

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

FERNANDA GIMENEZ DE SOUZA

**ESTUDO *IN VITRO* DA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO EM CONTATO COM MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA**

CURITIBA

2016

FERNANDA GIMENEZ DE SOUZA

**ESTUDO *IN VITRO* DA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO EM CONTATO COM MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz Luci Fernandes
Coorientador: Dr. Julio Cesar Fernandes

CURITIBA

2016

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

S729e
2016

Souza, Fernanda Gimenez
Estudo in vitro da proliferação e diferenciação de células-tronco em contato com membrana de plasma rico em fibrina / Fernanda Gimenez de Souza ; orientadora: Beatriz Luci Fernandes ; coorientador: Julio Cesar Fernandes. – 2016.
61 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016
Bibliografia: f. 51-56

1. Células-tronco. 2. Cartilagem hiliar. 3. Membrana celular. 4. Fibrina. I. Fernandes, Beatriz Luci. II. Fernandes, Julio Cesar. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 616.02774



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Politécnica
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 237

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA EM SAÚDE

Aos 31 dias do mês de agosto de 2016, no Auditório Bento Munhoz da Rocha Neto, realizou-se a sessão pública de Defesa da Dissertação: "**Estudo in vitro da proliferação e diferenciação de células-tronco humanas em contato com membrana de plasma rico em fibrina**", apresentada pela aluna **Fernanda Gimenez de Souza** sob orientação da **Profª. Drª. Beatriz Luci Fernandes** e coorientação do **Prof. Dr. Julio Cesar Fernandes**, como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Tecnologia em Saúde**, perante uma Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Drª. Beatriz Luci Fernandes,
PUCPR (Presidente)


(assinatura)

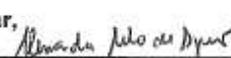
APROVADO
(Aprov/Reprov.)

Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii,
PUCPR (Examinador)


(assinatura)

Aprovado
(Aprov/Reprov.)

Profª. Drª. Alessandra Melo de Aguiar,
FIOCRUZ (Examinador)


(assinatura)

Aprovado
(Aprov/Reprov.)

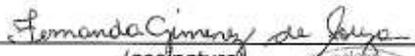
Início: 14h Término: 15h30

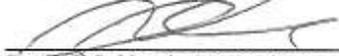
Conforme as normas regimentais do PPGTS e da PUCPR, o trabalho apresentado foi considerado APROVADO (aprovado/reprovado), segundo avaliação da maioria dos membros desta Banca Examinadora.

Observações: _____

O(a) aluno(a) está ciente que a homologação deste resultado está condicionada: (I) ao cumprimento integral das solicitações da Banca Examinadora, que determina um prazo de 60 dias para o cumprimento dos requisitos; (II) entrega da dissertação em conformidade com as normas especificadas no Regulamento do PPGTS/PUCPR; (III) entrega da documentação necessária para elaboração do Diploma.

ALUNO(A): Fernanda Gimenez de Souza


(assinatura)


Profª. Drª. Marcia Regina Cubas,
Coordenadora do PPGTS PUCPR



Aos meus pais, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência.

A realização de um projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de vários colaboradores. Aos membros dos laboratórios de Cultivo Celular e de Patologia Experimental (PUCPR), que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, o meu reconhecimento e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Beatriz Luci Fernandes, pela confiança e sua disponibilidade e obrigada por me ensinar o compromisso em contribuir para a ciência.

À Dr.^a Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto e sua equipe do laboratório de Cultivo Celular pela disponibilidade e paciência em me ensinar os protocolos dos ensaios testados.

À Dr.^a Alessandra Aguiar e ao Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná por disponibilizar o equipamento Operetta[®] (Perkin Elmer[®]) e contribuir com as leituras das placas de cultivo celular.

Às biomédicas Duaila Ledur e Juliana Wenceslau, da Clínica BmdCon, em acompanhar nossos experimentos e preparar as membranas de fibrina.

Aos biólogos Ana Paula Camargo, Marina Azevedo e Seigo Nagashima em contribuir na área histológica deste estudo.

À Izelde Angheben do Nascimento, secretária do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde, pela atenção e auxílio durante o mestrado.

À minha família, meus pais e irmã agradeço por todo incentivo mesmo à distância e por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

Agradeço a todos que direta e indiretamente participaram de alguma forma da realização desta importante etapa da minha vida.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende com a vida e com os humildes.”

(Cora Coralina)

RESUMO

Introdução: A busca por tratamentos cirúrgicos ou não cirúrgicos que melhorem ou que restaurem a longo prazo as funções do tecido cartilaginoso danificado pela osteoartrite (AO), é um tema de enorme interesse na área de engenharia de tecidos, que investiga soluções combinando células-tronco, biomateriais e fatores de crescimento. Para tanto, o plasma rico em fibrina (PRF) surge como uma alternativa capaz de aumentar a proliferação e diferenciação celular e apresenta vantagens em relação aos tratamentos convencionais, devido a sua facilidade de obtenção, ser autólogo e possuir grande quantidade de fatores de crescimento. **Objetivo:** Obter as membranas de PRF e avaliar sua capacidade em proliferar e diferenciar células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (CTDAh). **Métodos:** As membranas foram obtidas por centrifugação de sangue periférico em tubo sem anticoagulantes, e após extração do exsudado foram cortadas, e mantidas dentro de poços de placa de cultivo por 48h para preparação do eluato de fibrina. Para o ensaio de proliferação e diferenciação celular foram usadas células-tronco isoladas de tecido adiposo (CTDAh), que foram obtidas por digestão com solução de colagenase, caracterizadas por citoquímica e citometria de fluxo, e expandidas *in vitro*. As CTDAh foram cultivadas com eluato de fibrina de dois doadores, e após 3 dias marcadas com BrdU para avaliação quantitativa com sistema de imagens High-Content Operetta[®]. Para o ensaio de diferenciação condrogênica as CTDAh foram cultivadas em micromassa por 21 dias, e marcadas em azul de toluidina e agrecan para avaliação qualitativa em microscópio. **Resultados:** As membranas apresentaram macro e microscopicamente as regiões caracterizadas por área do trombo vermelho, mista e rede de fibrina. As células cultivadas e mantidas com o eluato de fibrina foram positivas para o marcador BrdU, caracterizando proliferação celular, onde o teste ANOVA apontou significância ($p < 0,001$), e o pós-teste de Tukey ($n=6$) evidenciou que os grupos que receberam o eluato de fibrina tiveram maior proliferação em relação ao grupo controle. A diferenciação condrocítica foi visualizada pela expressão de mucopolissarídeos e agrecana das células marcadas em azul de toluidina e agrecana. **Conclusão:** O protocolo empregado com o eluato da membrana de fibrina foi capaz de proliferar as CTDAh, assim como induzi-las ao início de diferenciação em condrócitos, sugerindo uma potencial aplicação do plasma rico em fibrina em terapias de regeneração celular. Entretanto, é necessário a utilização de mais doadores para confirmar nossos resultados.

Palavras chave: membrana de PRF; cartilagem hialina; regeneração de cartilagem.

ABSTRACT

Introduction: The search for surgical or non-surgical treatments that improve or restore long-term functions of cartilage tissue damaged by osteoarthritis (AO) is a topic of great interest in the field of tissue engineering, which investigates solutions combining stem cells, biomaterials and growth factors. Platelet-rich fibrin (PRF) appears as an alternative, increases cell proliferation and differentiation, and presents advantages over conventional treatments due to its ease of obtaining, being autologous and possessing a great amount of growth factors. **Objective:** To evaluate the capacity from the eluate PRF membrane to induce proliferation and differentiation of isolated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASCs), and chondrocytes. **Methods:** PRF membranes were obtained by centrifugation of peripheral blood from two healthy donors, cut, and maintained in culture plate wells for 48 h to prepare the fibrin eluate. The ASCs were isolated from adipose tissue by collagenase digestion solution, and expanded *in vitro*. Cells were expanded and treated with DMEM-F12 culture, media commercial for chondrogenic differentiation and eluate fibrin for three days and labeled with BrdU for quantitative assessment of cell proliferation using Hight-Content Operetta[®] imaging system. For chondrogenic differentiation assay the ASCs were grown in micromass for 21 days and stained with toluidine blue and aggrecan for qualitative evaluation by light microscopy. The statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey tests. **Results:** The cultivated cells maintained in the fibrin eluate were positive for BrdU labeling, characterizing cell proliferation, with ANOVA test significance ($p < 0.001$). The differentiation into chondrocytes was visualized by mucopolissarideos expression of the cells marked in blue toluidine and aggrecan. **Conclusion:** Treatment with the eluate fibrin membrane stimulated cell proliferation and induce differentiation of stem cells into chondrocytes, suggesting potential application of PRF membrane in hyaline cartilage regeneration therapies. However, more donors are needed to confirm our results.

Keywords: PRF membrane; hyaline cartilage; cartilage regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Regiões microscópicas da cartilagem hialina.....	17
Figura 2. Regiões da cartilagem articular saudável.....	18
Figura 3. Classificação de defeitos em cartilagem Outerbridge	21
Figura 4. Articulação de joelho	23
Figura 5. Técnicas de reparação da cartilagem	25
Figura 6. Técnica de retirada de pedaços de cartilagem saudável	26
Figura 7. Produto obtido pela técnica de Choukroun	30
Figura 8. Organograma das etapas da pesquisa.	34
Figura 9. Preparação da membrana de Plasma Rico em Fibrina (PRF)	35
Figura 10. Etapas da preparação do eluato de fibrina usado em cultivo celular	37
Figura 11. Esquema da placa de cultivo de CTDAh com o eluato de PRF	38
Figura 12. Membrana de plasma rico em fibrina	41
Figura 13. Membrana de fibrina mostrando as três regiões	42
Figura 14. Análise microscópica da membrana de fibrina.....	42
Figura 15. Membranas de PRF depois de extraído o exsudado	43
Figura 16. Gráficos com o total de células marcadas e porcentagem de células em proliferação.....	45
Figura 17. Resultado da proliferação das células-tronco com eluato de fibrina	46
Figura 18. Avaliação microscópica do ensaio de diferenciação condrogênica.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituição da cartilagem hialina.....	17
Tabela 2 – Componentes ativos do PRF.....	31
Tabela 3 – Número total de núcleos marcados.....	44
Tabela 4 – Porcentagem de células marcadas com BrdU em proliferação celular ...	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACI	Implante Autólogo de Condrócitos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMAC	Aspirado Concentrado da Medula Óssea
BrdU	Bromodeoxiuridina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTDAhs	Células-Tronco Derivadas do Tecido Adiposo humano
CTMs	Célula-Tronco Mesenquimais
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Fator de Crescimento Endotelial
FC	Fibras de Colágeno
FG	Cola de Fibrina
GAG	Glicosaminoglicano
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metalopeptidase
MNCs	Células Mononucleares
MPMs	Metaloproteinases da Matriz
MR	Medicina Regenerativa
OA	Osteoartrite
PBS	Solução Salina Fosfatada
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PG	Proteoglicanos
PRF	Plasma Rico em Fibrina
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SFB	Soro Fetal Bovino
TA	Tecido Adiposo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Crescimento Beta
TBS	Tampão Salina Tris
TIMPs	Inibidores de Metaloproteinases Tissulares
VEGF	Fator de Crescimento Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo Geral	15
1.1.2	Objetivos Específicos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CARTILAGEM HIALINA ARTICULAR	16
2.2	DEFEITOS NA CARTILAGEM ARTICULAR E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	21
2.3	MEMBRANA DE PRF COMO BIOMATERIAL NATURAL	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	DELIMITAÇÃO DO ESTUDO	33
3.2	PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE FIBRINA	34
3.3	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	35
3.3.1	Isolamento e expansão das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh)	35
3.3.2	Preparação do eluato do plasma rico em fibrina (PRF)	37
3.3.3	Cultivo das CTDAh com o eluato de PRF	37
3.3.4	Marcação das células com bromodeoxiuridina (BrdU) e avaliação da proliferação celular	38
3.3.5	Análise estatística do ensaio de proliferação	39
3.4	AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS EM CONDRÓCITOS	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	AVALIAÇÃO DA MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF)	41
4.2	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	43
4.3	DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA.....	48
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento de novas tecnologias em diversas áreas da ciência, juntamente com melhores investimentos em saneamento básico, campanhas de promoção de saúde e melhor nível educacional da população, trouxeram um aumento importante na expectativa de vida da população em todo mundo. Estima-se que o número de habitantes de terceira idade (mais de 65 anos) triplicará até 2.060, e o número de habitantes com mais de 85 anos será multiplicado por seis, em relação aos dados de 2012. O primeiro grupo gera, normalmente, custos sociais quatro a seis vezes maiores do que os de idades inferiores, enquanto que o segundo grupo consome 20 vezes mais custos da assistência médica e duas vezes mais internação hospitalar do que o primeiro. Doenças degenerativas são a principal causa dessa carga social (BOROJEVIC, 2012). Dentre essas doenças, a degradação do tecido cartilaginoso articular, processo conhecido como osteoartrite ou osteartrose (OA), é uma das mais ocorrentes (FULLER, 2007; PUCINELLI et al., 2010).

A cartilagem é um tecido especializado que aumenta a congruência, protege o osso subcondral de altas tensões e reduz o atrito nas extremidades articulares dos ossos longos. Estas propriedades se devem pelo tecido cartilagíneo ser composto basicamente por água (60% de sua massa) e por uma matriz formada por proteoglicanos (PG) e fibras de colágeno (FC) tipo II, ambos sintetizados pela célula fundamental da cartilagem, o condrócito (NARANJO; ZAPATA, 2011).

A funcionalidade da cartilagem depende da integridade da sua matriz extracelular (MEC) e do arranjo de seus componentes moleculares. O equilíbrio dinâmico da cartilagem articular saudável é mantida e fortemente controlada por fatores de crescimento anabólicos, citocinas, metaloproteinases da matriz (MPMs) e inibidores de metaloproteinases tissulares (TIMPs). O desbalanceamento entre a síntese e a degradação leva à perda progressiva dos componentes macromoleculares da MEC (MYERS; SGAGLIONE; GRANDE, 2013). A susceptibilidade da cartilagem articular à progressão para a OA é devida à sua capacidade limitada de autoregeneração causada pela baixa atividade mitótica dos condrócitos e pela sua natureza avascular (MYERS; SGAGLIONE; GRANDE, 2013; BETSCH et al., 2013).

Em grandes articulações que são submetidas a atrito e que suportam peso, os defeitos na cartilagem não se regeneram espontaneamente necessitando de intervenção terapêutica. Os tratamentos convencionais disponíveis para reparar defeitos de cartilagens como as abordagens não cirúrgicas de injeção de glucosamina, esteróides e ácido hialurônico, ou tratamento cirúrgico como o debridamento, apenas aliviam a dor e não restauram a superfície articular (PEI et al., 2013).

As técnicas tradicionais são, portanto, paliativas. Lavagem e condroplastia promovem alívio sintomático da dor sem formação de tecido hialino. Essas técnicas removem a camada superficial da cartilagem, o que inclui as fibras de colágeno que são responsáveis pela resistência mecânica, criando um tecido cartilaginoso com funcionalidade inferior. A técnica de debridamento subcondral ou microfratura tem sido considerada como estimulante para a produção de tecido semelhante ao hialino com propriedades e durabilidade comparáveis à cartilagem normal. No entanto, tem-se observado que, em muitos casos, ocorre a formação de tecido fibrocartilaginoso que se degenera com o tempo. Transplante osteocondral autólogo e mosaicoplastia (autotransplante de cartilagem) podem restaurar o tecido cartilaginoso, mas suas aplicações são restritas a pequenos defeitos e existem algumas preocupações em relação à morbidade do local doador (GOBBI et al., 2011). O tratamento da OA e dos defeitos locais da cartilagem articular permanece um desafio. Não existem, atualmente, tratamentos cirúrgicos ou não cirúrgicos que sejam curativos ou que resultem na reparação ou restauração da superfície danificada.

Portanto, de acordo com o exposto, os métodos de tratamento atuais não fornecem um resultado satisfatório em longo prazo, o que impulsiona investigações em abordagens inovadoras na área da engenharia de tecidos, as quais são estratégias promissoras para a reparação de lesões das cartilagens articulares combinando células-tronco, biomateriais e fatores de crescimento (GE et al., 2012; FEDOROVICH et al., 2011).

Essas abordagens estão vinculadas à Medicina Regenerativa (MR) definida, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como “atividade que aplica os princípios da engenharia e das ciências da saúde para a obtenção de substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções de órgãos e tecidos do corpo humano”.

Dentro desta definição encontram-se os biomateriais naturais autólogos conhecidos como a membrana de fibrina. A membrana de fibrina pode ser facilmente isolada do plasma rico em fibrina (PRF) proveniente do sangue periférico do próprio paciente. O sangue venoso extraído é centrifugado e as células vermelhas depositadas na base do tubo são descartadas. Plasma pobre em plaquetas compõe o sobrenadante e na porção intermediária é formada uma membrana densa de PRF que pode ser prontamente usada depois de exsudada. Tanto o PRF exsudado quanto o plasma pobre em plaquetas contêm quantidade significativa de fatores de crescimento como: transformador ($TGF\beta-1$); derivado de plaqueta (PDGF-AB); epidermal (EGF); endotelial vascular (VEGF), etc, além de matriz de glicoproteínas, particularmente, fibronectina e vitronectina, duas proteínas chave para permitir o contato célula-matriz extracelular (DEL CORSO; TOFFLER; EHRENFEST, 2010).

A membrana de fibrina, portanto, é um biomaterial natural autólogo rico em glicoproteínas e em fatores de crescimento, de fácil preparação e de baixo custo. Por ser autólogo, não existe risco de infecção ou do desencadeamento de processos autoimunes. Por isso, o presente trabalho propôs o estudo *in vitro* da capacidade da membrana de fibrina em proliferar células-tronco humanas adultas e em diferenciá-las em condrócitos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da membrana de plasma rico em fibrina em proliferar e diferenciar células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (CTDAh).

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Obter as membranas de plasma rico em fibrina (PRF);
- b) Avaliar o efeito da membrana de PRF na proliferação celular nas células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (CTDAh);
- c) Avaliar a capacidade da membrana de PRF em induzir a diferenciação das CTDAh em condrócitos.

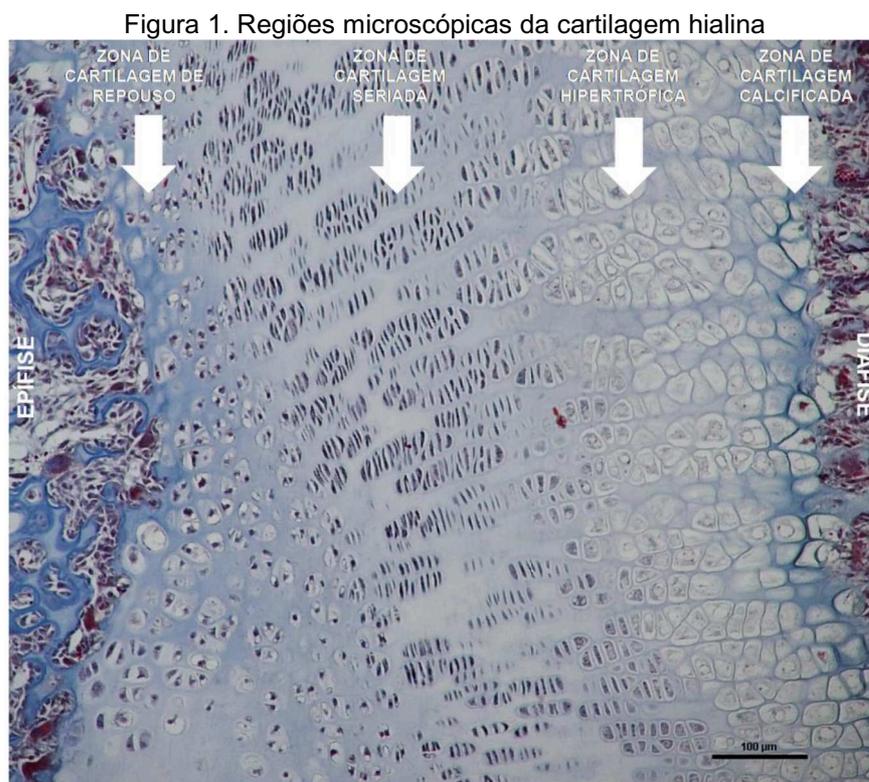
2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão da literatura aborda aspectos importantes para o entendimento do processo de cicatrização do tecido cartilaginoso. Inicialmente, é realizada uma breve descrição da cartilagem hialina e dos componentes que a definem, assim como o que leva ao seu processo de degeneração. Em seguida, são apresentadas as informações da literatura em relação ao PRF e aos fatores de crescimento associados ao plasma sanguíneo que afetam diretamente os processos de cicatrização dos tecidos vivos e são importantes, portanto, para o processo de regeneração do tecido cartilaginoso.

2.1 CARTILAGEM HIALINA ARTICULAR

A cartilagem hialina é a estrutura mais importante das articulações por ter a função de proteger as superfícies articulares. Essa estrutura forma uma superfície lisa e lubrificada impedindo que ocorra a abrasão entre as partes em movimento e auxiliando na distribuição das tensões durante os carregamentos cíclicos da marcha (KHEIR; SHAW, 2009).

Por ser o tipo de cartilagem mais encontrado no corpo humano, e, por isso, o tecido mais estudado, é visto a fresco (*in vivo*) com uma coloração branco-azulada e translúcida. A figura 1 mostra microscopicamente a cartilagem hialina presente entre a diáfise e epífise dos ossos longos em crescimento, correspondendo ao disco epifisário, que é responsável pelo crescimento do osso em extensão. É possível visualizar quatro distintas regiões da cartilagem hialina: de repouso; seriada, com grupos de condrócitos em proliferação; hipertrófica, com condrócito envolto por lacuna; e por fim, zona de cartilagem calcificada, onde está apenas a lacuna (STOCKWELL, 1967; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).



Fonte: A autora, 2016. Aumento de 10x, Coloração: Trocrocômico de Mallory (adaptado de Junqueira; Carneiro, 2013)

Este tecido é resistente, elástico, flexível e composto por células diferenciadas (condrócitos) inseridas em uma matriz de fibras colágenas tipo II e proteoglicanos (PG) e envoltas por água e matriz extracelular (BUCKWALTER, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A espessura da cartilagem está entre 1 e 2 mm, dependendo da articulação a que está vinculada (SUH et al., 1995). A constituição da cartilagem hialina é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Constituição da cartilagem hialina.

Constituinte	Componente	(% massa)
Líquido	Água	70
Células	Condrócitos	5
	Glicoproteínas adesivas	5
Sólidos (MEC)	Glicosaminoglicanos (GAG)	20
	Colágeno tipo II	75

Fonte: (SUH et al., 1995; KHEIR; SHAW, 2009).

A integridade funcional do tecido cartilaginoso hialino, que funciona como uma mola biomecânica para absorção de choques mecânicos resulta do arranjo entre

condrócitos e MEC, que possui alto conteúdo de água de solvatação das moléculas de glicosaminoglicanos (GAG). Outro componente fundamental na estrutura da matriz da cartilagem hialina é a condronectina, uma glicoproteína de associação do arcabouço macromolecular da matriz com os condrócitos (BUCKWALTER, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A cartilagem articular é formada por quatro regiões: superficial, mediana, profunda e região calcificada. Cada região é dividida em três outras regiões: pericular, matriz territorial e matriz interterritorial, como ilustra a figura 2 (FOX; BEDI; RODEO, 2009).

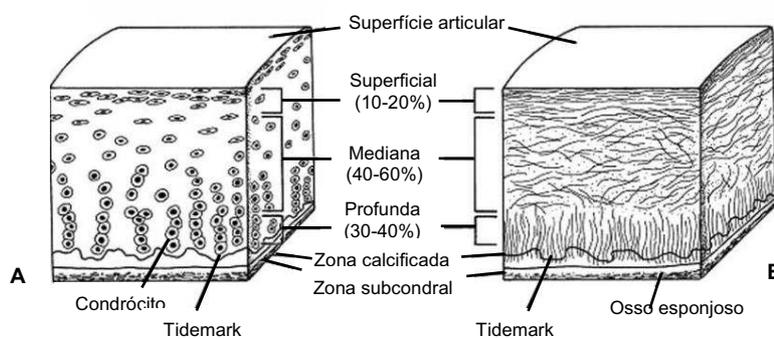


Figura 2. Regiões da cartilagem articular saudável
(A) organização celular e **(B)** arquitetura das fibras de colágeno
 (Adaptado de Fox; Bedi; Rodeo, 2009).

Como pode ser visto pela Figura 2, a fina região superficial ou tangencial protege as camadas mais internas das tensões cisalhantes e está diretamente em contato com o líquido sinovial. Nesta região, as fibras de colágeno, principalmente do tipo II e IX, estão fortemente empacotadas e alinhadas paralelamente à superfície articular e os condrócitos se apresentam achatados. Logo abaixo, encontra-se a região mediana (transicional) que fornece uma ponte anatômica e funcional entre a região superficial e a profunda, e contém PGs e fibras finas de colágeno organizadas obliquamente em relação à superfície e os condrócitos, em baixa densidade, são arredondados. Esta camada é a principal responsável pela resistência à compressão. A camada profunda, onde os condrócitos são arranjados em colunas paralelas, as fibras de colágeno são perpendiculares à linha da articulação, contém fibras de colágeno com o maior diâmetro em posição radial, maior quantidade de PGs e menor quantidade de água (FOX; BEDI; RODEO, 2009).

Os PGs são os responsáveis pela alta resistência à compressão das cartilagens hialinas. Nas cartilagens saudáveis os monômeros de PGs estão predominantemente ligados às cadeias de ácido hialurônico por uma proteína, formando agregados de alta massa molecular. Em meio hidratado os agregados de PG tornam-se negativamente carregados, sendo solvatados pelas moléculas de água e, portanto, mantendo o conteúdo de água na cartilagem, o que aumenta a resistência à compressão. As fibras de colágeno estão mais relacionadas a resistência à tração (SUH et al., 1995).

Finalmente, a zona calcificada tem um papel fundamental na adesão da cartilagem no osso, ancorando as fibras de colágeno da região profunda ao osso subcondral. Nesta zona, os condrócitos são hipertróficos (FOX; BEDI; RODEO, 2009).

Os condrócitos são células altamente especializadas e metabolicamente ativas que sintetizam grande volume de componentes da MEC como colágeno, PG e hialurano. As atividades metabólicas dos condrócitos se alteram por vários fatores, dentre eles os fatores de crescimento pró-inflamatórios que têm efeitos anabólicos e catabólicos. No entanto, os mecanismos como esses fatores afetam a síntese e degradação dos componentes da MEC são pouco conhecidos. Por estarem envolvidos por um tecido não vascularizado, os condrócitos dependem da difusão de oxigênio e nutrientes vindos da superfície articular (AKKIRAJU; NOHE, 2015).

Devido ao baixo conteúdo de oxigênio do meio no qual se encontram os condrócitos e a sua baixa atividade mitótica, além da falta de vascularização, de nervos e de vasos linfáticos, a cartilagem articular possui capacidade de autoreparo limitada (BETSCH et al., 2013).

Uma vez que as cartilagens são desprovidas de capilares sanguíneos, a oxigenação dos condrócitos é deficiente, vivendo essas células em baixas tensões de oxigênio. A cartilagem hialina degrada a glicose principalmente por mecanismo anaeróbico, com formação de ácido láctico como produto final. Os nutrientes trazidos pelo sangue atravessam o pericôndrio, penetram na matriz da cartilagem e vão até os condrócitos mais profundos. Os mecanismos dessa movimentação de moléculas são principalmente difusão através da água de solvatação das macromoléculas e o bombeamento promovido pelas forças de compressão e descompressão exercidas sobre as cartilagens. A falta de capilares sanguíneos

limita a espessura máxima das cartilagens (BUCKWALTER, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O outro importante componente da cartilagem, o colágeno, é um biopolímero fibroso e está presente principalmente em tecidos que sofrem estresse mecânico, como o cartilaginoso. Sendo um dos elementos estruturais básicos da MEC, o colágeno age não só como um arcabouço para o apoio estrutural do tecido, mas também como uma substância para a regulação do comportamento celular incluindo adesão celular, migração e diferenciação (DING, et al., 2014; WANG, 2013; VAN DER REST; GARRONE, 1991).

O colágeno constitui uma família de proteínas alongadas que compreende mais de uma dúzia de tipos, dos quais quatro são mais conhecidos, que foram rotulados de I a IV. As moléculas de colágeno são constituídas por três polipeptídeos dispostos em tripla hélice de, aproximadamente, 1.000 aminoácidos cada polipeptídeo (VAN DER REST et al., 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Estas triplas hélices podem associar-se entre si formando estruturas com graus crescentes de polimerização. Nos colágenos tipos I, II e III, as moléculas associam-se paralelamente formando fibrilas visíveis somente com auxílio de microscópio eletrônico, com o diâmetro oscilando entre 20 e 30 nm. No colágeno tipo II, a polimerização estaciona na fase de fibrila, como se observa nas cartilagens (VAN DER REST; GARRONE, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O colágeno tipo II é característico das cartilagens e se associa intimamente com proteoglicanas contendo condroitina sulfatada, que lhe emprestam uma característica de compressibilidade reversível devido à alta hidrofília das proteoglicanas. Faz, portanto, o papel de uma mola de natureza físico-química, característica essa, importante para as cartilagens de articulações sujeitas a cargas compressivas (VAN DER REST; GARRONE, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.2 DEFEITOS NA CARTILAGEM ARTICULAR E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

A classificação mais utilizada das lesões em cartilagem foi desenvolvida por Outerbridge (KHEIR; SHAW, 2009), Figura 3.

O envelhecimento afeta significativamente a capacidade dos condrócitos em se proliferarem, em responderem aos estímulos anabólicos e em sintetizar alguns tipos de PGs (BUCKWALTER; MANKIN; GRODZINSKY, 2005). Além disso, a quebra de PGs leva a redução na rigidez compressiva o que acelera a taxa de perda de colágeno (AKKIRAJU; NOHE, 2009).

O envelhecimento, portanto, limita a habilidade dos condrócitos em manter e restaurar o tecido cartilaginoso, contribuindo para a sua degeneração (BUCKWALTER; MANKIN; GRODZINSKY, 2005). Mesmo quando a cartilagem hialina é reparada, o tecido predominante é a fibrocartilagem, que é mecânica e quimicamente inferior ao tecido original (KHEIR; SHAW, 2009).

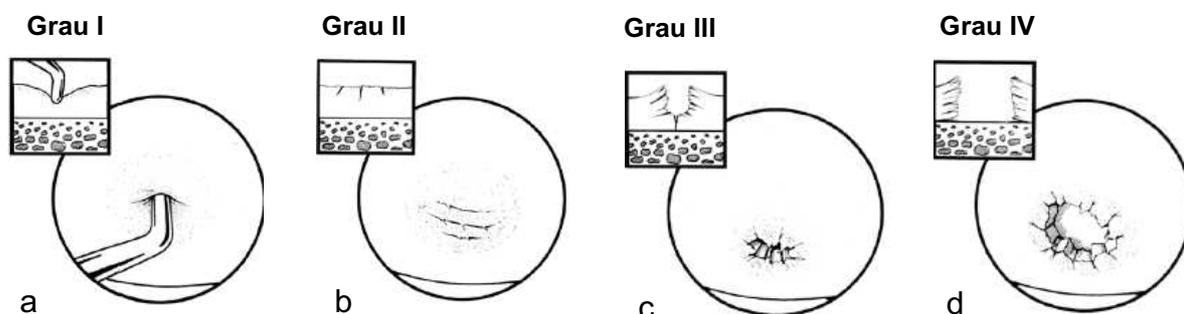


Figura 3. Classificação de defeitos em cartilagem Outerbridge
(a) grau I: macia e inchada; **(b)** grau II: defeito parcial na espessura com fissuras superficiais que não excedem 1,5 cm; **(c)** grau III: fissuras no nível do osso subcondral com diâmetro maior do que 1,5 cm; **(d)** grau IV: exposição do osso subcondral (Adaptado de Kheir e Shaw, 2009).

A osteoartrite (OA) é o tipo de doença degenerativa da cartilagem mais comum, seguida pela artrite reumatóide. OA é caracterizada pela degradação progressiva da cartilagem tornando-a macia e favorecendo a sua erosão (AKKIRAJU; NOHE, 2009). A degradação pode ter início como resposta a estímulos metabólicos, genéticos, vasculares e traumáticos e, frequentemente, está associada a um único episódio de excesso de carga na articulação ou a vários episódios de cargas cíclicas de pequena magnitude (FILHO et al., 2012). Além da erosão da

cartilagem no osso subcondral, o fluído sinovial e a membrana sinovial também exercem papel importante na progressão da OA, pois a formação de osteófitos, o remodelamento do osso subcondral e a inflamação da membrana sinovial podem contribuir para a degradação do tecido cartilaginoso (AKKIRAJU; NOHE, 2009).

Embora o processo da formação da OA não seja totalmente entendido, as alterações no comportamento dos condrócitos parece ser o principal foco para o seu progresso. Diferentes fases da doença podem ser encontradas na mesma articulação em diferentes locais, criando uma mistura de processos e de reações celulares (VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2012).

Na cartilagem articular saudável, a hipertrofia dos condrócitos é bloqueada, dentre outros fatores de crescimento, pelo fator de crescimento transformador TGF- β . Durante o envelhecimento, o comportamento dos condrócitos se altera e um grupo de células adquire fenótipo de condrócitos hipertróficos, produzindo metalopeptidase MMP13. Além disso, a enzima HtrA1 envolvida na degradação da matriz pericelular e encontrada nos estágios iniciais da OA é um potente bloqueador do TGF- β . Quais células serão afetadas e quando, depende de algumas variáveis como a constituição genética, as cargas na articulação, a arquitetura da articulação, a presença de estímulos inflamatórios e outras variáveis aleatórias. A liberação e ativação de HtrA1, MMP13 e agrecanases levam à degradação da matriz pericelular e intercelular. A liberação local de PGs faz com que o colágeno se torne mais vulnerável à degradação proteolítica, influenciando biomecanicamente o meio e estimulando a hipertrofia dos condrócitos (VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2012).

Adicionalmente, a ativação sinovial desencadeada pelos produtos associado à degradação da cartilagem levam à produção de citocinas e fatores de crescimento inflamatórios que, por sua vez, alimentam o processo de degradação. Esse estado inflamatório atrai células inflamatórias como macrófagos que estimulam fibrose sinovial. Em cartilagens severamente danificadas, são encontrados agrupamentos de condrócitos e nas margens da articulação, células inflamatórias infiltradas e fibrose. O osso subcondral se torna esclerótico e apresenta cistos (VAN DER KRAAN; VAN DEN BERG, 2012).

Por ser um processo complexo, as intervenções terapêuticas atuais na OA apenas previnem ou retardam o seu desenvolvimento que atinge, em maior número, a cartilagem articular do joelho (BETSCH et al., 2013), Figura 4. O joelho, a maior

articulação sinuial do corpo humano, é uma articulação diartrodial, sendo esta formada pelas superfícies articulares tibiofemoral e patelofemoral. Os três compartimentos do joelho são revestidos por cartilagem articular hialina, e, além disso, são formados pelo compartimento medial e o lateral tibiofemoral, junto com a articulação patelofemoral (FILHO et al., 2012).

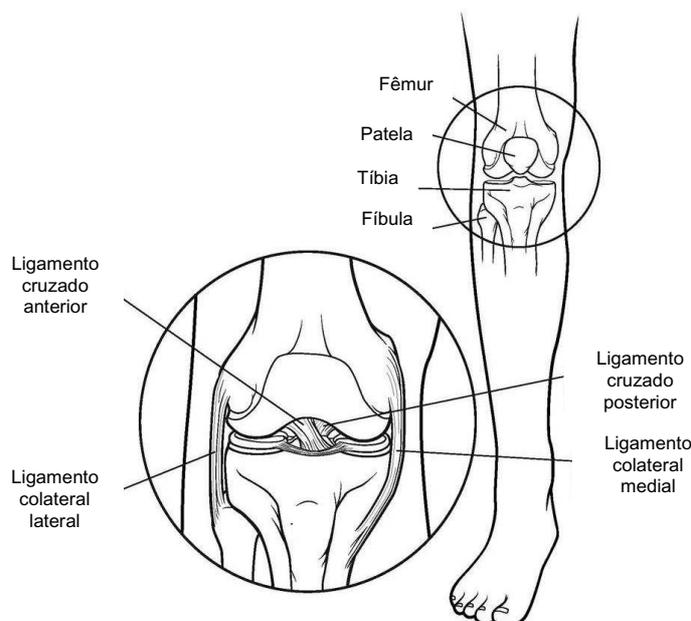


Figura 4. Articulação de joelho
(Adaptado de Kishner, 2015).

Independente da extensão do defeito na cartilagem articular do joelho, a mesma altera as propriedades mecânicas do tecido prejudicando a capacidade de distribuir as cargas articulares e da lubrificação normal durante as atividades físicas diárias, como caminhar, causando desconfortos, dores e diminuição da qualidade de vida (NG et al., 2012).

A primeira abordagem para o tratamento dos defeitos da cartilagem do joelho são procedimentos conservadores, que incluem fisioterapia, perda de massa corpórea e medicações com analgésicos e antiinflamatórios para alívio da dor, tais como, glucosamina, ácido hialurônico e esteróides (KIM et al., 2014). Esses procedimentos são paliativos, pois não evitam a progressão da doença.

Os tratamentos cirúrgicos são indicados aos pacientes que apresentam fragmentos condrais destacados com bloqueio do movimento (FILHO et al., 2012). Um dos primeiros métodos a serem aplicados, foi o de lavagem e debridamento,

onde são removidos os tecidos inflamatórios e partículas soltas. Apesar de ser de baixo custo, esta técnica não promove a reparação da cartilagem e não pode ser usada em grandes defeitos (KHEIR; SHAW, 2009).

A técnica de microfraturas provoca uma série de furos no osso subcondral a fim de que os vasos abaixo do osso forneçam células regenerativas para a superfície danificada e os defeitos sejam preenchidos com fibrocartilagem. Esta é uma das técnicas mais utilizadas no tratamento de OA. Um dos principais problemas desta técnica é a formação da fibrocartilagem que tem propriedades biomecânicas inferiores às da cartilagem hialina degradando-se, portanto, com maior facilidade. Outra desvantagem é que, de acordo com estudos clínicos, apenas 75% do total do defeito é preenchido pela fibrocartilagem (KHEIR; SHAW, 2009).

Com os resultados insatisfatórios da microfratura, outra técnica foi desenvolvida a partir da retirada de um fragmento cartilaginoso para obtenção de uma cultura *in vitro* de condrócitos, que são implantados em uma segunda cirurgia no defeito da cartilagem. Uma vez que são usadas as células do próprio paciente, o implante autólogo de condrócitos (IAC) diminui os riscos de reações imunológicas, mas para a realização da técnica são necessárias duas cirurgias, com longo tempo de recuperação. A técnica IAC ainda utiliza matrizes artificiais de colágeno ou de ácido hialurônico, que funcionam como uma “rede” para o crescimento dos condrócitos implantados como ilustra a Figura 5. No entanto, este arcabouço celular é implantado usando cola de fibrina, que possui derivados de órgãos suínos em sua fabricação, o que contribui para reações imunológicas alopáticas e riscos de infecções virais (MAKRIS et al., 2014)

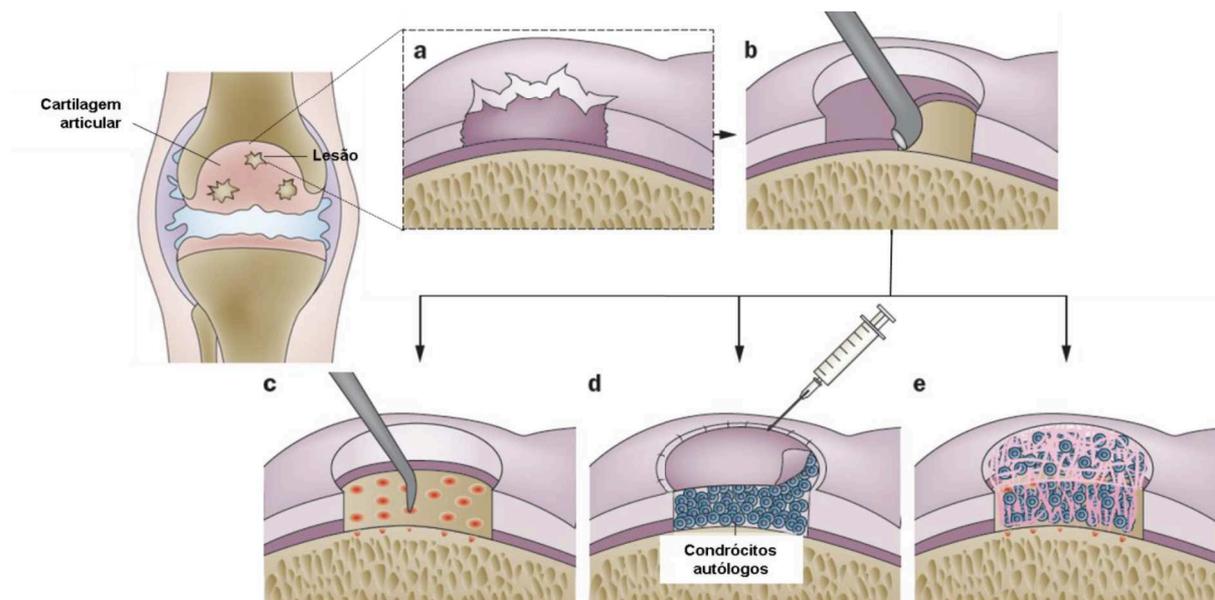


Figura 5. Técnicas de reparação da cartilagem

(a) Lesão condral. **(b)** Debridamento da lesão para retirar a margem do tecido inflamado. **(c)** O local passa por microfratura até o tecido subcondral para estimular migração de células. **(d)** Após debridamento, o local lesionado recebe o implante dos condrócitos autólogos, que foram semeados *in vitro*, que são cobertos por uma matriz artificial. **(e)** Implante de IAC realizado com cola de fibrina para manter as células na lesão (Adaptado de Makris et al., 2014)

Outra técnica envolve a transferência de pedaços de cartilagem intacta da articulação para o defeito (autoenxerto). Pedaços retirados das extremidades superiores do côndilo, Figura 6, têm demonstrado maior viabilidade celular para este tipo de transplante. A principal desvantagem desta técnica é a morbidade do sítio doador e, alguns estudos têm mostrado declínio na funcionalidade da articulação depois deste procedimento. Para evitar estes problemas, uma alternativa é o uso de aloenxertos ou partes de cartilagens retiradas de cadáveres. A vantagem é a quantidade de material suficiente para cobrir grandes defeitos sem preocupações com morbidade associada com o sítio doador do paciente. Dentre as desvantagens se encontram a dificuldade para encontrar doadores e para manipular os tecidos sem que ocorra possibilidade de transmissão de doenças. Alguns estudos registram respostas imunológicas significativas o que induz ao uso de tecido cartilaginoso descelularizado (BETSCH et al., 2013; FILHO et al., 2012; KHEIR; SHAW, 2009).

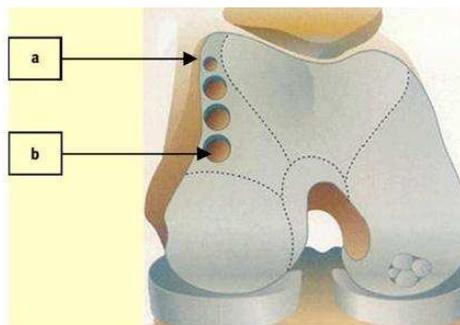


Figura 6. Técnica de retirada de pedaços de cartilagem saudável (a) superior lateral e (b) inferior lateral, para cobertura de defeitos em superfície articular de joelho (KHEIR; SHAW, 2009).

Segundo Ng et al. (2012) estas técnicas, apesar de restaurarem a mobilidade articular, não conseguem manter a cartilagem em longo prazo. Portanto, os procedimentos cirúrgicos que retiram parcial ou totalmente o tecido lesionado e que não propiciam a formação de tecido novo são considerados ineficazes (ESPOSITO et al., 2010).

Como alternativa aos tratamentos paliativos convencionais tem se estudado os tratamentos regenerativos por meio de terapias celulares. Uma das aplicações das terapias celulares em pacientes acometidos de OA e que mostram benefícios têm como base o transplante de células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs podem ser isoladas da medula óssea, periósteo, osso trabecular, tecido adiposo, sinovial e muscular. Estas células têm a capacidade de se diferenciar em células de linhagens conectivas, incluindo osso, gordura, cartilagem e músculo. Por isso, tem despertado interesse para aplicações na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos (KOLF; CHO; TUAN, 2007; UCCELLI et al., 2007).

No entanto, a segurança do uso de CTMs permanece como uma incógnita. Existem preocupações em relação à diferenciação destas células em linhagens indesejáveis como as cancerígenas, pois os fatores que a levam à diferenciação ainda não são dominados (CHAHLA et al., 2016).

O direcionamento recente na regeneração da cartilagem articular está na possibilidade de realização da cirurgia em uma única etapa. Muitos trabalhos têm mostrado ser possível a regeneração com injeção intraarticular de células-tronco sem a necessidade de biópsia e cultivo *in vitro* de condrócitos (GOBBI et al., 2011). Esta possibilidade surgiu da constatação de que células-tronco e células progenitoras derivadas da medula óssea são as fontes mais poderosas de células

autólogas para a regeneração de tecidos. O conteúdo rico de células mononucleares (MNCs) e citocinas do Aspirado Concentrado de Medula Óssea (BMAC) tem atraído a atenção dos cirurgiões. Além disso, a medula óssea humana fornece subpopulações de vários tipos de células progenitoras, incluindo as endoteliais que têm um importante papel na angiogênese (ZHONG et al., 2012). BMAC é obtido por separação através da centrifugação da medula óssea, normalmente aspirada da crista ilíaca. O concentrado é injetado diretamente no espaço intraarticular.

A utilização do BMAC, portanto, pode resolver as dificuldades técnicas e o consumo de tempo envolvido no processo de expansão e diferenciação celular, permitindo a aspiração e o transplante do BMAC durante o mesmo procedimento cirúrgico. Além disso, as plaquetas contidas no BMAC podem fornecer condições mais rápidas e eficazes para a regeneração tecidual através das células-tronco mesenquimais e dos fatores de crescimento (ZHONG et al., 2012).

No entanto, a literatura disponível em relação ao BMAC é limitada e altamente heterogênea com poucos pacientes, curto prazo de acompanhamento e métodos diferentes e deficientes de avaliação de pós-operatórios e de efeitos adversos. Portanto, o conhecimento sobre esta técnica terapêutica é ainda preliminar (CHAHLA et al., 2016).

Assim como o entendimento de alguns mecanismos de diferenciação celular levou ao uso direcionado das CTMs, o entendimento da fisiologia das plaquetas levou ao uso dos fatores de crescimento plaquetários em terapias regenerativas. Vários sistemas de centrifugação, disponíveis comercialmente, podem isolar e concentrar as plaquetas da amostra de sangue periférico autólogo. O isolado resultante é conhecido como Plasma Rico em Plaquetas (PRP) que contém alta concentração de fatores de crescimento autólogos. As células vermelhas são separadas do PRP que, geralmente, contém hematócrito abaixo de 5%. Quando o PRP é injetado no espaço intraarticular e exposto à trombina, a degranulação das plaquetas libera alta concentração de fatores de crescimento no local da lesão que acelera o processo regenerativo (CENTENO et al., 2008).

Para a preparação do PRP, sangue periférico do paciente é coletado em condições estéreis, com ou sem anticoagulantes, e o plasma é preparado por centrifugação ou filtração. O volume pode ser adaptado para as necessidades clínicas, variando entre 10 a 100 mL. Essencialmente, o método de produção do PRP determina a composição e a concentração de leucócitos, eritrócitos e plaquetas

em um dado volume. A relativamente fácil preparação, biosegurança e versatilidade do PRP têm estimulado vários estudos, representando um dos tratamentos mais avançados em várias condições clínicas (SÁNCHEZ et al., 2012).

2.3 MEMBRANA DE PRF COMO BIOMATERIAL NATURAL

Os biomateriais são o meio de preenchimento do defeito na cartilagem sobre os quais é possível o cultivo de células-tronco ou condrócitos, servindo como arcabouço para que essas células se proliferem e, com o auxílio do biomaterial, preencham o defeito do tecido.

As propriedades dos biomateriais como alta porosidade, biocompatibilidade e resistência mecânica são fundamentais para seu sucesso como arcabouço no preenchimento do defeito no tecido cartilaginoso. Arcabouços tridimensionais são essenciais para promover o suporte necessário à proliferação celular (ELDESOQI et al., 2014).

Uma vez que as células-tronco são multipotentes, com capacidade de se diferenciarem em um ou mais tipos de células especializadas, podem ser retiradas de um paciente, incorporadas em um biomaterial *in vitro* e, posteriormente, serem implantadas sem a necessidade do uso de imunossupressores pelo paciente (COSTA et al., 2005). Para cultivo sobre os biomateriais, as células-tronco são expandidas *in vitro*, por isso, este método possui alguns problemas como a esterilidade do cultivo celular, os altos custos, o uso do soro fetal bovino, uma segunda cirurgia e o longo período de cultivo que requer uma operação programada (BETSCH et al., 2013).

Por isso, o desafio é desenvolver novos biomateriais que possuam a capacidade de restaurar, melhorar ou impedir o agravamento da degeneração da cartilagem articular (OLIVEIRA et al., 2010) sem a necessidade de cultivos celulares *in vitro* e da sua implantação em uma segunda cirurgia. Os mais promissores são os biomateriais naturais, preferencialmente produzidos a partir de matérias primas autólogas.

Dentre os biomateriais naturais candidatos ao uso em defeitos de cartilagem encontra-se a membrana de PRF, um biomaterial tridimensional natural autólogo, não tóxico e degradável por enzimas de ocorrência natural na cartilagem.

A fibrina é uma proteína fibrosa envolvida no processo de coagulação sanguínea. É formada no local da ferida a partir do fibrinogênio pela ação da trombina, que polimeriza o coágulo em conjunto com as plaquetas e hemáceas formando um tampão hemostático. Desta forma, a fibrina desempenha um papel importante na hemostase, inflamação, ativação das plaquetas, angiogênese e cicatrização (WANG, 2013).

Desde 1980 a fibrina é amplamente utilizada em cirurgias da área ortopédica que visam à reparação e regeneração do tecido ósseo (PATEL et al., 2010). Devido às suas características que incluem a liberação lenta e gradual de fármacos e de fatores de crescimento e a estimulação do crescimento celular, a fibrina tem sido alvo de estudos na engenharia de tecidos (PATEL et al., 2010). Alguns produtos foram desenvolvidos a partir desse material, como por exemplo, a cola de fibrina (FG) e o plasma rico em fibrina (PRF), que contribuem para o processo de regeneração da cartilagem (RAJANGAM; AN, 2013).

Desenvolvido inicialmente por Choukroun et al. (2001), na França, o PRF é definido como um concentrado de plaquetas numa membrana de fibrina, sendo amplamente utilizado em cirurgia oral, periodontal e em cirurgia estética por favorecer a cicatrização de tecidos moles (SCLAFANI; MCCORNICH, 2012; KNAPEN et al., 2015).

A membrana de PRF é obtida por centrifugação do sangue periférico sem adição de anticoagulantes. O coágulo de fibrina é uma das três camadas resultantes do processo de centrifugação, Figura 7, e apresenta, aproximadamente, 97% das plaquetas e 50% dos leucócitos do volume inicial do sangue incorporados e distribuídos de modo tridimensional (EHRENFEST et al., 2010a).

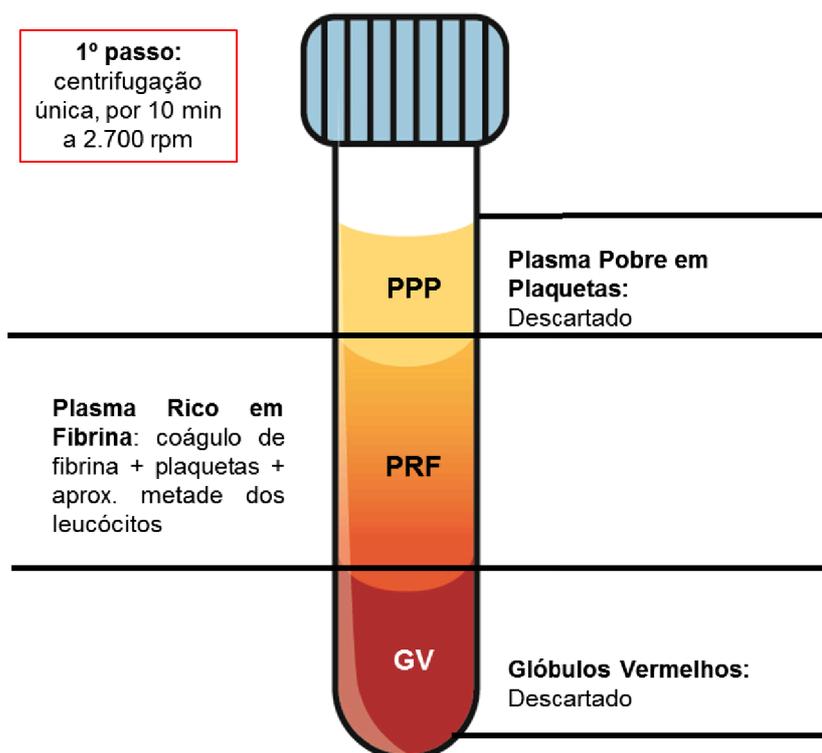


Figura 7. Produto obtido pela técnica de Choukroun
(Ilustração adaptada de SILVEIRA, 2013; adaptado de Ehrenfest et al., 2010a).

A membrana de PRF possui a capacidade de secretar gradativamente diversos fatores de crescimento e citocinas que promovem a remodelação e a regeneração do tecido através de um complexo processo celular que envolve a proliferação celular, síntese de colágeno e angiogênese (ROY et al., 2011; ANITUA, 2006). A lenta liberação desses fatores de crescimento tem papel significativo no processo regenerativo, pois sua secreção ocorre em menos de uma semana e pode chegar até 28 dias, contribuindo para a migração celular no local da lesão (WU et al., 2012). Além disso, os fatores de crescimento derivados de plaquetas interagem com a fibrina, o que ocasiona proteção da degradação proteolítica (LUNDQUIST et al., 2013). Esta capacidade da fibrina parece estar relacionada à sua complexa arquitetura em forma de rede que contribui para a migração celular e angiogênese e também por conter alta quantidade de leucócitos que parecem ter um papel na regulação da inflamação e prevenção da infecção (KNAPEN et al., 2015; VAVKEN et al., 2011).

Entre os vários fatores de crescimento (Tabela 2), o fator de crescimento transformador β (TGF- β), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento epidermal (EGF) estão, geralmente, presentes em uma membrana de PRF e são fundamentais na proliferação celular e no processo de cicatrização de tecidos (SOYER et al., 2013).

Tabela 2 – Componentes ativos do PRF

CATEGORIA	NOME	FUNÇÕES
Fatores de Crescimento	PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas)	Quimiotático, promove angiogênese, ativa o TGF- β
	TGF- β 1, TGF- β 2– Fator de crescimento Beta)	Promove síntese da MEC e de colágeno, proliferação e diferenciação celular
	VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)	Angiogênese e aumento da permeabilidade capilar
	EGF (fator de crescimento epidérmico)	Proliferação celular
	FGF (fator de crescimento de fibroblasto)	Angiogênese, proliferação de fibroblastos
	IGF-1, IGF-2 (fator de crescimento semelhante à insulina)	Proliferação celular, maturação, síntese da matriz óssea
Proteínas Adesivas	Fibrina	Componente da MEC, estimulação da fagocitose
	Fibronectina	Componente da MEC, adesão, migração e diferenciação celular,
	Vitronectina	Quimiotaxia e adesão celular

Fonte: (DOHAN et al., 2006a; CHOUKROUN et al., 2006)

A membrana de PRF pode ser utilizada como um biomaterial reabsorvível que conduz a regeneração tecidual e vários estudos têm demonstrado que a mesma possui potencial para o uso na regeneração de cartilagens articulares por proporcionar um ambiente adequado para a proliferação e diferenciação de condrócitos no local afetado (WU et al., 2012; CHIEN et al., 2012; DOUGLAS et al., 2012; LUNDQUIST et al., 2008). A liberação gradual de citocinas parece ter uma função regulatória do processo inflamatório. Além disso, a membrana de PRF tem resistência mecânica e elasticidade adequada para suportar sutura (DEL CORSO; TOFFLER; EHRENFEST, 2010).

Portanto, do que foi exposto pode-se concluir que os efeitos sinérgicos da matriz de fibrina e seus fatores de crescimento levam à cicatrização acelerada de tecidos duros e macios. As plaquetas e citocinas são liberadas gradualmente durante a reabsorção fisiológica da membrana de PRF e a matriz de glicoproteínas permite a migração e proliferação das células na membrana (ROY et al., 2011) que serve como arcabouço natural para formação de tecido novo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELIMITAÇÃO DO ESTUDO

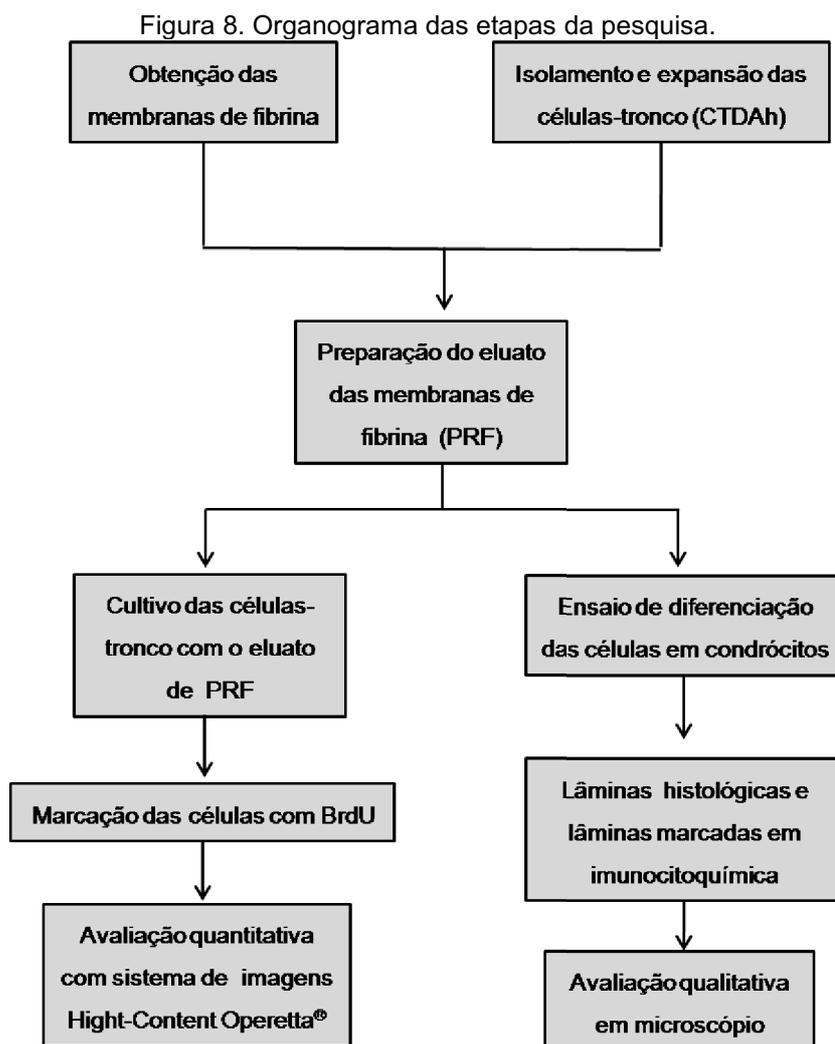
Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, com o parecer do CEP nº 1.348.208.

Foi realizada a coleta do sangue periférico de dois voluntários saudáveis para obtenção da membrana de fibrina. Para cultivo celular, dois participantes foram suficientes.

Os participantes foram escolhidos de acordo com os critérios de inclusão: idade entre 18 e 55 anos; mínimo de 54 kg de massa corpórea; não ser portador de doenças crônicas ou autoimunes; não ser fumante; não ter ingerido aspirina ou outros medicamentos que possam interferir no processo de coagulação nas últimas duas semanas. Os critérios de exclusão foram: estar gestante; apresentar quadro de insuficiência arterial e/ou venosa periférica; fazer uso contínuo de medicamentos anticoagulantes.

Tanto a extração do sangue periférico, feita em uma única etapa, como a preparação das membranas de PRF foi realizada em área laboratorial (Laboratório de Cultivo Celular - PUCPR) com o auxílio de profissionais habilitados, não apresentando risco aos participantes.

A figura 8 mostra o organograma do estudo para melhor entendimento.



Fonte: A autora, 2016.

3.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE FIBRINA

Foram extraídos 80 mL de sangue da veia antecubital (superficial) de cada voluntário com o auxílio de um dispositivo Scalp 21G (BD Vacutainer[®]) para o preenchimento de 8 tubos de plástico para coleta de sangue a vácuo de 10 mL (BD Vacutainer[®]), devidamente esterilizados e identificados com códigos. Os tubos não continham anticoagulantes, mas possuíam ativador de coágulo.

O sangue coletado foi imediatamente centrifugado (centrífuga digital Spinlab) em 2.700 rpm durante 12 min. em temperatura ambiente controlada de 20°C. Depois da centrifugação, o coágulo de PRF foi retirado com o auxílio de uma pinça esterilizada e, com uma tesoura estéril, a pequena parte de células vermelhas aderidas à sua extremidade foi retirada (Figura 9). Em seguida, os coágulos foram

prensados com o auxílio de uma chapa de aço inoxidável (Box PRF BmdCon[®]) também esterilizada para retirada do soro (extração do exsudado) obtendo-se, então, a membrana de PRF (EHRENFEST et al., 2010a).

As membranas foram usadas imediatamente à sua produção para obtenção do eluato, evitando qualquer degeneração proteica, que pode ocorrer em 3h.

Para avaliar as estruturas microscópicas da membrana de PRF, uma membrana foi fixada em formaldeído 10% imediatamente depois da sua produção e, em seguida, desidratada em diluições seriadas de álcool etílico, diafanizada em xilol e infiltrada por parafina líquida. O bloco parafinado foi seccionado em micrótomo (4 μ m) e as lâminas foram coradas por técnica histológica em Hematoxilina e Eosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

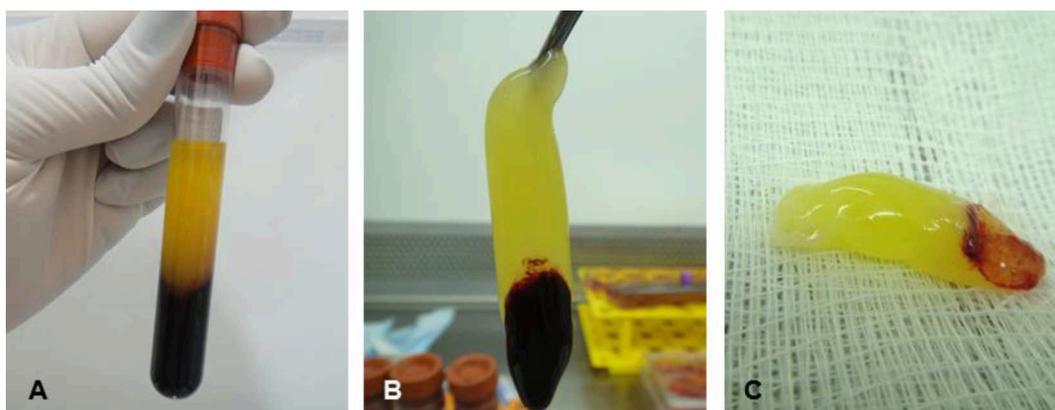


Figura 9. Preparação da membrana de Plasma Rico em Fibrina (PRF) **(A)** resultado da centrifugação do sangue periférico com a produção de um coágulo de PRF (camada intermediária entre a base sólida de glóbulos vermelhos e o sobrenadante do plasma pobre em plaquetas); **(B)** e **(C)** membrana de PRF extraída do tubo. Fonte: A autora, 2016.

3.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.3.1 Isolamento e expansão das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh)

O tecido adiposo (TA) foi coletado de um doador saudável por um cirurgião plástico, durante o procedimento de lipoaspiração. O doador aceitou a doação e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O frasco foi transportado até o laboratório de Cultivo Celular e, em um fluxo laminar foram processados 50 mL do material, utilizando-se o método de digestão enzimática conforme Rebelatto et al., (2008). Neste processo, 50 mL de TA foram lavados três vezes com solução salina fosfatada (PBS – Gibco™ Life Technologies, Grand Island, USA), macerados com bisturi e dissociado com colagenase tipo I (1 mg para cada ml de gordura) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), durante 30 min. em 37°C, com agitação constante. Depois de ocorrida a sedimentação, a parte líquida inferior foi retirada e filtrada com *cell strainer* (poro de 100 µm) (BD FALCON™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). A suspensão celular foi centrifugada em 800 g por 10 min. e os eritrócitos contaminantes foram removidos após a lise com um tampão pH 7,3 (ZUK et al., 2002). As células foram lavadas e filtradas novamente com *cell strainer* (filtro de 40 µm) (BD FALCON™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). As células resultantes foram cultivadas em densidade de 1×10^5 células/cm² em frascos de cultura de T75 (TPP, Trasadingen, Switzerland) em meio DMEM-F12 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - Gibco™ Invitrogen, NY, USA), 1% de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh) isoladas foram mantidas em estufa com 5% de tensão de CO₂, 37°C e 95% de umidade. Depois de 72 h, as células não aderentes foram removidas e descartadas. As CTDAh, depois de semeadas, cresceram aderidas ao plástico. As trocas de meio foram realizadas duas vezes por semana e as células foram cultivadas até atingirem confluência entre 80% e 90%. Em seguida, as células foram dissociadas (liberadas do fundo do frasco) utilizando tripsina/EDTA 0,25% (Invitrogen™, NY, USA) e ressemeadas em outras garrafas de cultivo, caracterizando a primeira passagem (P1). Após a terceira dissociação (P3), as células foram suspensas em meio DMEM-F12 contendo 15% de SFB e contadas em câmara de Neubauer.

Em estudos prévios realizados no laboratório (Rebelatto et al., 2008), utilizando o protocolo de isolamento e expansão das CTDAh descrito acima, foi realizada a caracterização dos marcadores de membrana por citometria de fluxo e os ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, caracterizando as células obtidas como células-tronco, de acordo com os critérios estabelecidos por Dominici et al., 2006.

3.3.2 Preparação do eluato do plasma rico em fibrina (PRF)

Oito membranas de PRF de cada participante, assim que extraídas e exsudadas, foram cortadas com auxílio de uma pinça estéril para biópsia *punch* (nº 6 mm Miltex®) em três círculos de 6 mm e foram colocadas em poços de placas de cultivo de 6 poços (Greiner Bio-One). Em seguida, foram adicionados 5 mL de meio de cultura DMEM-F12 sem SBF em cada poço. Os sobrenadantes das placas foram retirados depois de 48 h e transferidos para tubos de 50 mL e mantidos em geladeira durante o cultivo celular (GASSLING et al., 2011).

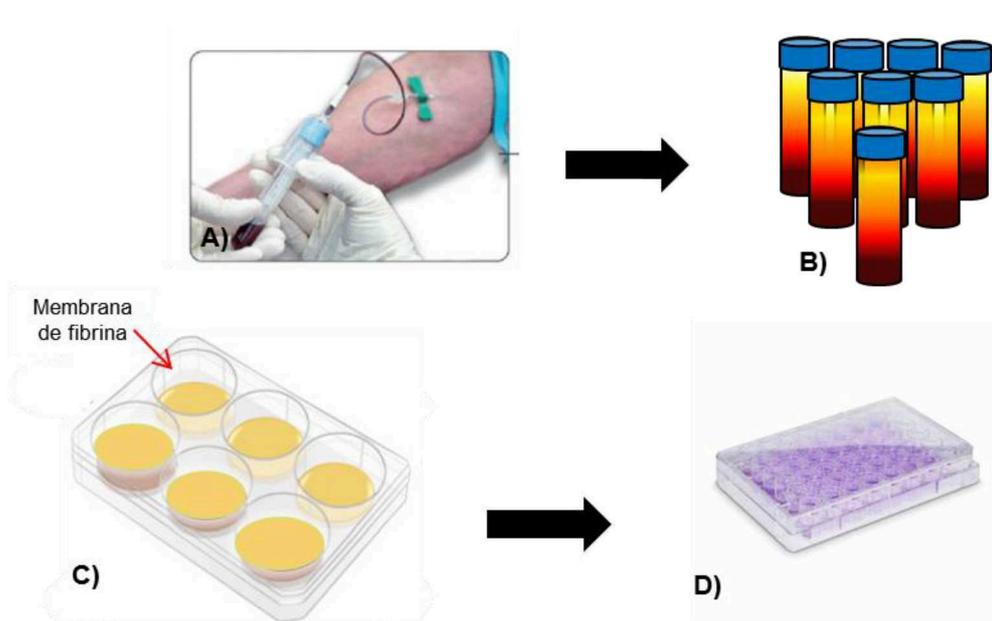


Figura 10. Etapas da preparação do eluato de fibrina usado em cultivo celular (A) Coleta de sangue periférico; (B) plasma rico em fibrina depois da centrifugação; (C) membranas cortadas preenchendo os poços da placa de cultivo celular; que após 48h formaram o eluato (sobrenadante dos poços); (D) eluato transferido para a placa de cultivo celular. Fonte: A autora, 2016.

3.3.3 Cultivo das CTDAh com o eluato de PRF

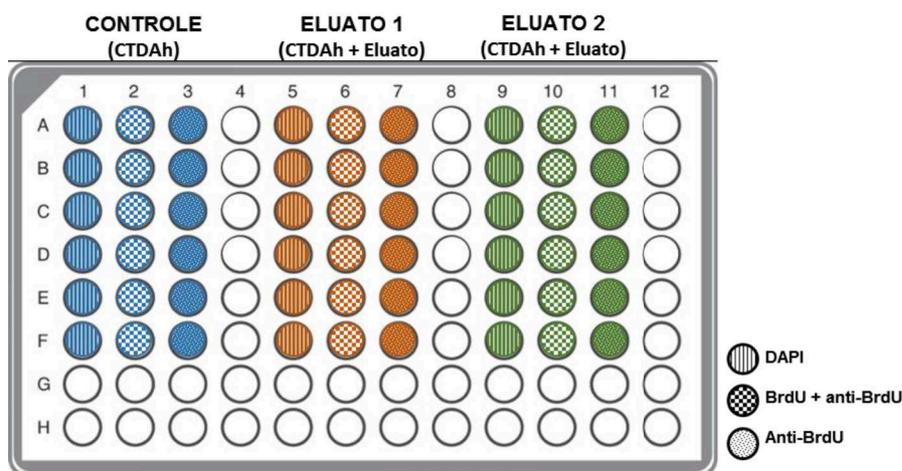
Foram distribuídas 3.000 células por poço em placas de cultura de 96 poços (Greiner Bio-One) com meio DMEM-F12 e 15% de SBF, que foram mantidas em estufa com 5% de tensão de CO₂ durante 12 h para a aderência celular.

Depois de 12 h de cultivo, retirou-se o meio com soro e foi adicionado meio sem soro para carenciamento celular (livre de SBF), com o objetivo de evitar a

interferência dos fatores de crescimento do soro na proliferação celular. Depois de 24 h foram adicionados 150µL do eluato das membranas obtidas dos dois doadores em cada poço (poços teste) e 150 µL de meio com SBF nos poços controle. A placa foi cultivada por 3 dias. A troca de eluato das membranas e do meio foi realizada diariamente (GASSLING et al., 2013). Depois de três dias foi realizada a marcação com BrdU para se avaliar a proliferação celular, de acordo com a placa mostrada na Figura 11.

Para o teste de proliferação celular, as células foram plaqueadas em sextuplicatas técnicas. Os resultados com o número total de núcleos e porcentagem de células marcadas com BrdU são representados como a média das réplicas técnicas.

Figura 11. Esquema da placa de cultivo de CTDAh com o eluato de PRF. Cultivo das células-tronco em placa de 96 poços com controle (CTDAh), eluato doador 1 e eluato doador 2. Após três dias de cultivo as placas foram marcadas com DAPI, BrdU+anti-BrdU e antiBrdU.



Fonte: A autora, 2016.

3.3.4 Marcação das células com bromodeoxiuridina (BrdU) e avaliação da proliferação celular

Após três dias de cultivo foi realizada a marcação com BrdU durante 24 h para avaliar a proliferação celular.

Para avaliação da proliferação celular, foram adicionados 50 µL por poço de BrdU (Eugene, Life Technologies, Oregon, USA) na concentração de 100 µM/L. Depois de 24 h, as células foram lavadas com PBS e, fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e, em seguida, lavadas em PBS, durante 30

min., em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram lavadas com PBS e, posteriormente, com água destilada durante 5 min. com agitação. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com HCl 2N em 50°C por 10 min. com agitação, e depois lavadas com tampão borato em 50°C por 10 min. com agitação.

As células foram permeabilizadas com TBS-Triton 0,3% (Sigma-Aldrich) por 10 min. com agitação. Logo após, os sítios inespecíficos foram bloqueados com TBS 10mM + 5% soro de cabra + 1% albumina bovina + 0,1% Triton por 1 h com agitação. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo BrdU conjugado com Alexa Fluor 488 (diluição 1:200) (Life Technologies, Oregon, USA) em PBS+BSA 1% por 1 h em temperatura ambiente. Depois da marcação as células foram novamente lavadas com PBS.

Para a visualização do núcleo, utilizou-se o DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Eugene, Life Technologies, Oregon, USA) por 5 min. em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e água destilada.

Para o ensaio de proliferação celular, a placa foi escaneada com o sistema de imagens High-Content Operetta (Perkin Elmer[®]) em 10x de ampliação com 9 campos/poço. As imagens foram analisadas com o software Harmony 3.5.2 (Perkin Elmer[®]). A leitura da placa foi realizada no laboratório de Biologia Celular e Molecular, no Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná.

3.3.5 Análise estatística do ensaio de proliferação

Os dados foram plotados e analisados com o programa de estatística Graphpad Prism versão 7, usando o teste ANOVA, seguido por teste de Tukey. Diferenças com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos com o número total de núcleos marcados e em percentual de células em proliferação durante o pulso de BrdU.

3.4 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS EM CONDRÓCITOS

Para a diferenciação condrogênica as CTDAh foram cultivadas em micromassa. Cerca de 2×10^5 células em 0,5 mL de cultura foram centrifugadas a

400 g por 10 min., em um tubo de polipropileno de 15 mL para formar o *pellet*. As células foram cultivadas por 21 dias em três condições: meio de diferenciação condrogênica comercial (Differentiation Basal Medium Chondrogenic) (Lonza, Walkerville, USA), meio DMEM-F12 + 15% de SFB (controle) e eluato de fibrina. Para cada condição, foram adicionados 0,5 mL de solução, homogeneizado e novamente centrifugado a 400 g por 10 min. Os tubos com as células foram incubados em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

Sem mexer no *pellet* celular, o meio foi trocado a cada três dias. No 21º dia, o agregado celular foi fixado em formaldeído 10% por 1 h em temperatura ambiente, desidratado em diluições seriadas de álcool etílico, diafanizado em xilol e infiltrado por parafina líquida. Os blocos parafinados foram seccionados em micrótomo (4 µm) e as lâminas foram coradas por técnica histológica em azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para demonstrar a matriz intracelular de mucopolissacarídeos, e marcadas por técnica imunocitoquímica em agregcana (Invitrogen™, NY, USA) (1:100) para verificar a matriz extracelular sintetizada por condrócitos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA (PRF)

A técnica para a produção da membrana de PRF foi inicialmente desenvolvida para cirurgia oral e maxilofacial, sendo posteriormente aprimorada para outras áreas como ortopédica e estética. Apesar do protocolo ser simples, alguns detalhes importantes devem ser seguidos para se obter a membrana como mostrada na Figura 12: o sangue deve ser coletado em temperatura ambiente, entre 28° e 38°C, pois em temperaturas mais baixas a polimerização da membrana torna-se mais lenta; os tubos para coleta sanguínea devem ser de plástico, sem anticoagulantes, mas com moléculas ativadoras de coágulo; durante a coleta deve-se usar um dispositivo Scalp, essencial para controlar a velocidade da saída do sangue que entra no tubo, que deve ser centrifugado imediatamente após a coleta durante 12 min a 2.700 rpm. Terminada a centrifugação, a membrana pode ser mantida em seu próprio exsudado por até 3 h, no entanto, recomenda-se o seu uso imediato, pois suas propriedades benéficas são rapidamente perdidas.



Figura 12. Membrana de plasma rico em fibrina
(A) retiradas dos tubos para serem comprimidas e (B) detalhe da membrana sólida e flexível para uso imediato. Fonte: A autora, 2016.

Depois de extraídas dos tubos, foi possível identificar as três regiões na membrana identificadas por Dohan e colaboradores (2006b), como mostra a Figura 13: trombo vermelho (*“red thrombus”*) caracterizado por um agregado de hemácias e plaquetas à matriz de fibrina; rede de fibrina (*“fibrin clot”*), área acelular formada por matriz de fibrina; e área mista (*“buffy coat”*), parte intermediária entre a vermelha e a branca.

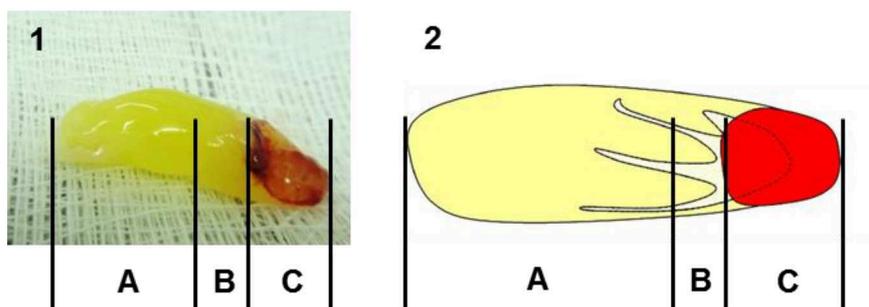


Figura 13. Membrana de fibrina mostrando as três regiões: **(A)** rede de fibrina, **(B)** área mista e **(C)** trombo vermelho. Fonte: figura 1, a autora, 2016; figura 2, ilustração adaptada de Dohan et al., 2006a.

A análise microscópica da membrana de PRF comprovou a formação das regiões vistas macroscopicamente. Corroborando com os achados de Dohan et al. (2006a) os cortes histológicos demonstraram que a parte inferior da matriz de fibrina (PRF) é ocupada por estrias esbranquiçadas (“área mista”) e agregados de fragmentos celulares (“trombo vermelho”). Entretanto, a parte superior do coágulo, constituída pela rede de fibrina, não apresenta plaquetas ou outro corpo celular (Figura 14).

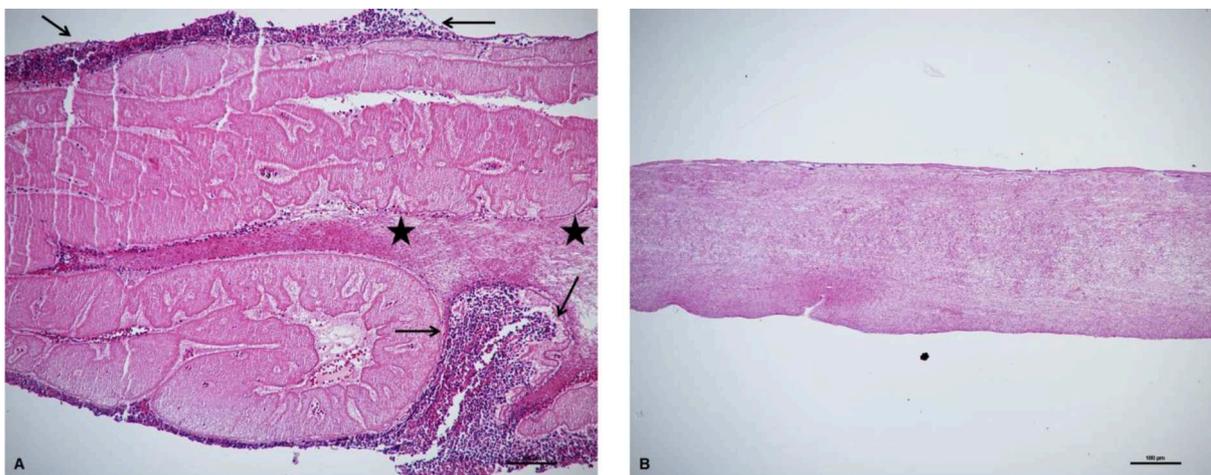


Figura 14. Análise microscópica da membrana de fibrina: **(A)** Observa-se o acúmulo de plaquetas na região inferior (área com pontos roxos indicada pelas setas), em transição com a região mista, com estrias esbranquiçadas (área rosada indicada pelas estrelas). **(B)** Área superior do coágulo com a extensa rede de fibrina. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento 10X. Fonte: A autora, 2016.

Dohan et al. (2006a) demonstraram que, na membrana de PRF, após a centrifugação, as plaquetas são ativadas e os fatores de crescimento (TGF- β , PDGF, IGF) e citocinas liberados gradualmente. Durante este processo ocorre uma

reação intercelular entre a fibrina, as citocinas e a matriz extracelular do local envolvido. Dessa forma, o PRF progressivamente age na modulação de uma resposta inflamatória do tecido, tanto atraindo novas células para regenerar o tecido adjacente como contribuindo para a defesa contra bactérias e outros patógenos (Badade et al., 2016).

Em um terceiro estudo Dohan et al. (2006c) investigou quais citocinas estariam presentes na membrana de PRF. Foram encontrados citocinas de efeito pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-4), assim como o fator de crescimento responsável pela angiogênese local (VEGF), resultando numa resposta eficiente contra a inflamação tecidual.

Depois de retirado o exsudado por compressão, obtêm-se membranas como as mostradas na Figura 15, de cerca de 3 cm² de área. Pela textura e elasticidade das membranas obtidas pode-se comprovar que a membrana de PRF possui propriedades essenciais para um biomaterial em engenharia de tecidos como concluído no estudo de Khorshidi et al. (2016).



Figura 15. Membranas de PRF depois de extraído o exsudado

4.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Inicialmente os ensaios de proliferação celular foram realizados com as CTDAh sobre a membrana de fibrina, entretanto verificou-se que a mesma possuía autofluorescência depois da marcação com anticorpos, impedindo a contagem das células pelo microscópio de infravermelho invertido Operetta[®]. Como alternativa foi

adaptado o experimento de Gassling et al. (2013) usando o eluato da membrana de fibrina ao invés da própria membrana.

A tabela 3 mostra a média de núcleos marcados em cada poço por tratamento. Em nossos estudos observamos que o tratamento de eluato de fibrina foi significativo para a quantidade de células marcadas em relação ao grupo controle, onde o valor de $p=0,002$ para o teste ANOVA ($n=6$). O pós-teste de Tukey revelou que houve diferença significativa do grupo CTDAh + Eluato 1 entre os demais grupos (Figura 16).

Tabela 3 – Número total de núcleos marcados

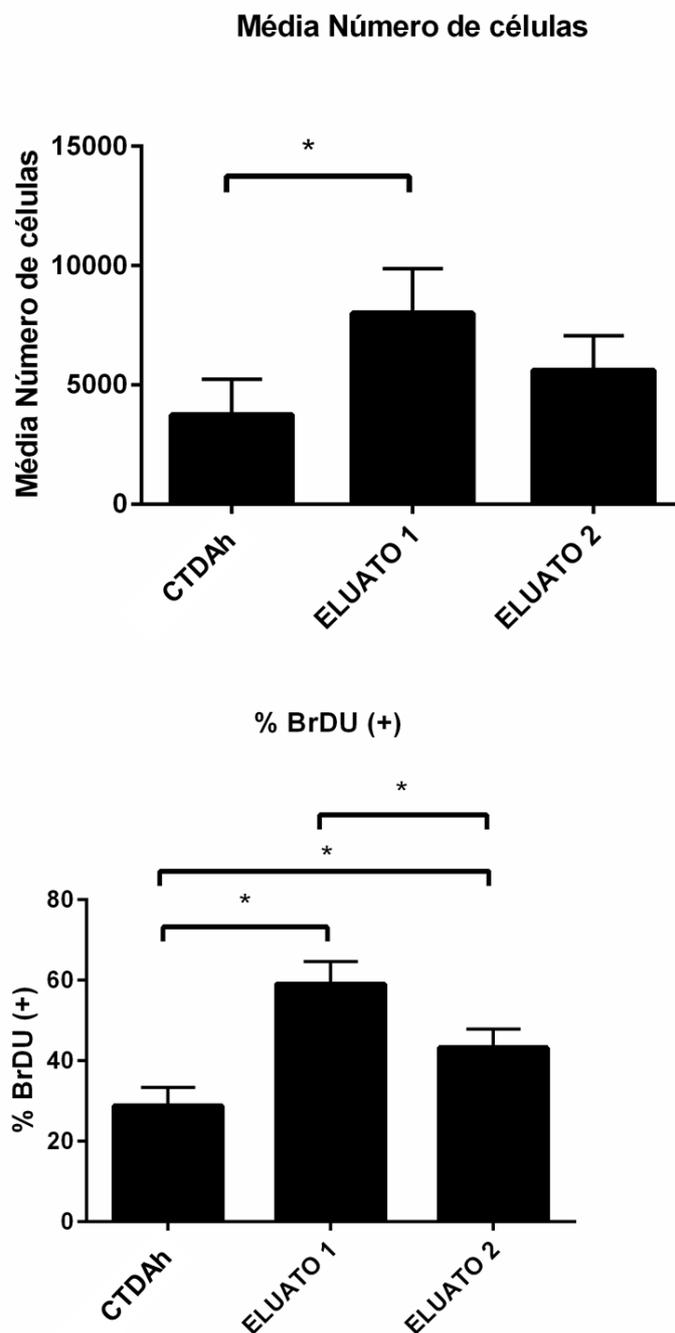
	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6
CTDAh	1.266	3.433	4.299	5.372	5.008	2.986
CTDAh + Eluato 1	5.459	9.356	9.848	ND	8.620	6.699
CTDAh + Eluato 2	5.268	2.967	6.367	5.745	6.111	7.171

Os tratamentos com eluato de fibrina também obtiveram maior porcentagem de núcleos marcados em proliferação celular durante o pulso do BrdU (24h) em comparação ao grupo controle (Tabela 4, Figura 16). O teste ANOVA demonstrou significância, com valor de $p < 0,0001$ ($n=6$). O pós-teste de Tukey revelou que os grupos, CTDAh + Eluato 1 e CTDAh + Eluato 2 tiveram diferença estatística entre o controle, e entre eles mesmos. Podemos confirmar que houve maior divisão celular, portanto, proliferação quando as CTDAh receberam o eluato de fibrina.

Tabela 4 – Porcentagem de células marcadas com BrdU em proliferação celular

	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6
CTDAh	37	28	26	27	26	32
CTDAh + Eluato 1	62	51	55	ND	64	63
CTDAh + Eluato 2	47	40	42	49	38	51

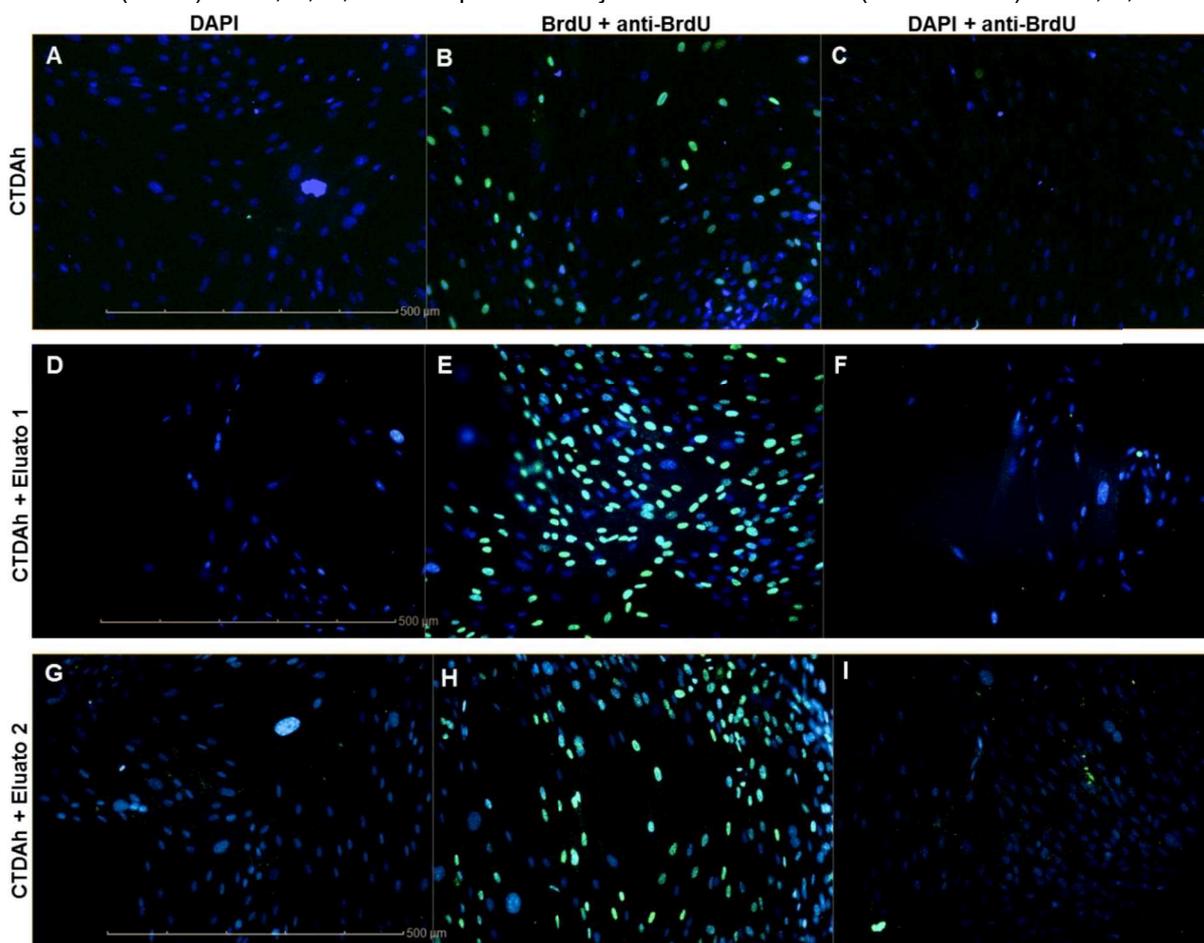
Figura 16. Gráficos com o total de células marcadas e porcentagem de células em proliferação



Para o ensaio de proliferação foram usados marcadores específicos, que no sistema de imagem Hight-Content Operetta[®] evidencia os núcleos encontrados em cada poço da placa de cultivo celular. Como marcadores foram usados: DAPI como controle para marcação dos núcleos celulares; BrdU+anti-BrdU, onde o BrdU é incorporado na timina do DNA das células em proliferação marcando, portanto, as

células em divisão celular; e somente anti-BrdU como controle negativo, anticorpo secundário que possui um fluoróforo (verde) quando ligado ao BrdU. Na figura 17, é possível visualizar em B, E, H a marcação positiva das células em proliferação por BrdU (verde), e em A, D, G as células presentes com DAPI (azul). As figuras C, F, I apresentam-se como controle para a marcação BrdU, uma vez que não usamos o anticorpo primário para averiguar se o anti-BrdU não se ligaria à estruturas inespecíficas e resultar em falso positivo.

Figura 17. Resultado da proliferação das células-tronco com eluato de fibrina
 Marcação dos núcleos com DAPI (azul) em A, D, G; Células proliferadas com marcação de BrdU + anti-BrdU (verde) em B, E, H; controle para marcação DAPI + anti-BrdU (azul e verde) em C, F, I.



Gassling e colaboradores (2010) compararam o crescimento de células periosteas humanas em membranas de PRF com seu crescimento em membranas de colágeno comercial. O estudo avaliou a viabilidade celular, a biocompatibilidade por dosagem de Desidrogenase Láctica (LDH) e proliferação celular por BrdU. Os

resultados mostraram que ambas as membranas exibiam células viáveis e ausência de morte celular. Os testes com o BrdU indicaram maior proliferação celular nas membranas de PRF do que nas de colágeno, enquanto que os testes de MTT confirmaram maior atividade metabólica também para as membranas de fibrina. Entretanto, os doseamentos de LDH mostraram maior citotoxicidade nas membranas de PRF em relação às membranas de colágeno. Esse resultado de citotoxicidade foi destacado pelo uso de diferentes doadores para as células periosteas e para a membrana de PRF, sugerindo uma resposta imunológica das plaquetas, citocinas e fatores de crescimento presentes na membrana contra elementos celulares e moleculares não reconhecidos como próprio (*non-self*) dentro do cultivo celular.

Semelhante ao estudo anterior, Gassling et al. (2013) propôs o uso de eluato da membrana de fibrina para cultivar osteoblastos. O estudo comparava a compatibilidade e proliferação celular entre as membranas de fibrina e de colágeno comercial. Os resultados mostraram maior proliferação celular por BrdU para a membrana de PRF, assim como maior diferenciação celular por teste de fosfatase alcalina. Novamente o ensaio de LDH revelou maior citotoxicidade para a cultura contendo eluato de fibrina, sendo explicado pela presença de glóbulos vermelhos (eritrócitos), que ficam aprisionados dentro da matriz de fibrina, não assumindo a hipótese do estudo anterior.

Em nosso estudo observamos diferença significativa de proliferação celular entre o grupo controle e entre os grupos de eluato, sendo o eluato1 o grupo com maior quantidade de núcleos marcados e em proliferação por BrdU. A diferença nos resultados sugere que o coágulo de fibrina pode variar na quantidade de plaquetas, citocinas e fatores de crescimentos, que são fundamentais para o mecanismo celular de proliferação celular, uma vez que foram produzidas membranas de dois doadores.

A formação do coágulo de fibrina envolve uma lenta polimerização da fibrina no tubo, que resulta da coagulação feita por concentrações autólogas de trombina, que influenciam na estrutura tridimensional da malha de fibrina obtida. Dessa forma, a fibrina formada pode assumir duas arquiteturas distintas: tetramolecular condensada, com junções bilaterais, e trimolecular conectada, com junções equilaterais. O PRF com junções bilaterais é formado em altas concentrações de trombina, resultando em uma rede de fibrina muito rígida, que não favorece a passagem dos fatores de crescimento para meio celular. Por outro lado, em baixa

concentração de trombina, a rede de fibrina formada com junções equilaterais é fina e flexível, facilitando a infiltração dos fatores de crescimento e quimiotaxia de outras células para o local (Dohan et al., 2006a)

Os resultados de proliferação celular em contato com PRF também são corroborados com o estudo de Ehrenfest et al. (2009) que analisaram o seu efeito *in vitro* em cultura primária de diferentes tipos celulares humanos (fibroblastos gengivais, pré-queratócitos dermais, pré-adipócitos e osteoblastos maxilo-faciais), comprovando a capacidade do PRF em induzir a proliferação de todos os tipos celulares, principalmente dos osteoblastos e sugerindo que os fatores de crescimento promovem angiogênese, proliferação e diferenciação celular.

O uso de CTDAh derivadas de tecido adiposo mamário e PRF foi realizado Xu et al., (2016). Esses autores trataram as células-tronco com ginsenoside Rg1 (composto esteroide extraído do ginseng), e com PRF. Ambos promoveram proliferação e diferenciação celular e foi observada a expressão de colágeno e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

4.3 DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA

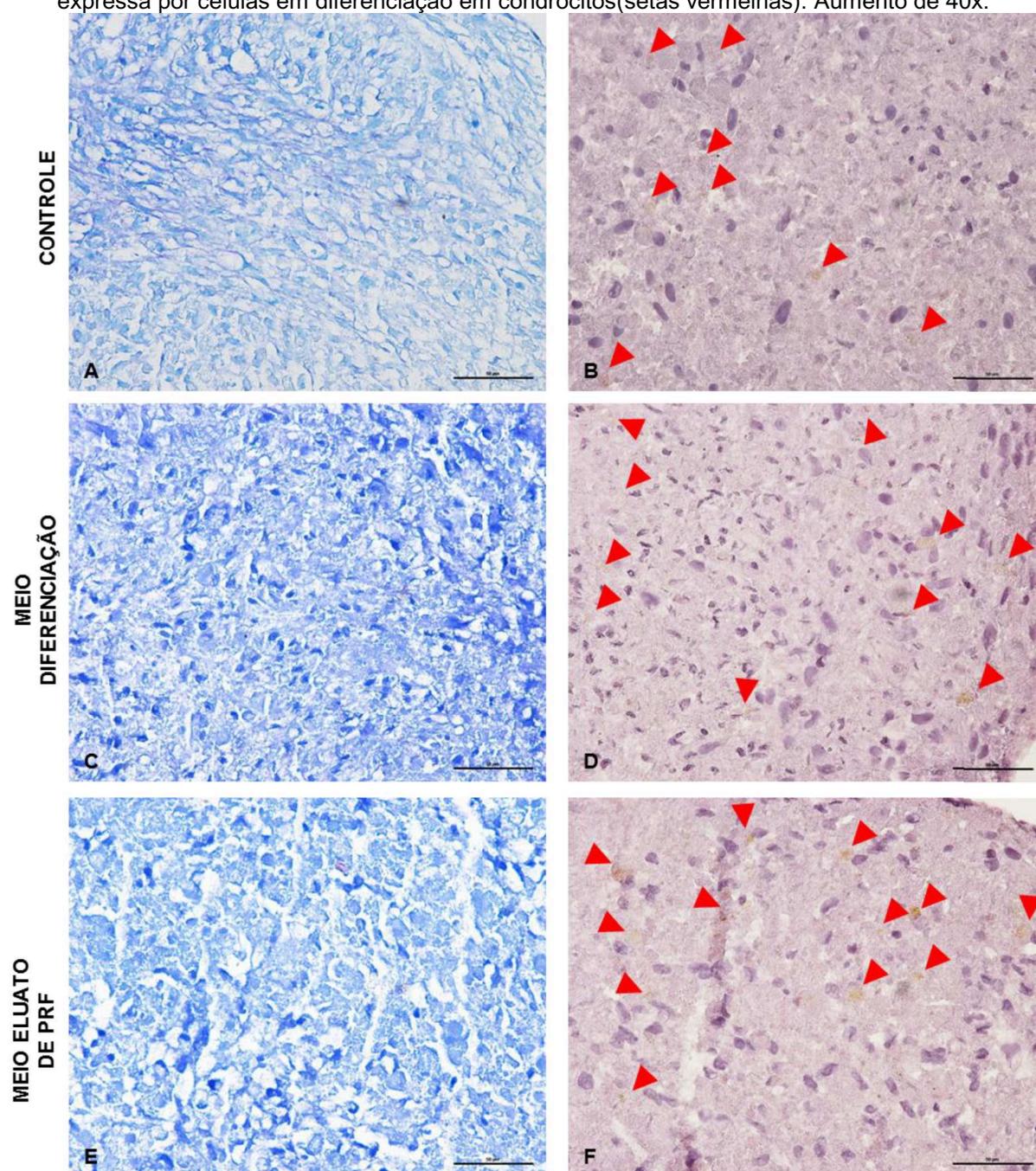
A análise microscópica das lâminas histológicas do ensaio de diferenciação condrogênica demonstrou que as três condições do ensaio (controle, meio de diferenciação comercial Gibco™ e eluato de fibrina) foram capazes de induzir a diferenciação das células-tronco em condrócitos.

É possível observar nas imagens microscópicas, figura 18, em azul de toluidina que as células cultivadas em meio de diferenciação comercial e em eluato de fibrina apresentaram uma matriz extracelular mais organizada (C e E), com poucos espaços entre as células, em comparação com as células cultivadas somente com meio SFB (controle). As células do controle (A) possuem uma matriz com bastante espaço entre as células e com coloração menos intensa do que os demais ensaios (meio diferenciação e eluato de fibrina) indicando menor quantidade de mucopolissacarídeos na matriz extracelular. A coloração de azul de toluidina marca grupos ácidos de componentes celulares, como a região do núcleo celular e tem afinidade por mucopolissacarídeos, encontrados na matriz extracelular cartilaginosa, como proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Rebelatto et al., 2008).

A marcação imunocitoquímica para agrecana sugere que todos os ensaios possuem a glicoproteína expressa na matriz extracelular. A marcação é visualizada

com pouca intensidade em castanho (setas vermelhas em B, D e F), pois se trata de cultivo celular experimental de 21 dias. Comparando as imagens podem-se identificar pontos que variam na tonalidade de castanho (claro a médio) no citoplasma de várias células. Conforme mostra a figura 18 as células do meio contendo eluato tiveram expressão de agrecan mostrando o início de diferenciação condrocítica confirmado pela coloração de azul de toluidina.

Figura 18. Avaliação microscópica do ensaio de diferenciação condrogênica: (A, C, E) matriz extracelular evidenciada pela coloração em Azul de toluidina, mostrando maior intensidade no meio de diferenciação e eluato e (B, D, F) marcação em imunocitoquímica para agrecana, proteína da MEC, expressa por células em diferenciação em condrócitos (setas vermelhas). Aumento de 40x.



Durante a diferenciação condrogênica os condrócitos sintetizam a matriz extracelular enquanto outros fatores de crescimento atuam sinergicamente para este evento. Froelich et al. (2012) cultivou CTDAh com um biomaterial composto de fibrina em gel e poliuretano, e adicionando fatores de crescimento TGF- β e BMP-2 por 35 dias. O ensaio comprovou a capacidade das CTDAh em se diferenciar em condrócitos, do compósito (fibrina+poliuretano) servir como arcabouço para o crescimento celular, e ainda, detectou a deposição da agrecana e de glicosaminoglicana na matriz extracelular.

A diferenciação condrocítica também foi comprovada com o uso do plasma rico em plaquetas (PRP). Mishra e colaboradores (2009) observaram *in vitro* que o PRP tinha capacidade de proliferação e diferenciação das células-tronco em condrócitos, a partir do uso de marcadores de ciclo celular (Sox-9) e de componente estrutural da cartilagem articular (agrecana).

Hui e colaboradores (2008) estudaram a influência do colágeno em cultivo de micromassa de células-tronco (CTMh) pré diferenciadas em condrócitos. A partir de ensaios histológicos e imunocitoquímicos puderam verificar positividade de marcação em componentes da matriz extracelular da micromassa celular, como a GAG, colágeno tipo II e agrecana altamente expressos pela célula. Este achado corrobora com os resultados histológicos e imunocitoquímicos deste trabalho, onde a matriz extracelular foi intensamente marcada em Azul de toluidina e em agrecan. Esses achados sugerem que o eluato de fibrina induziu as células-tronco a se diferenciarem em condroblastos.

O plasma rico em fibrina (PRF) é um concentrado não só de plaquetas, mas também de fatores de crescimento, que estimulam o desenvolvimento celular. Ehrenfest et al. (2010b) demonstrou em sua pesquisa que o PRF estimula significativamente a proliferação e diferenciação das culturas de células testadas. Células-tronco mesenquimais derivadas de osso (BMSC) foram cultivadas em condições de proliferação ou diferenciação, com ou sem PRF, obtido dos mesmos doadores das células-tronco. Depois de 7 dias, as membranas de PRF foram retiradas, sendo paralelamente testadas outras culturas com 2 membranas para verificar presença de dose-dependente do PRF. Os ensaios demonstraram tanto o efeito dose-dependente do PRF na proliferação quanto na diferenciação das células em osteoblastos, comprovando as propriedades de osteocondução e osteoindução do biomaterial para uso em cirurgias.

Em outro ensaio de proliferação celular, Wu e colaboradores (2012) comprovaram que a membrana de PRF é capaz de diferenciar as células em osteoblastos assim como regular a expressão das proteínas que sintetizam a matriz extracelular, resultando em um efeito de regeneração do tecido lesado.

5 CONCLUSÃO

De acordo com o nosso protocolo experimental, o eluato de membrana de fibrina provocou proliferação nas células-tronco derivadas de tecido adiposo, assim como demonstrou diferenciação condrocítica, quando comparado ao grupo controle. A preparação da membrana de plasma rico de fibrina foi aplicada de acordo com a técnica de Choukroun, resultando em membranas viáveis para utilização *in vitro*, por possuir todas as camadas necessárias para a infiltração das plaquetas e dos fatores de crescimento. Outros estudos, com mais doadores de sangue periférico, seriam necessários para garantir um maior número de amostras, e verificar a variabilidade autóloga dos fatores fisiológicos da membrana de fibrina.

REFERÊNCIAS

- AKKIRAJU, H.; NOHE, A. Role on chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. **Journal of Developmental Biology**, v.3, n.1, p.177-172, 2015.
- ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; ZALDUENDO, M.; LA-FUENTE, M.; ORIVE, G.; AZOFRA, J.; ANDIA, I. Autologous fibrin matrices: A potencial source of biological mediators that modulate tendon cell activities. **Wiley InterScience**, v.1, n.1, p. 285-293, 2006.
- BADADE, P.S.; MAHALE, S.A.; PANJWANI, A.A.; VAIDYA, P.D.; WARANG, A.D. Antimicrobial effect of platelet-rich plasma and platelet rich-fibrin. **Indian J Dent Res**, v. 27, n.3, p. 300-304, 2016.
- BETSCH, M.; SCHNEPPENDALHL, J.; THUNS, S.; HERTEN, M.; SAGER, M.; JUNGBLUTH, P.; HAKIMI, M.; WILD, M. Bone marrow aspiration concentrate and platelet rich plasma for osteochondral repair in a porcine osteochondral defect model. **Plosone**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013.
- BOROJEVIC, R. Cenário atual das terapias celulares. **Seminário Nacional sobre Regulação em Terapias Celulares, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Relatório**, p.14-17, 2012.
- BUCKWALTER, J.A. Articular cartilage: injuries and potencial for healing. **Journal Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v.28, n.4 p.192-202, 1998.
- BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J; GRODZINSKY, A.J. Articular cartilage and oostearthristis. **AAOS Intructional Course Lectures**, v.54, n.1, p.465-480, 2005.
- CENTENO, C.J.; BUSSE, D.; KISIDAY, J.; KEOHAN, C.; FREEMAN, M.; KARLI, D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. **Pain Physician**, v.11, n.3, p.343-353, 2008.
- CHAHLA, J.; DEAN, C.S.; MOATSHE, G.; PASCUAL-GARRIDO, C.; CRUZ, R.S.; LAPRADE, R.F. Concentrated bone marrow aspirate for the treatment of chondral injuries and osteoarthritis of the knee: a systematic review of outcomes. **The Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v.4, n.1, p. 1-8, 2016.
- CHIEN, C.S.; HO, H.O.; LIANG, Y.C.; KO, P.H. SHEU, M.T.; CHEN, C.H. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. **Journal of Biomedical Materials Research B: Apllied biomaterials**, v.100, n.4, p.948-955, 2012.
- CHOUKROUN, J.; ADDA, F.; SCHOEFFLER, C.; VERVELLE, A. An opportunity in perio-implantology: the PRF. **Implantodontie**, v.42, p. 55–62, 2001.
- CHOUKRUON, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARDI, M-O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; DOHAN, D.M. Platelet-rich fibrina (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. **Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, n.1, p.56-60, 2006.

COSTA, R.C.C.; MIGUEL, F.B.; ROSA, F.P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **R. Ci. Méd. Biol.**, v.4, n.1, p.70-76, 2005.

DEL CORSO, M.; TOFFLER, M.; EHRENFEST, D.M.D. Use of autologous leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) membrane in post-avulsion sites. **The Journal of Implant and Advanced Clinical Dentistry**, v.1, n.9, p.27–35, 2010.

DING, L.; LI, X.; SUN, H.; SU, J.; LIN, N.; PÉAULT, B.; SONG, T.; YANG, J.; DAI, J.; HU, Y. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. **Biomaterials**, v.35, n.1, p.4888-4900, 2014.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. **Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, n.1, p.37-44, 2006a.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. **Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, n.1, p.45-50, 2006b.

DOHAN, D.M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S.L.; DOHAN, A.J.J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: A new feature for platelet concentrates? **Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, n.5, p.1-5, 2006c.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

DOUGLAS, T.E.L.; GASSLING, V.; DECLERCQ, H.A.; PURCZ, N.; PAMULA, E.; HAUGEN, H.J.; CHASAN, S.; MULDER, E.L.W.; JANSEN, J.A.; LEEUWENBURGH, S.C.G. Enzymatically induced mineralization of platelet-rich fibrin. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v.100, n.5, p.1335-1346, 2012.

EHRENFEST, D.M.; DISS, A.; ODIN, G.; DOGLIOLI, P.; HIPPOLYTE, M.O.; CHARRIER, G. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. **Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103 n.3, p.341-352, 2009.

EHRENFEST, D.M.; DEL CORSO, D.; DISS, A.; MOUHYI, J.; CHARRIER, J.B. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. **J. Periodontol**, v.81, n.4, p.546-556, 2010a.

EHRENFEST, D.M.; DOGLIOLI, P.; PEPPPO, G.M.; DEL CORSO, M.; CHARRIER, J.B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates *in vitro* proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. **Archives of oral biology**, v.55, n.1, p.185-194, 2010b.

ELDESOQI, K.; HENRICH, D.; EL-KADY, A.M.; ARBID, M.S. EL-HADY, B.M.; MARZI, I.; SEEBACH, C. Safety evaluation of a bioglass-polylactic acid composite scaffold seeded with progenitor cells in a rat skull critical-size bone defect. **PloS ONE** v.9, n.2, p.1-13, 2014.

ESPOSITO, A.R.; DUEK, E.A.R.; LUCCHESI, C.; PRAZERES, L.; PEZZIN, A.P.T. Citocompatibilidade de blendas de Poli(p-dioxanona)/Poli(hidroxibutirato) (PPD/PHB) para aplicações em engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, v.20, n. especial, p.383-388, 2010.

FEDOROVICH, N.E.; ALBLAS, J.; HENNINK, W. E. ÖNER, F.C.; DHERT, W.J.A. Organ printing: the future of bone regeneration? **Trends in Biotechnology**, v.29, p.601-606, 2011.

FILHO, M.M.C.C.; DACA, D.; COHEN, M.; FERRETTI, M. Atualização no diagnóstico e tratamento das lesões condrais de joelho. **Ver. Bras. Ortop.**, v.47, n.1, p.12-20, 2012.

FOX, A.J.S.; BEDI, A.; RODEO, S.A. The basic of articular cartilage: structure, composition, and function. **Sports Health**, v.1, n.6, p.461-468, 2009.

FROELICH, K.; STIAWAN, L.E.; TECHNAU, A.; TIRADO, M.R.; HACKENBERG, S.; HAGEN, R.; STAUDENMAIER, R.; KLEINSASSER, N.H. Influence of diferente growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in polyurethane-fibrin composites. **Int J Artif Organs**, v.35, n.12, p.1047-1060, 2012.

FULLER, R. Osteoartrose. In: **Tratado de medicina de reabilitação**. São Paulo: Roca, Cap.116, p.889-904, 2007.

GASSLING, V.; DOUGLAS, T.; WARNKE, P.H.; AÇIL, Y.; WILTFANG, J.; BECKER, S.T. Platelet-rich fibrina membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. **Clinical Oral Implant Research**, v.21, n.1, p.543-549, 2010.

GASSLING, V.; HEDDRICH, J.; AÇIL, Y.; PURCZ, N.; WILTFANG, N. DOUGLAS, T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering application. **Clinical Oral Implants Research**, v.24, n.1, p.320-328, 2013.

GE, Z.; LI, C.; HENG B.C.; CAO, G.; YANG, Z. Functional biomaterials for cartilage regeneration. **J Biomed Mater Res A**, v.100, p.2526–2536, 2012.

GOBBI, A.; KARNATZIKOS, G.; SCOTTI C.; MAHAJAN, V.; MAZZUCCO, L.; GRIGOLO, B. One-Step Cartilage Repair with Bone Marrow Aspirate Concentrated Cells and Collagen Matrix in Full-Thickness Knee Cartilage Lesions: Results at 2-Year Follow up. **Cartilage**, v.2, n.3, p.286-299, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto & atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 5 e 7, p. 72-110, 2013.

KHEIR, E.; SHAW, D. Management of articular cartilage defects. **Orthopaedics and trauma**, v.23, n.4, p.266-273, 2009.

KIM, J.; LEE, G.W.; JUNG, G.H.; KIM, C.K. KIM, T.; PARK, J.H.; CHA, S.S. YOU, Y. Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection

in degenerative arthritis of the knee. **Eur J Orthop SurgTraumatol**, v.1, n.1, p.1-7, 2014.

KHORSHIDI, H.; RAOOFI, S.; BAGHERI, R.; BANIHASHEMI, H. Comparison of the mechanical properties of early leukocyte- and platelet-rich fibrin versus PRGF/Endoret membranes. **International Journal of Dentistry**, v.1, n.1, p.1-7, 2016. Disponível em: <<<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1849207>>>

KNAPEN, M.; GHELDOLF, D.; DRION, P.; LAYROLLE, P.; ROMPEN, E.; LAMBERT, F. Effect of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) on bone regeneration: a study in rabbits. **Clinical implant dentistry and related research**, v.17, n.1, p.143-152, 2015.

KOLF, C.M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v.9:204, p.1-10, 2007.

LUNDQUIST, R.; DZIEGIEL, M.H.; ÁGREN, M.S. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. **Wound Repair and Regeneration**, v.16, n.1, p.356-363, 2008.

LUNDQUIST, R.; HOLMSTROM, K.; CLAUSEN, C.; JORGENSEN, B.; KARLSMARK, T. Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. **Wound repair and regeneration**, v.21, n.1, p.66-76, 2013.

MAKRIS, E.A.; GOMOLL, A.H.; MALIZOS, K.N.; HU, J.C.; ATHANASIOU, K.A. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v.11, n.1, p.21-34, 2015.

MISHRA, A.; TUMMALA, P.; KING, A.; LEE, B.; KRAUS, M.; TSE, V.; JACOBS, C.R. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. **Tissue Engineering: Part C**, v.15, n.3, p.431-435, 2009.

MYERS, K.R.; SGAGLIONE, N.A.; GRANDE, D.A. Instructional review: research. Trends in biological joint resurfacing. **Bone & Joint Research**, v.2, n.9, p.193-199, 2013.

NARANJO, J.C.S.; ZAPATA, D.F.L. Fisiopatología celular de La osteoartritis: El condrocito articular como protagonista. **latrei**, vol.24, n.2, p.167-178, 2011.

NG, K.W.; WANIVENHAUS, F.; CHEN, T.; HSU, H.C.; ALLON, A.A.; ABRAMS, V.D.; TORZILI, P.A.; WARREN, R.F.; MAHER, S.A. A novel macroporous polyvinyl alcohol scaffold promotes chondrocyte migration and interface formation in an in vitro cartilage defect model. **Tissue Engineering: Part A**, v.18, n.11/12, p.1273-1281, 2012.

OLIVEIRA, L.S.A.F.; OLIVEIRA, C.S.; MACHADO, A.P.L.; ROSA, F.P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, n.1, p.37-44, 2010.

PATEL, S.; RODRIGUEZ-MERCHAN, E.C.; HADDAD, F.S. The use of fibrin glue in surgery of the knee. **J Bone Joint Surg Br.**, v.92, n.10, p.1325–1331, 2010.

PEI, M.; HE, F.; LI, JINGTING, L.; TIDWELL, J.E.; JONES, A.C.; MCDONOUGH, E.B. Repair of Large Animal Partial-Thickness Cartilage Defects Through Intraarticular Injection of Matrix-Rejuvenated Synovium-Derived Stem Cells. **Tissue engineering: Part A**, v.00, n.00, p.1-11, 2013

PUCINELLI, M.L.C.; HOLANDA, H.; COSTA, L.H.; GRANERO, M.; ROCHA, E.M.C. Osteoartrite e reabilitação. In: **Medicina física e reabilitação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 23, p.318-329, 2010.

RAJANGAM, T.; NA, S.S.A. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, n.1, p.3641-3662, 2013.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A.M.; MORETÃO, M.P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F.; BROFMAN, P.S. GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from boné marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, n.7, p.901-913, 2008.

ROY, S.; DRIGGS, J.; ELGHARABLY, H.; BISWAS, S.; FINDLEY, M.; KHANNA, S.; GNYAWALI, U.; BERGDALL, V.K.; SEN, C.K. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. **Wound repair and regeneration**, v.19, p.753-766, 2011.

SÁNCHEZ, M.; ANDIA, I.; ANITUA, E.; SÁNCHEZ, P. Platelet rich plasma (PRP) biotechnology: Concepts and therapeutic applications in orthopedics and sports medicine. **Innovations in Biotechnology**, In Tech, Cap. 6, p.113-138, 2012. Disponível em: <<<http://www.intechopen.com/books/innovations-in-biotechnology/platelet-rich-plasma-prp-biotechnology-concepts-and-therapeutic-applications-in-orthopedics-and-spor>>>

SCLAFANI, A.P.; MCCORNICH, S.A. Induction of dermal collagenesis, angiogenesis and adipogenesis in human skin by injection of platelet-rich fibrin matrix. **Arch. Facial Plast. Surg.**, v.14, n.2, p.132-136, 2012.

SILVEIRA, F. O. R. Comparação da utilização exclusiva de osso esponjoso autólogo com a utilização mista de osso esponjoso autólogo e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) na cicatrização do espaço criado pela osteotomia realizada na técnica de tibial tuberosity advancement (TTA). Tese de mestrado. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. 2013.

SOYER, T.; AYVA, S.; BOYBEYI, O.; ASLAN, M.K.; ÇAKMAK, M. The effect of platelet rich fibrin on growth factor levels in urethral repair. **Journal of pediatric surgery**, v.48, p.2545-2549, 2013.

STOCKWELL, R.A. The cell density of human articular and costal cartilage. **Journal of Anatomy**, 101(Pt 4):753-763, 1967.

SUH, J.K.; SCHERPING, S.; MARUI, T.; STEADMAN, R.; WOO, S.L.Y. Basic science of articular cartilage injury and repair. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v.3, n.2, p.78-86, 1995.

UCELLI, A.; PISTOIA, V.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? **Trends Immunology**, v.28, n.5, p. 219-226, 2007.

VAN DER KRAAN, P.M.; VAN DER BERG, W.B. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? **Osteoarthritis and Cartilage**, v.20, n.1, p.223-232, 2012.

VAN DER REST, M.; AUBERT-FOUCHER, E; DUBLET, B.; EICHENBERGER, D.; FONT, BERNARD; GOLDSCHMIDT, D. Structure and function of the fibril-associated collagens. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, n. 4, p.820-824, 1991.

VAN DER REST, M; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **The FASEB Journal**, v.5, n.13, p.2814-2823, 1991.

VAVKEN, P.; JOSHI, S.M.; MURRAY, M.M. Fibrin concentration affects ACL fibroblast proliferation and collagen synthesis. *The Knee*, v.28, p.42-46, 2011.

WANG, X. Overview on Biocompatibilities of Implantable Biomaterials. **In: Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**.Intech, Cap. 5, p.111-155, 2013.

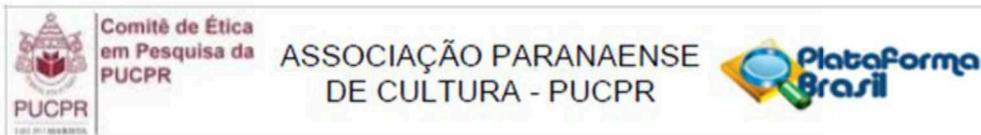
WU, C.L.; LEE, S.S.; TSAI, C.H.; LU, K.H.; ZHAO, J.H.; CHANG, Y.C. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. **Australian Dental Journal**, v.57, n.1, p.207-212, 2012.

XU, F.T.; LIANG, Z.J.; LI, H.M.; PENG, Q.L; HUANG, M.H.; LI, D.Q.; LIANG, Y.D.; LI, G.Y.; LI, D.H.; YU, B.C.; HUANG, J.R. Giseonside Rg1 and platelet-rich fibrin enhance human breast adipose-derived stem cell function for soft tissue regeneration. **Oncotarget**, v.7, n.23, p.35390-35403, 2016.

ZHONG, W.; SUMITA, Y.; OHBA, S.; KAWASAKI, T.; NAGAI, K; MA, G.; ASAHINA, I. *In vivo* comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrates vs. platelet rich plasma. **Plos one**, v.7, n.7, p. 1-7, 2012.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, n.1, p.4279-4295, 2002.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Caracterização da membrana de Plasma Rico em Fibrina (PRF) para regeneração da cartilagem

Pesquisador: Fernanda Gimenez de Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50609815.1.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.348.208

Apresentação do Projeto:

Este projeto tem como objetivo verificar a viabilidade da membrana de PRF em artroscopia para regeneração de cartilagem hialina a partir da comparação de suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas com a membrana de colágeno comercial.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos citados no projeto são:

- Objetivo Primário: Verificar a viabilidade da membrana de PRF em artroscopia para regeneração de cartilagem hialina a partir da comparação de suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas com a membrana de colágeno comercial.
- Objetivos Secundários: a) Obter membranas de PRF; b) Caracterizar morfologicamente a membrana de colágeno e de PRF; c) Caracterizar quanto à resistência à tração a membrana de colágeno e de PRF; d) Caracterizar, in vitro, a capacidade de adesão e proliferação celular sobre a membrana de colágeno e de PRF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos citados no projeto referem-se a a pulsão venosa a que os participantes serão

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@puopr.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TECIDO ADIPOSEO

<p>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</p>	<p>Página 1 de 2</p>
<p>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</p>	
<p>Eu estou sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa científica. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assino ao final deste documento, que está em três vias. Uma delas é minha, a outra é do pesquisador responsável e a terceira ficará arquivada na instituição (PUCPR). Em caso de recusa eu não serei penalizado (a) de forma alguma.</p>	
<p>Eu, _____, RG _____, nacionalidade _____, idade _____, estado civil _____, profissão _____, endereço _____</p>	
<p>entendo que estou sendo convidado a participar do projeto chamado: "CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA PARA REGENERAÇÃO EM CARTILAGEM". Eu entendo que a minha participação neste projeto é voluntária e não me dá direito a qualquer tipo de remuneração.</p>	
<p>1. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido por médicos e pesquisadores empenhados na pesquisa com células-tronco.</p>	
<p>2. O pesquisador responsável deste projeto é a Fernanda Gimenez de Souza - (Endereço: R. Pe. Anchieta, 2671-ap. 307; Telefone: (41) 9254-1763) e com ela poderei manter contato pelo telefone acima relacionado.</p>	
<p>3. A minha participação no referido estudo será no sentido de doar o tecido adiposo (gordura) excedente do procedimento de lipoaspiração, a qual usualmente seria desprezada. O procedimento cirúrgico não será alterado não trazendo riscos físicos para mim.</p>	
<p>4. Deste material doado (gordura), serão isoladas as células que serão estudadas em laboratório e não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico ou comercial.</p>	
<p>5. Eu autorizo o armazenamento de amostras (uma parte pequena) das células e do ácido desoxirribonucleico – DNA – (molécula que contém as informações genéticas) para testes que se fizerem necessários, agora, e no futuro.</p>	
<p>_____ RUBRICADO DO RESPONSÁVEL</p>	<p>_____ RUBRICADO DO CONSENTIDO</p>

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 2 de 2

6. Eu autorizo o descarte das amostras armazenadas de células e do DNA ao término do estudo, e as amostras que não atenderem aos critérios (regras) de isolamento e armazenamento.

7. Estou ciente que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

8. Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

9. Sendo assim, não havendo quaisquer dúvidas, dou-me por esclarecido(a) quanto aos objetivos, importância e resultados desta pesquisa, dos meus direitos, riscos e benefícios, em participar desta pesquisa. Portanto, concordo de livre e espontânea vontade com a minha participação na realização desta pesquisa.

10. Li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

"Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um email para nep@pucpr.br".

Curitiba, ____ de _____ de 20____.

Nome do sujeito da pesquisa = _____

Assinatura do sujeito da pesquisa = _____

Nome do pesquisador responsável = Fernanda Gimenez de Souza

Assinatura do pesquisador responsável = _____

RUBRICADO(S) AUTOR(ES) DA PESQUISA

RUBRICADO(S) PESQUISADOR

SANGUE PERIFÉRICO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu estou sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa científica. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assino ao final deste documento, que está em três vias. Uma delas é minha, a outra é do pesquisador responsável e a terceira ficará arquivada na instituição (PUCPR). Em caso de recusa eu não serei penalizado (a) de forma alguma.

Eu, _____,
 RG _____, nacionalidade _____, idade _____,
 estado civil _____, profissão _____, endereço _____,
 _____.

entendo que estou sendo convidado a participar do projeto chamado: "CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA PARA REGENERAÇÃO EM CARTILAGEM". Eu entendo que a minha participação neste projeto é voluntária e não me dá direito a qualquer tipo de remuneração.

1. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido por médicos e pesquisadores empenhados na pesquisa com células-tronco.
2. O pesquisador responsável deste projeto é a Fernanda Gimenez de Souza - (Endereço: R. Pe. Anchieta, 2671-ap. 307; Telefone: (41) 9254-1763) e com ela poderei manter contato pelo telefone acima relacionado.
3. A minha participação no referido estudo será no sentido de doar sangue periférico.
4. Deste material doado (sangue), serão isoladas as membranas de plasma rico em fibrina que serão estudadas em laboratório e não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico ou comercial.
5. Eu autorizo o armazenamento de amostras (uma parte pequena) das células e do ácido desoxirribonucleico – DNA – (molécula que contém as informações genéticas) para testes que se fizerem necessários, agora, e no futuro.
6. Eu autorizo o descarte das amostras armazenadas de células e do DNA ao término do estudo, e as amostras que não atenderem aos critérios (regras) de isolamento e armazenamento.

RESEARCHER'S SIGNATURE

RESEARCHER'S SIGNATURE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 2 de 2

6. Eu autorizo o descarte das amostras armazenadas de células e do DNA ao término do estudo, e as amostras que não atenderem aos critérios (regras) de isolamento e armazenamento.
7. Estou ciente que a minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.
8. Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.
9. Sendo assim, não havendo quaisquer dúvidas, dou-me por esclarecido(a) quanto aos objetivos, importância e resultados desta pesquisa, dos meus direitos, riscos e benefícios, em participar desta pesquisa. Portanto, concordo de livre e espontânea vontade com a minha participação na realização desta pesquisa.
10. Li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

"Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um email para nep@pucpr.br".

Curitiba, ____ de _____ de 20 ____.

Nome do sujeito da pesquisa = _____

Assinatura do sujeito da pesquisa = _____

Nome do pesquisador responsável = Fernanda Gimenez de Souza

Assinatura do pesquisador responsável = _____

RESEARCHER RESPONSIBLE

RESEARCHER RESPONSIBLE