dentre as propriedades das ASC vale ressaltar sua facilidade de obtenção (os procedimentos são minimamente invasivos), pode ser extraído do próprio paciente, é encontrada em quantidade abundante e pode se diferenciar em múltiplas linhagens celulares de maneira controlada e reprodutível [12,16-18].

Uma série de trabalhos têm associado o uso de CT à biomaterias. Pereira-Junior et al. [19] compararam o crescimento de células-tronco mesenquimais (MSC) em diferentes tipos de *scaffolds* e apresentaram resultados significativos de crescimento e adesão celular em diferentes superfícies. Em outro estudo, foi avaliado o crescimento de MSC em hidrogel

de ácido hialurônico fibroso, apresentando resultados promissores visando estratégias futuras no reparo de cartilagem [20].

Dentro desse contexto, buscou-se padronizar as técnicas de cultivo de células-tronco de tecido adiposo e a confecção da membrana de látex, com o propósito de, a médio prazo, desenvolver uma inovadora opção terapêutica, decorrente da incorporação das ASC à membrana de látex, que permita a estruturação e padronização de um novo biocurativo, de baixo espectro de aplicação em diferentes tipos de lesões teciduais.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 5 ratos albinos machos da linhagem Wistar (com peso médio de 500g), espécie *Rattus norvegicus*, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – Campus de Assis – SP, para obtenção das células tronco derivadas do tecido adiposo. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e expostos a ciclos claro/escuro de 12 horas respectivamente, e receberam dieta sólida (Nuvilab[®]; Paraná, Brasil) e água *ad libitum*.

2.2 Extração do tecido adiposo

Para a coleta do tecido adiposo, os ratos foram sacrificados por meio de aprofundamento de anestesia com Tiopental sódico (Cristália, SP, Brasil), 400 mg/Kg, por via intraperitoneal. Em seguida, a região inguinal foi tricotomizada e submetida a um processo de antissepsia com polivinilpirridona-iodo (PVP-I), para posterior extração de aproximadamente

2g de tecido adiposo da região inguinal (lados direito e esquerdo) de cada um dos animais, obtendo-se um total de aproximadamente 10g de tecido.

2.3 Desinfecção do tecido adiposo

Após a coleta, o tecido adiposo foi mantido em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – 1640) com HEPES (Gibco®, New York, EUA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal – SBF (Gibco®, New York, EUA) e 2% de antibiótico/antimicótico 100X (Gibco®, New York, EUA), a 4°C durante um período de 24 horas para desinfecção.

2.4 Isolamento e cultura das células-tronco derivadas do tecido adiposo por dissociação mecânica

Após o processo de desinfecção, o tecido adiposo foi colocado em uma placa de Petri (vidro), contendo meio RPMI 1640 com HEPES suplementado com 2% de antibiótico – antimicótico, e dissociado mecanicamente com o auxílio de duas agulhas de seringa (BD™, New Jersey, USA) em forma de Z, para desprendimento das células do tecido. O meio contendo as células dissociadas foi colocado em seringas que permaneceram em posição vertical, por cerca de dez minutos. Em seguida, a solução celular foi filtrada em um filtro de 70 µm (Cell Strainer - BD Falcon™, New Jersey EUA) para a separação de restos celulares. O material coletado foi centrifugado durante 10 minutos a 900g. O precipitado obtido foi homogeneizado em 1 mL de meio ALPHA-MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification, Gibco®, New York, EUA) suplementado com 20% SBF e 1% antibiótico/antimicótico. Uma alíquota de 10 µL foi retirada para

contagem em câmara de Neubauer e mensuração da viabilidade celular. Após a contagem, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² (BD Falcon™, New Jersey, EUA) a uma concentração de 1x10⁵ células/cm², na presença de meio ALPHA-MEM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico/antimicótico, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A primeira troca do meio de cultura ocorreu após 72 horas e as trocas seguintes a cada 48 horas. Ao atingirem 60 – 80% de confluência as células foram dissociadas com a utilização de Tryple™ (Gibco®, New York, EUA).

2.5 Viabilidade Celular

Para verificação da viabilidade e contagem celular foi empregada câmara de Neubauer com 10µL de azul de tripan e 10µL de suspensão celular.

2.6 Caracterização das células-tronco derivadas do tecido adiposo

Para induzir as diferenciações osteogênica, condrogênica e adipogênica, as ASC foram plaqueadas a uma concentração de 1x10⁵ células/cm² e cultivadas em meio ALPHA-MEM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico – antimicótico, até atingirem uma confluência de 60-80%. Em seguida, as células foram cultivadas na presença dos kits de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica StemPro® (Gibco®, New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação osteogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), a condrogênica por Alcian Blue (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e a adipogênica por Oil

Red O (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

2.7 Unidade formadora de colônia

Unidades formadoras de colônia (UFC) das células-tronco mesenquimais isoladas do tecido adiposo foram identificadas por meio dos corantes Panótico Rápido LB (Laborclin®, BR) e Violeta Cristal (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) conforme protocolo descrito pelo fabricante.

2.8 Obtenção do látex

O látex, extraído das seringueiras *Hevea brasiliensis*, foi colocado em presença de amônia para impedir a coagulação. Em seguida, foi submetido à centrifugação de 8000g por 2 horas, com o objetivo de diminuir a quantidade de proteínas que causam reações de hipersensibilidade de sua composição natural.

2.9 Fabricação dos scaffolds

Membranas com 0,2 mm de espessura foram preparadas em placas de seis poços para cultura de células (BD Falcon™) de 9,6 cm². Foram confeccionadas membranas de látex natural puro, membranas de látex com 0.1% de polilisina (Poly-L-lysine Hydrobromide, PM 70-140 Kda, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), membranas de látex banhadas com polilisina (PLL) 0.1% e biofilme de PLL. Após secagem, o material sofreu esterilização em óxido de etileno.

2.10 Ensaios mecânicos

Membranas de látex natural puro (MLN) e membranas de látex com polilisina 0.1 % (MLN+P) foram submetidas à testes de tensão-deformação. As amostras foram confeccionadas em formato de alteres com 43 mm de comprimento 15 mm de largura e 0.9 mm de espessura. O ensaio, realizado com o equipamento EMIC-DL 2000, aplica uma carga constante de 10 kgf sobre as amostras. Os resultados foram analisados por meio de um software que acompanha o equipamento e gera curvas de resposta (força vs deformação) de cada corpo de prova.

2.11 Avaliação de citotoxicidade

A citotoxicidade da membrana de látex e a viabilidade celular foram determinadas por meio do ensaio MTT brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio. Foi utilizado o kit de ensaio Vybrant® MTT Cell Proliferation V-13154 (Gibco®, New York, USA) conforme instruções do fabricante.

3. Resultados

3.1 Cultura das células-tronco derivadas do tecido adiposo

O comportamento das células-tronco provenientes do tecido adiposo foi observado por meio de aspectos morfológicos, expansão e viabilidade celular, bem como a capacidade de adesão à superfície plástica. Na cultura primária, as ASC foram plaqueadas numa densidade de 1×10^5 células/cm² e após 48h notou-se a aderência celular à superfície de cultura. Pequenas colônias de células apresentaram aspecto de fuso, 72 horas após o início da

cultura. A partir do 7^o dia, as colônias aumentaram a densidade da população de células alongadas e com morfologia fusiforme, semelhante ao de fibroblastos. A confluência de 70 – 80% foi atingida no 11^o dia de cultura. Posteriormente à cultura primária, a confluência de 70 – 80% foi alcançada entre 3 – 4 dias. A cultura celular apresentou monocamada homogênea e com morfologia fusiforme a partir da terceira passagem, demonstrando que, possivelmente, não havia contaminação com células não aderentes, como adipócitos maduros e hemácias. A viabilidade celular foi quantificada em cada uma das passagens, apresentando uma média de aproximadamente 99%. As células foram cultivadas até a 4^a passagem e mantiveram o mesmo padrão morfológico (Figura 1).

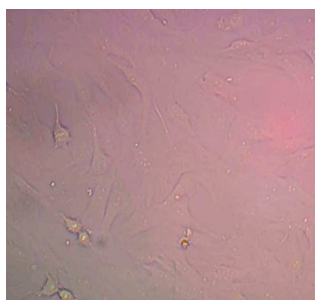


Fig. 1 Células-tronco mesenquimais alongadas com morfologia fusiforme (aumento de 20x).

3.2 Diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica das ASC

Testes de diferenciação *in vitro* foram realizados a fim de verificar se as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo cumprem com os requisitos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular [21]. A Figura 2 mostra a diferenciação em condrócitos, osteócitos e adipócitos das ASC. A diferenciação condrogênica foi confirmada por meio de coloração com o corante Alcian Blue. O azul é indicativo da síntese de proteoglicanos pelos condrócitos. A osteogênese foi constatada mediante

coloração da matriz óssea dos osteoblastos e osteócitos com Alizarin Red S. Finalmente, mediante o corante Oil Red O, foi avaliada a diferenciação das ASC em adipócitos.

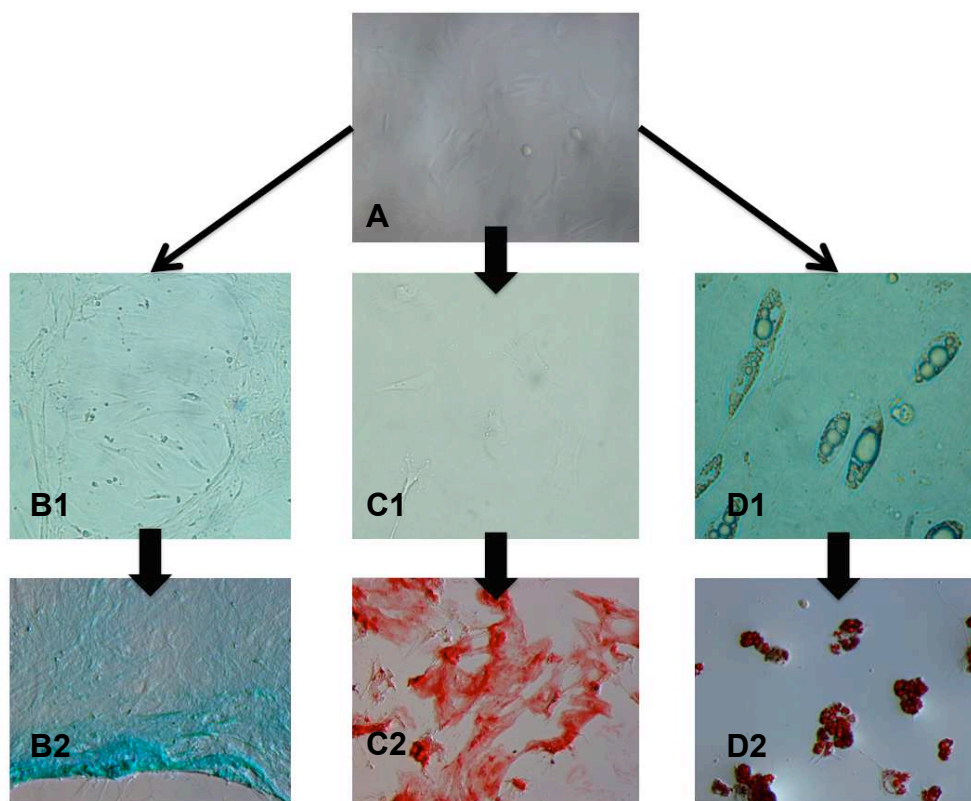


Fig. 2 A - Cultivo das ASC na ausência de meio indutor (aumento de 20x); B1 – ASC diferenciadas em condrócitos na ausência de corante (aumento 20x). B2 – Proteoglicanos sintetizados pelos condrócitos e corados com Alcian Blue (aumento 20x). C1– ASC diferenciadas em osteoblastos na ausência de corante (aumento 20x). C2 – Matriz óssea corada com Alizarin Red S (aumento 40x). D1 – ASC diferenciadas em adipócitos na ausência de corante. D2 – Vacúolos lipídicos corados com Oil Red O (aumento 20x).

3.3 Unidade formadora de colônia

Para avaliar o crescimento celular, duas técnicas de coloração foram realizadas. A Figura 3 mostra unidades formadoras de colônias de ASC coradas, respectivamente, pelos corantes, Violeta Cristal e Panótico Rápido.

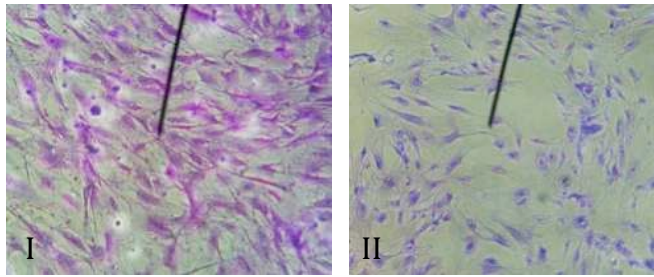


Fig. 3 Coloração de ASC pelos métodos Violeta Cristal (I) e Panótico Rápido (II), no aumento de 20x.

3.4 Testes de resistência mecânica das membranas

O grau de deformação e resistência de cada amostra (Figura 4) foi demonstrado por testes biomecânicos de tração. A média dos valores da força de ruptura das amostras de MLN foi de 11,82 N e apresentou 760,4% de alongamento de ruptura. Esses valores foram sensivelmente superiores comparados ao da MLN+P, que apresentou média da força de ruptura das amostras de 8,110 N e média do alongamento de ruptura de 754,0%, expressos graficamente pela Figura 5.

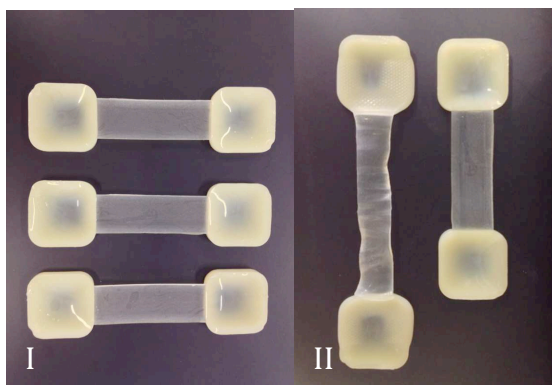


Fig. 4 Amostras em formato de alteres de MLP e MLP+P (I). A deformação do material (amostra da esquerda) após os ensaios mecânicos (II).

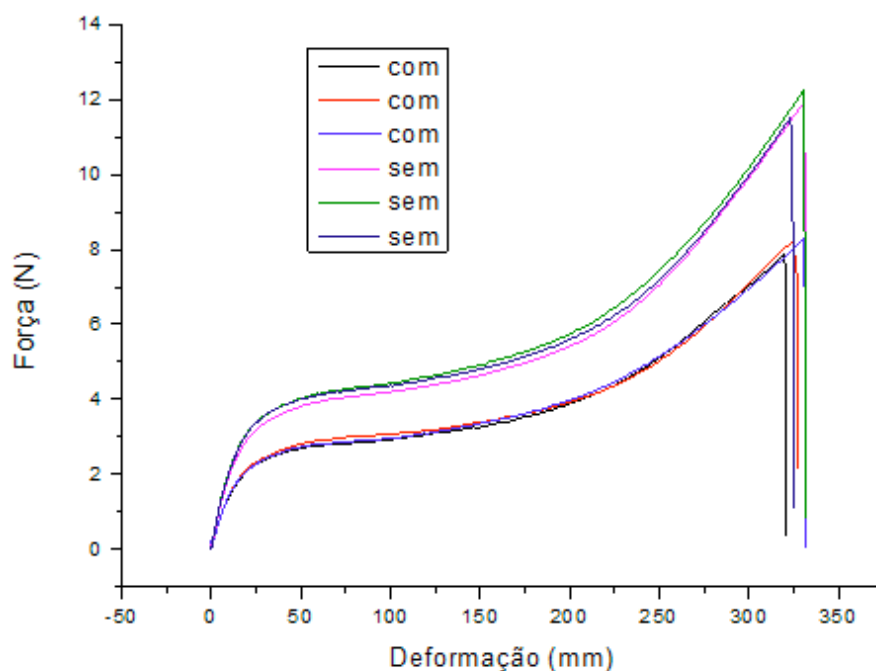


Fig. 5 Curva de força versus deformação de membranas de látex natural com e sem polilisina 0.1%

3.5 Teste de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade da membrana de látex natural com e sem PLL no crescimento de células-tronco mesenquimais foi realizado o método de redução do MTT. No controle negativo, as células foram tratadas com meio de cultura ALPHA-MEM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico/antimicótico, e representaram 100% de viabilidade celular. No controle positivo, as células não receberam tratamento, levando à morte celular, mensurando 0% de metabolismo do MTT. Membranas de látex natural (em suspensão) e MLN (aderidas à placa) expressaram valores semelhantes de viabilidade celular, 78.35% e 74.36% respectivamente. O percentual de viabilidade celular das amostras de MLN+P foi de 55.7% e o biofilme de PLL 25.85% (Figura 6).

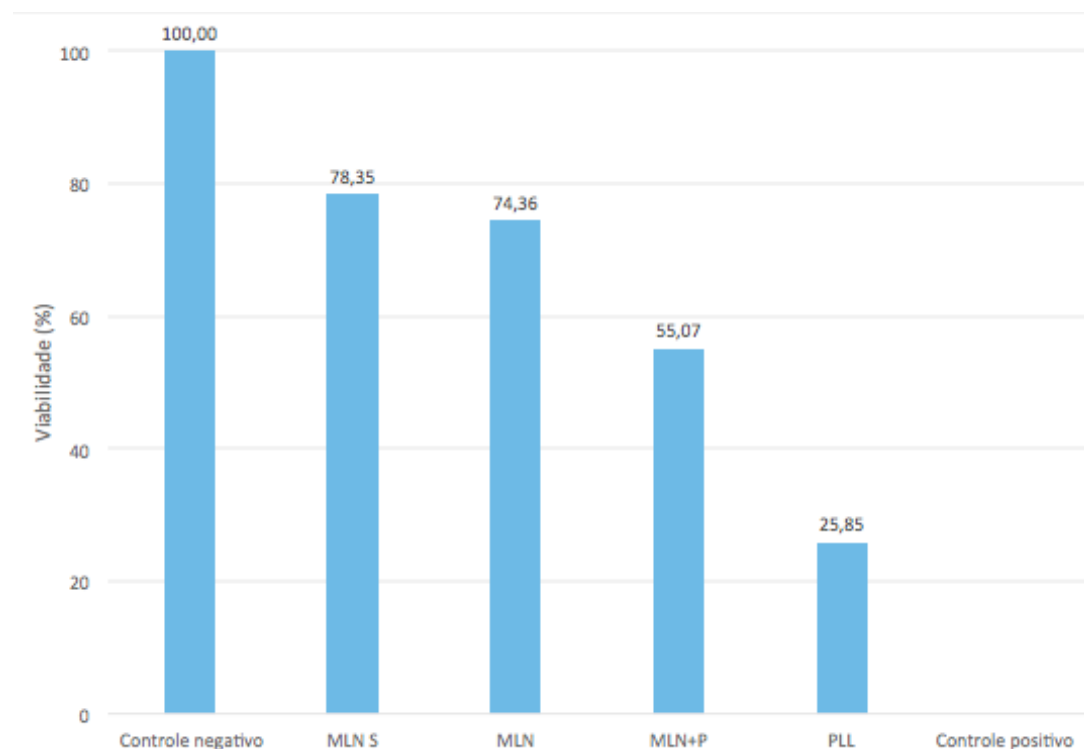


Fig. 6 Valores de viabilidade celular (%) em diferentes tipos de amostra; membrana de látex natural em suspensão (MLN S), membrana de látex natural puro (MLN), membrana de látex natural com polilisina (MLN+P) e polilisina pura (PLL).

4. Discussão

O racional para desenvolvimento deste estudo está alicerçado nos princípios da engenharia tecidual, que emprega tecidos e/ou células incorporados à biomateriais para regeneração e reparo de órgãos e tecidos lesados. Uma nova vertente metodológica, entanto, que se propõe com este estudo refere-se à associação de membranas de látex com células-tronco oriundas do tecido adiposo (ASC).

Muitos estudos relacionam a membrana de látex com à aceleração do processo cicatricial [8-11, 22, 25, 26], por outro lado há vasta literatura sobre a participação de ASC em processos regenerativos de diferentes

tecidos [12]. A associação de látex de seringueira com as ASC representam, neste contexto, uma convergência ou junção de conhecimentos teóricos e procedimentos metodológicos, que poderão resultar num somatório ou sinergismo de ação para o reparo tecidual e, como decorrência, conduzir a uma opção terapêutica para reparo de lesões, particularmente, das lesões cutâneas de difícil cicatrização, como aquelas decorrentes de neuropatias periféricas e diabetes melitus.

Os resultados permitiram validar que as células oriundas do tecido adiposo e mantidas em cultura, representavam células-tronco mesenquimais, com formação de colônias celulares alongadas e em formato de fuso e capacidade de adesão à superfície plástica. Além disso, células isoladas do tecido adiposo apresentaram, em condições específicas de indução, a capacidade de diferenciação *in vitro*, nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica. A Figura 2, evidencia a diferenciação das ASC por análise histoquímicas, de modo coerente com os critérios de validação adotados por diferentes autores e pela Sociedade Internacional de Terapia Celular [17, 21].

Deve-se enfatizar que no presente estudo empregou-se uma nova técnica para isolamento e cultivo das ASC. A técnica de dissociação mecânica, pioneiramente estabelecido por nosso laboratório [23]. A metodologia torna prescindível o emprego de colagenase (enzima proteolítica de origem bacteriana), comumente utilizada na digestão enzimática do tecido adiposo. Além disso, a dissociação mecânica torna o processo menos dispendioso e mais eficiente.

Os testes de tração realizados nas membranas mostraram que a composição pode influenciar no comportamento elástico do material. A diminuição da resistência mecânica observada ao agregar a PLL ao látex deve-se, possivelmente, à interação molecular entre o látex natural e a PLL, uma vez que não houve aumento de ligações cruzadas do compósito. Além disso, não houve alteração significativa da porcentagem de alongamento da membrana. Pode-se, portanto, intervir que, apesar da alteração no comportamento elástico do látex ao incorporar PLL, as amostras apresentam resistência suficiente para aplicação terapêutica. Em um estudo semelhante, Zimmermann et al. [24], compararam a resistência mecânica de dois diferentes tipos de membranas (látex puro e látex com enxofre e ácido fórmico) para substituição da bainha muscular em cães e avaliou que os modelos testados também apresentavam resistência suficiente para essa aplicação. Herculano [22], ao adicionar fármacos à membranas de látex observou que a resistência sofria alterações, porém, sem que houvesse interferência na aplicação como membrana oclusiva em tibia de coelhos.

A citotoxicidade das ASC cultivadas em associação com membranas de látex (MLN) revelou diferença de viabilidade celular quando comparada com o controle negativo (100% de viabilidade). Conforme se verifica na Figura 6, a incorporação de polilisina ao látex, reduz o número de células viáveis, como também se verifica com a utilização do biofilme de PLL. Em baixas concentrações, a PLL, é comumente empregada para facilitar a adesão celular à superfícies de crescimento [25, 26], porém, em alta concentração, pode adquirir um caráter tóxico [27]. Pinho [25] demonstra que a PLL 0.1% pode potencializar os efeitos de adesão celular à MLN, tornando

a superfície da membrana pouco irregular, o que favorece a expansão das células. Entretanto, ao comparar o implante da MLN com e sem PLL 0.1% na reparação de defeitos abdominais em ratos, Paulo et al. (2005) [26] não observaram diferença significativa de crescimento e adesão celular entre membranas tratadas ou não com PLL. Esse dados demonstram que, apesar da polilisina em baixas concentrações favorecer o crescimento e adesão celular, na concentração de 0.1% utilizada neste estudo, esse biopolímero apresentou alto índice de toxicidade às células. Portanto, concentração de PLL empregada deve ser reavaliada. Por outro lado, a MLN apresentou baixa toxicidade e pouca influência na viabilidade celular, possibilitando a associação com ASC.

5. Conclusão

Os resultados mostram que o isolamento de células-tronco por meio da dissociação mecânica do tecido adiposo é uma metodologia reprodutível e que os testes de validação mostram características compatíveis com ASC, conforme os critérios preconizados por diferentes autores e pela Sociedade Internacional de Terapia Celular [17, 21]. A técnica empregada para confecção das membranas de látex, obtidas de seringueira, mostrou reprodutibilidade e baixa toxicidade para as ASC.

A associação de látex de seringueira com as ASC, ainda que em fase inicial e de padronização das técnicas, representa uma abordagem interessante e potencialmente promissora, como nova opção terapêutica para reparo de lesões teciduais de diferentes etiologias, sobretudo das lesões cutâneas de difícil cicatrização.

Agradecimentos

Esse trabalho foi realizado com o apoio financeiro do CIVAP – Consórcio Intermunicipal do Vale do Paranapanema.

Referências

- [1] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. Science 1993;260(5110):920-6.
- [2] Zhu X, Cui W, Li X, Jim Y. Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering. Biomacromolecules 2008;9(7):1795-801.
- [3] Castro-Silva II, Coutinho LACR, Granjeiro JM. Revisão sistemática sobre o uso de células-tronco mesenquimais em terapias de perdas ósseas. Innov Implant J, Biomater Esthet 2010;5(3):29-34.
- [4] Esposito AR. Crescimento de fibrocondrócitos sobre arcabouço de PLDLA/PCL-T para aplicação como prótese de menisco. Campinas. Dissertação [Mestrado em Engenharia Mecânica] – Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP; 2010.
- [5] Lenza M, Ferraz SB, Viola DCM, Santos OFP, Neto MC, Ferretti M. Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. Einstein (São Paulo) 2013;11(1):122-7.
- [6] Iamaguti LS, Brandão CVS, Mota LSLS, Ranzani TTJ, Ribeiro LM, Rossetto VJV, Padovani CR, Felisbino SL. Implante de condrócitos homólogos em defeitos osteocondrais de cães: padronização da técnica e avaliação histopatológica. Arq Bras Med Vet Zootec 2013;65(1):82-90.

[7] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J* 2013;49(4):780–92

[8] Mrué F. Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex: estudo experimental em cães. Ribeirão Preto. Dissertação [Mestrado em Medicina] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 1996.

[9] Mrué F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina: aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Medicina] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2000.

[10] Silva EB, Maniscalco CL. Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido. *Semina: Ciências Agrárias* 2013;34(2):785-92.

[11] Ganga MVM, Coutinho-Netto J, Colli BO, Junior WM, Catalão CH, Santana RT, Oltramari MRP, Carraro KT, Lachat JJ, Lopes LS. Sciatic nerve regeneration in rats by a nerve conduit engineering with a membrane derived from natural latex. *Acta Cir Bras* 2012;27(12):885-91.

[12] Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009;76(2):56-66.

[13] Cheng NC, Chang HH, Tu YK, Young TH. Efficient transfer of human adipose-derived stem cells by chitosan/gelatin blend films. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100(5):1369-77.

- [14] Locke M, Feisst V, Dunbar PR. Concise Review: Human adipose-derived stem cells: Separating promise from clinical need. *Stem Cells* 2011;29(3):404-11.
- [15] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28
- [16] Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen M.* 2008;2(4):169-83.
- [17] Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células- tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009;31(Supl 1):25-35.
- [18] Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008;45(2):115-20.
- [19] Pereira-Junior OCM, Rahal SC, Lima Neto JF, Landim-Alvarenga FC, Monteiro FOB. In vitro evaluation of three different biomaterials as scaffolds for canine mesenchymal stem cells. *Acta Cir Bras* 2013;28(5):353-60.
- [20] Kim IL, Khetan S, Baker BM, Chen CS, Burdick JA. Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct MSC chondrogenesis through mechanical and adhesive cues. *Biomaterials* 2013;34(22):5571-80.
- [21] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining

multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.

[22] Herculano RD. Desenvolvimento da membrana de látex natural para aplicação médica. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Ciências] – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP; 2009.

[23] Fuoco NL. Proposição de uma nova metodologia para isolamento e expansão de células-tronco derivadas de tecido adiposo. Assis. Monografia [Graduação em Ciências Biológicas] - Faculdade de Ciências e Letras da UNESP; 2011.

[24] Zimmermann M, Raiser AG, Barbosa ALT, Novosad D, Steffen, RPB, Lukarsewsk R, Silva MS, Lindinger R, Pastore-Junior F. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. *Cien Rural* 2007;37(6):1719-23.

[25] Pinho ECCM. O uso da Biomembrana de Látex Natural comparado ao Transplante Conjuntival Autólogo na superfície ocular. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Ciências Médicas] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2011.

[26] Paulo NM, Lima FG, Siqueira-Júnior JT, Fleury LFF, Sant'Anna FJF, Borges AC, Telles, TC. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilisina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. *Acta Cir Bras* 2005;20(4):305-10.

[27] Lu H, Guo L, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. Effects of poly(L-lysine),

poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) on the adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 2009;20(5-6):577-89.