

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**MESTRADO – 2020/2021**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE PARA  
VALIDAÇÃO DE UM PRODUTO DE TERAPIA AVANÇADA  
COMPOSTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA RECELULARIZADA  
COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Aluno: Henrique Trigo de Castro Junior  
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman  
Coorientadora: Dra. Lidiane Maria Boldrini Leite

**CURITIBA**  
**JUNHO DE 2021**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**MESTRADO – 2020/2021**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE PARA  
VALIDAÇÃO DE UM PRODUTO DE TERAPIA AVANÇADA  
COMPOSTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA RECELULARIZADA  
COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman  
Coorientadora: Dra. Lidiane Maria Boldrini Leite

**CURITIBA**  
**JUNHO DE 2021**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Edilene de Oliveira dos Santos CRB-9/1636

C355a  
2021 Castro Junior, Henrique Trigo de  
Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade para validação de um produto de terapia avançada composto de membrana amniótica recelularizada com células-tronco mesenquimais / Henrique Trigo de Castro; orientador: Paulo Roberto Slud Brofman; coorientadora: Lidiane Maria Boldrini Leite. -- 2021  
106 f. : il. ; 30 cm  
  
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2021.  
Bibliografia: f. 83-93  
  
1. Ciências da Saúde. 2. Membrana Amniótica. 3. Terapia baseada em transplante de células e tecidos. 4. Testes imunológicos de citotoxicidade. 5. Testes de genotoxicidade.  
I. Brofman, Paulo Roberto Slud. II. Boldrini-Leite, Lidiane Maria III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título

CDD. 20.ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL  
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 30 dias do mês de junho de 2021 às 09:00, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação “**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE PARA VALIDAÇÃO DE UM PRODUTO DE TERAPIA AVANÇADA COMPOSTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA RECELULARIZADA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**” apresentado por **Henrique Trigo de Castro Junior** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman - Presidente	
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito (PUCPR)	
Profa. Dra. Regina Coeli dos S. Goldenberg (UFRJ)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman  
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito  
Profa. Dra. Regina Coeli dos S. Goldenberg

Conceito: **Aprovado**  
Conceito: **Aprovado**  
Conceito: **Aprovado**

Parecer Final:

Observações da Banca Examinadora:

**Aprovado**

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman  
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena  
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o modelo tradicional previsto nas Normas para Elaboração de Dissertações e Teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PPGCS/PUCPR), considerando-se a normatização da Agência Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023. Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.

# DEDICATÓRIA

*Dedico:*

*A minha amada mãe, Gilmara, sem a qual as plântulas do meu deslumbre pela Ciência não teriam desenvolvido raízes.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço com apreço e carinho:

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), berço do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do qual os ensinamentos técnicos e valores éticos foram fundamentais para a realização do Mestrado.

O Programa de Iniciação Científica da PUCPR, pela concessão da Bolsa de PIBIC Master, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da instituição pela infraestrutura e qualificado corpo docente.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, coordenador do Núcleo de Tecnologia Celular (NTC) da PUCPR, pela gentileza na orientação desta pesquisa de mestrado, o qual tenho profunda admiração e respeito.

A Dra. Lidiane Maria Boldrini Leite, colaboradora e pesquisadora do NTC, pela dedicação ímpar na coorientação desta pesquisa. Agradeço o seu exemplo ético e comprometido com a pesquisa, que foi fundamental durante diversos momentos importantes da graduação e agora na pós-graduação, o qual me inspirou muitas vezes.

A Profa. Dra. Alexandra Cristina Senegaglia, responsável técnica do NTC, por acreditar em minha dedicação com a pesquisa, me proporcionando muitas oportunidades acadêmicas, a qual deixo a minha mais profunda admiração.

Os membros do Centro de Tecnologia Celular, que integra o NTC, que proporcionaram um ambiente especial de convivência, em especial a Profa. Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto e a MSc. Bruna Schaidt, que abriram o caminho para a realização do mestrado com suas pesquisas referentes a membrana amniótica descelularizada.

Os membros do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, que integra o NTC, pelo acolhimento durante os períodos da graduação e pós-graduação neste fantástico campo de pesquisa, em especial ao MSc. Agner Hochuli, ao doutorando Felipe Frago e as Dra.

Letícia Fracaro e Fabiane Barchiki, pelo esclarecimento de dúvidas e auxílio fundamental durante nos experimentos.

Aos PIBICs Ana Helena Selenko, João Antonio Carrara, Larissa Maiara Maleski e Marjorie Luíza Barbosa pelas trocas de experiências dentro do laboratório, assim como todo o auxílio prático durante a realização do projeto.

A mestrandia Nathalia Forti Francisco pelo valioso e imprescindível auxílio no planejamento e desenvolvimento dos experimentos, principalmente durante o cultivo celular e testes de citotoxicidade.

Aos membros convidados da Banca de Qualificação, Dra. Tamara Borgonovo e Dr. Marco Augusto Stimamiglio, pelas sugestões e contribuições com esse trabalho.

Aos membros convidados da Banca de Defesa, Dra. Regina Goldenberg e Dra. Selene Esposito, pelas considerações e contribuições com esse trabalho.

Aos membros do Laboratório de Citogenética e Microscopia, que integra o NTC, em especial a MCs. Isadora May Vaz por todo o auxílio e dedicação na condução e padronização dos ensaios de genotoxicidade. Você é e sempre será um cometa luminoso em todo lugar que passar.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Laboratório Multiusuário da PUCPR, pelo auxílio histológico e uso de equipamentos, em especial ao biólogo Seigo Nagashima.

Aos meus valiosos amigos Jennifer Vilela, Isabella Ferreira, Bruna Karoline e Vitor Polak, por todo o companheirismo e apoio emocional durante os meses de mestrado.

Aos meus amados pais Henrique e Gilmara, e a minha querida irmã Julia, por sempre acreditarem e me apoiarem em meus objetivos. Vocês são luzes em minha vida.

# EPÍGRAFE

*“O mar é tão profundo na calmaria quanto na tempestade”.*

*(John Donne)*

## RESUMO

**Introdução:** Os produtos de terapia avançada (PTA) são grandes promessas terapêuticas em situações clínicas complexas e sem alternativas médicas disponíveis. São classificados como: produtos de terapia celular avançada, de engenharia tecidual e de terapia gênica. A membrana amniótica humana (MAH) representa um biomaterial estável, flexível, resistente e de baixo custo, que quando somada às propriedades regenerativas das células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas do tecido do cordão umbilical (TCU) humano forma um PTA com alto potencial para utilização em tratamentos clínicos. Entretanto, é necessário o cumprimento de requisitos mínimos de eficácia, segurança e qualidade para seu uso, registro e comercialização. Visando validar a segurança e a qualidade do PTA desenvolvido, é imprescindível a realização de testes de biocompatibilidade que busquem avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade. Essas técnicas apresentam princípios específicos e podem ser utilizadas para determinar se o PTA é biocompatível com regiões acometidas por lesões condrais, através do co-cultivo com condrócitos.

**Objetivo:** Avaliar a biocompatibilidade de um produto de terapia avançada - membrana amniótica recelularizada com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido de cordão umbilical humano - em co-cultivo com condrócitos.

**Métodos:** O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CAAE: 83139918.1.0000.0020). Foram utilizadas três amostras de TCU para o isolamento das CTM, uma amostra de placenta para obtenção da MAH e uma amostra de tecido cartilaginoso para o isolamento de condrócitos. Para avaliar a biocompatibilidade, buscou-se mimetizar as condições *in vivo* de regiões acometidas por lesões condrais, co-cultivando condrócitos com: CTM, PTA, membrana comercial Chondro-Gide<sup>®</sup> celularizada com CTM e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - causador de danos citotóxicos) ou células da linhagem de adenocarcinoma cervical (HeLa - com acúmulo de danos genotóxicos). Foram realizadas as técnicas de vermelho neutro, MTT e anexina V/7-AAD para avaliar a citotoxicidade das condições testadas, e as técnicas de cometa, micronúcleo e análise cromossômica para analisar a presença de alterações nucleares.

**Resultados:** Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que os condrócitos co-cultivados com o PTA tiveram resultados semelhantes aos da Chondro-Gide<sup>®</sup>, não demonstrando danos citotóxicos nessas condições. Os ensaios de genotoxicidade demonstraram baixos índices de alterações nucleares nas amostras co-cultivadas com o PTA em comparação com a Chondro-Gide<sup>®</sup>.

**Conclusão:** O PTA, formado pelas CTM associadas à MAH, não apresentou efeitos citotóxicos ou genotóxicos em condrócitos co-cultivados *in vitro*. O produto validado, de acordo com os testes e normativas utilizadas, pode ser considerado biocompatível e disponibilizado como uma alternativa para diferentes tratamentos clínicos, tais como lesões da cartilagem articular.

**Palavras-chave:** Lesões Condrais; Membrana Amniótica Humana; Produto de Terapia Celular Avançada; Co-Cultivo; Testes de Citotoxicidade; Testes de Genotoxicidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** Advanced therapy medicinal products (ATMP) hold great therapeutic promise in complex clinical situations and with no medical alternatives available. They are classified as advanced cell therapy, tissue engineering and gene therapy products. The human amniotic membrane (HAM) represents a stable, flexible, resistant and low cost biomaterial, which when added to the regenerative properties of mesenchymal stem cells (MSC) derived from human umbilical cord tissue (UCT) forms an ATMP with high potential for use in clinical treatments. However, it is necessary to comply with minimum efficiency, safety and quality requirements for its use, registration and commercialization. In order to validate the safety and quality of the developed ATMP, it is essential to carry out biocompatibility tests that seek to assess cytotoxicity and genotoxicity. These techniques have specific principles and can be used to determine whether ATMP is biocompatible with regions affected by chondral lesions, through co-culture with chondrocytes.

**Objective:** Assess the biocompatibility of advanced therapy medicinal products - amniotic membrane recellularized with mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord tissue - in co-culture with chondrocytes.

**Methods:** The study was approved by the Research Ethics Committee from Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CAAE: 83139918.1.0000.0020). The UCT samples were used to isolate MSC, one placental sample to obtain HAM and one sample of cartilage tissue for isolate chondrocytes. To assess the biocompatibility of ATMP, we sought to mimic the *in vivo* conditions of regions affected by chondral lesions, co-cultivating chondrocytes with MSC, ATMP, commercial membrane Chondro-Gide<sup>®</sup> cellularized with MSC and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - causing of cytotoxic damage) or cells of the adenocarcinoma lineage (HeLa - the accumulation of genotoxic damage). Neutral red, MTT and annexin V/7-AAD techniques were performed to assess the cytotoxicity of the conditions tested and comet, micronucleus and chromosome analysis techniques to analyze the presence of nuclear alterations.

**Results:** The cytotoxicity tests demonstrated that the chondrocytes co-cultured with ATMP had results similar to those of Chondro-Gide<sup>®</sup>, showing no cytotoxic damage in these conditions. Genotoxicity assays demonstrated low rates of nuclear alterations in samples co-cultured with ATMP compared to Chondro-Gide<sup>®</sup>.

**Conclusion:** The ATMP, formed by MSC associated with decellularized HAM, did not show cytotoxic or genotoxic effects in co-cultured *in vitro* chondrocytes. According to the tests and standards used, the validated product can be considered biocompatible and made available, as an alternative for several clinical treatments, such as articular cartilage injuries.

**Keywords:** Chondral Injuries; Human Amniotic Membrane; Advanced Therapy Medicinal Products; Co-Cultivation; Cytotoxicity Tests; Genotoxicity Tests.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Ilustração representativa das zonas presentes na cartilagem articular .....	25
<b>FIGURA 2.</b> Ilustração representativa das divisões estruturais da membrana amniótica humana .....	27
<b>FIGURA 3.</b> Ilustração representativa do isolamento de células-tronco mesenquimais (CTM) do tecido do cordão umbilical (TCU) .....	29
<b>FIGURA 4.</b> Ilustração representativa da interseção que rege a biocompatibilidade .....	30
<b>FIGURA 5.</b> Ilustração representativa da incorporação do corante vermelho neutro .....	35
<b>FIGURA 6.</b> Ilustração representativa da incorporação do corante MTT .....	36
<b>FIGURA 7.</b> Ilustração representativa da ação da anexina V/7-AAD .....	38
<b>FIGURA 8.</b> Ilustração representativa do mecanismo que envolve o ensaio do cometa ....	39
<b>FIGURA 9.</b> Ilustração representativa da formação das alterações durante o teste de micronúcleo .....	41
<b>FIGURA 10.</b> Desenho do estudo .....	44
<b>FIGURA 11.</b> Ilustração representativa da secção da membrana amniótica humana descelularizada .....	47
<b>FIGURA 12.</b> Ilustração representativa das condições de co-cultivo .....	50
<b>FIGURA 13.</b> Cariograma representativo das células-tronco mesenquimais utilizadas no co-cultivo .....	57
<b>FIGURA 14.</b> Cariograma representativo dos condrócitos antes de serem co-cultivados .....	59
<b>FIGURA 15.</b> Cariograma representativo da amostra HeLa .....	60

<b>FIGURA 16.</b> Condrócitos após o ensaio do cometa .....	70
<b>FIGURA 17.</b> Análise das células após o teste de micronúcleo .....	71
<b>FIGURA 18.</b> Cariograma representativo dos condrócitos co-cultivados com as condições de estudo .....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Citotoxicidade dos produtos analisados pelo ensaio vermelho neutro após o co-cultivo com condrócitos .....	62
<b>TABELA 2.</b> Citotoxicidade dos produtos analisados pelo ensaio MTT após o co-cultivo com condrócitos .....	64
<b>TABELA 3.</b> Índice de dano e <i>scores</i> obtidos através do ensaio cometa .....	69
<b>TABELA 4.</b> Média da análise das células binucleadas após o teste de micronúcleo .....	72
<b>TABELA 5.</b> Cariótipo das condições de estudo através da análise cromossômica por bandeamento GTG .....	73

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1.</b> Expressão média dos marcadores de células-tronco mesenquimais (CTM) e viabilidade celular das amostras do estudo .....	56
<b>GRÁFICO 2.</b> Expressão dos marcadores para células derivadas da cartilagem e viabilidade celular .....	58
<b>GRÁFICO 3.</b> Percentual de citotoxicidade para as condições de estudo por meio do ensaio vermelho neutro .....	63
<b>GRÁFICO 4.</b> Percentual de citotoxicidade para as condições de estudo por meio do ensaio MTT .....	66
<b>GRÁFICO 5.</b> Percentual médio da citotoxicidade para as condições de estudo por meio dos ensaios vermelho neutro e MTT .....	67
<b>GRÁFICO 6.</b> Percentual de viabilidade celular para as condições de estudo .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrometros
<b>µM</b>	Micromolar
<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomycin D
<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APC</b>	Alofococianina (do inglês, <i>Allophycocyanin</i> )
<b>C</b>	Condrócitos humanos
<b>C/CTM</b>	Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais humanas
<b>C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio
<b>C/MC</b>	Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com células-tronco mesenquimais humanas
<b>C/PTA</b>	Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada
<b>CAAE</b>	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
<b>CD</b>	Grupos de Diferenciação Celular (do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i> )
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro quadrado
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CTM</b>	Células-Tronco Mesenquimais
<b>DMEM</b>	Meio de cultivo celular modificado por Dulbecco's (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>ECVAM</b>	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (do inglês, <i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> )
<b>FITC</b>	Isocianato de Fluoresceína (do inglês, <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> )
<b>g</b>	Grama
<b>g</b>	Gravidade

<b>GTG</b>	Bandas-G por Tripsina utilizando Giemsa (do inglês, <i>G-bands by Trypsin using Giemsa</i> )
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HeLa</b>	Células da linhagem de adenocarcinoma cervical
<b>HLA - DR</b>	Antígeno de Histocompatibilidade Leucocitária - DR (do inglês, <i>Histocompatibility Leukocyte Antigen – DR</i> )
<b>IC</b>	Concentração Inibitória
<b>IC20</b>	Concentração que inibe 20% do crescimento celular
<b>IC25</b>	Concentração que inibe 25% do crescimento celular
<b>IC50</b>	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
<b>IC80</b>	Concentração que inibe 80% do crescimento celular
<b>ICRS</b>	Sociedade Internacional de Reparo da Cartilagem (do inglês, <i>International Cartilage Repair Society</i> )
<b>ID</b>	Índice de Dano
<b>IDN</b>	Índice de Divisão Nuclear
<b>IMDM</b>	Meio Dulbecco Modificado por Iscove (do inglês, <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> )
<b>ISCN</b>	Sistema Internacional para Nomenclatura Citogenética Humana (do inglês, <i>International System for Human Cytogenomic Nomenclature</i> )
<b>ISCT</b>	Sociedade Internacional para Terapia Celular (do inglês, <i>International Society for Cellular Therapy</i> )
<b>ISO</b>	Organização Internacional de Normatização (do inglês, <i>International Organization for Standardization</i> )
<b>LUCIA</b>	Laboratório Universal de Análise de Imagens de Computador (do inglês, <i>Laboratory Universal Computer Image Analysis</i> )
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliampere
<b>MAH</b>	Membrana Amniótica Humana
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mol</b>	Unidade de molaridade
<b>MTT</b>	3 - [4,5 -Dimethyl - 2 - thiazolyl] - 2,5-diphenyl - 2H - tetrazolium bromide
<b>n°</b>	Número
<b>NAD (P) H</b>	Enzima quinona oxidoredutase
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>NBR</b>	Norma Brasileira
<b>NTC</b>	Núcleo de Tecnologia Celular

<b>OECD</b>	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> )
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PE</b>	Ficoeretrina (do inglês, <i>Phycoerythrin</i> )
<b>PE-Cy5</b>	Ficoeritrina e Cianina (do inglês, <i>Phycoerythrin and the Cyanine Dye Cy5</i> )
<b>PTA</b>	Produto de Terapia Avançada
<b>PUCPR</b>	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SCGE</b>	Eletroforese em gel de célula única (do inglês, <i>single cell gel electrophoresis</i> )
<b>SME</b>	Sistema Músculo-Esquelético
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TCU</b>	Tecido do Cordão Umbilical
<b>TRIS</b>	Tris (Hidroximetil) Aminometano
<b>U</b>	Unidade
<b>V</b>	Volt

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	JUSTIFICATIVA.....	23
3.	ESTADO DA ARTE.....	24
3.1	LESÕES DA CARTILAGEM ARTICULAR.....	24
3.2	MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA.....	26
3.3	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL.....	28
3.4	BIOCOMPATIBILIDADE: NORMATIVAS E TESTES.....	30
3.4.1	NORMAS VIGENTES.....	31
3.4.2	TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	33
3.4.2.1	Testes de Citotoxicidade.....	33
3.4.2.1.1	<i>Ensaio Vermelho Neutro</i> .....	34
3.4.2.1.2	<i>Ensaio MTT</i> .....	35
3.4.2.1.3	<i>Ensaio de Viabilidade e Apoptose</i> .....	37
3.4.2.2	Testes de Genotoxicidade.....	38
3.4.2.2.1	<i>Ensaio Cometa</i> .....	39
3.4.2.2.2	<i>Teste de Micronúcleo</i> .....	40
3.4.2.2.3	<i>Análise Cromossômica por Bandeamento GTG</i> .....	42
4.	OBJETIVOS.....	42
4.1	OBJETIVO GERAL.....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
5.	METODOLOGIA.....	43
5.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	43
5.2	CARACTERÍSTICA DAS AMOSTRAS.....	43
5.3	COLETA, ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	45
5.4	MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA.....	46
5.4.1	COLETA E DESCELULARIZAÇÃO.....	46
5.4.2	RECELULARIZAÇÃO.....	46
5.5	CELULARIZAÇÃO DA MEMBRANA COMERCIAL.....	47
5.6	COLETA E ISOLAMENTO DO TECIDO CARTILAGINOSO.....	48
5.7	LINHAGEM CELULAR HeLa.....	49

<b>5.8</b>	<b>TESTES DE BIOCMPATIBILIDADE .....</b>	<b>49</b>
<b>5.8.1</b>	<b>TESTES DE CITOTOXICIDADE .....</b>	<b>51</b>
<b>5.8.1.1</b>	<i>Ensaio Vermelho Neutro .....</i>	<b>51</b>
<b>5.8.1.2</b>	<i>Ensaio MTT .....</i>	<b>51</b>
<b>5.8.1.3</b>	<i>Ensaio de Viabilidade e Apoptose .....</i>	<b>52</b>
<b>5.8.2</b>	<b>TESTES DE GENOTOXICIDADE .....</b>	<b>52</b>
<b>5.8.2.1</b>	<i>Ensaio Cometa .....</i>	<b>52</b>
<b>5.8.2.2</b>	<i>Teste de Micronúcleo .....</i>	<b>53</b>
<b>5.8.2.3</b>	<i>Análise Cromossômica por Bandeamento GTG .....</i>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>6.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS .....</b>	<b>56</b>
<b>6.1.1</b>	<b>CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....</b>	<b>56</b>
<b>6.1.2</b>	<b>CONDRÓCITOS .....</b>	<b>58</b>
<b>6.1.3</b>	<b>LINHAGEM HeLa .....</b>	<b>59</b>
<b>6.2</b>	<b>Citotoxicidade: Ensaio Vermelho Neutro e MTT .....</b>	<b>61</b>
<b>6.3</b>	<b>Citotoxicidade: Viabilidade e Apoptose .....</b>	<b>68</b>
<b>6.4</b>	<b>Genotoxicidade: Ensaio Cometa .....</b>	<b>69</b>
<b>6.5</b>	<b>Genotoxicidade: Teste de Micronúcleo .....</b>	<b>71</b>
<b>6.6</b>	<b>Genotoxicidade: Análise Cromossômica por Bandeamento GTG .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>94</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais são alternativas promissoras na construção de produtos destinados ao uso humano, apresentando biocompatibilidade e estruturas porosas que permitem a fixação e proliferação celular (ABAZARI *et al.*, 2020). Alguns desses produtos são destinados ao tratamento de lesões, tais como os que utilizam membranas comerciais de origem industrial, entretanto, o valor financeiro desses procedimentos tende a ser elevado (MURPHY *et al.*, 2019). Tais membranas auxiliam o ambiente celular, podendo ser substituídas por tecidos humanos de fácil obtenção e de menor custo, como a Membrana Amniótica Humana (MAH), que apresenta propriedades semelhantes às membranas comerciais, tais como: permeabilidade, estabilidade, flexibilidade, plasticidade e resistência (SILINI *et al.*, 2013; CHOPRA & THOMAS, 2013; GUPTA *et al.*, 2014; ALVES & SANT'ANNA, 2016).

A MAH representa uma matriz colágena que permite a proliferação celular após processos de descelularização, fornecendo um ambiente para a liberação de fatores celulares que auxiliam no processo reparativo (ALVES & SANT'ANNA, 2016). A recelularização dessa membrana com as células-tronco mesenquimais (CTM), que podem ser obtidas do tecido do cordão umbilical (TCU), tem o potencial de auxiliar no reparo de tecidos acometidos por lesões, formando um produto alternativo aos métodos convencionais utilizados na medicina (GOBBI *et al.*, 2011; ALVES & SANT'ANNA, 2016; KARAMI *et al.*, 2019).

Esse produto se enquadra nos critérios estabelecidos para um Produto de Terapia Avançada (PTA) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo a validação da eficácia, segurança e qualidade considerados requisitos para que o seu uso seja aprovado no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A presença de biocompatibilidade é considerada como uma parte desse processo, sendo fundamental a

realização de testes capazes de avaliar diferentes níveis de toxicidade (ABNT, 2013).

As normativas presentes na ISO 10993:2009 elencam técnicas *in vitro* capazes de avaliar se um produto biológico desencadeia efeitos citotóxicos ou genotóxicos quando implantados *in vivo*, recomendando protocolos específicos para cada ensaio (ISO, 2009a; ISO, 2009b; ABNT, 2013). Entre o conjunto de ensaios citotóxicos e genotóxicos que podem ser utilizados para avaliar a biocompatibilidade de um PTA, respectivamente, destaca-se: os testes espectrofotométricos, que apresentam a finalidade de prever concentrações que inibem o crescimento celular; e os ensaios em material genético, que apresentam formas de mensurar danos ocasionados por um produto na região nuclear (ECVAM, 1990; OECD, 2010; SLOCZNSKA *et al.*, 2014; COLEMAN *et al.*, 2017).

As normativas e os testes de biocompatibilidade são, portanto, bases para determinar se um PTA, como o desenvolvido a partir da MAH recelularizada com CTM derivadas do TCU, apresentam requisitos de segurança e qualidade mínimos para ser utilizado em terapias clínicas, como por exemplo, na ortopedia (SORRELL & CAPLAN, 2010; PINTUS *et al.*, 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

A projeção de aumento de lesões associadas ao tecido cartilaginoso nas próximas décadas (FRONTERA, 2017) trouxe à tona a discussão sobre os benefícios e limitações proporcionados pelos tratamentos convencionais existentes, entre eles os que utilizam membranas comerciais como enxerto no local da lesão. Outras terapias, baseadas na aplicação de CTM na articulação lesionada, demonstram a tendência do extravasamento dessas células para outras regiões (WHITWORTH & BANKS, 2014). Diante desse cenário, o desenvolvimento de um PTA, composto de MAH recelularizada com CTM, com menor custo e capaz de reter as CTM transplantadas no local da lesão representa uma terapia alternativa e vantajosa para a reparação de tecidos (PINTUS *et al.*, 2018).

A MAH possui características que elevam seu potencial clínico como um biomaterial e ressaltam seus benefícios em comparação as membranas comerciais: é de fácil obtenção, apresenta baixo custo, possui propriedades mecânicas ideais, tem capacidade de induzir o processo de cicatrização, qualidades não compartilhadas por polímeros sintéticos. A soma deste biomaterial com as CTM tem se mostrado promissor em estudos *in vitro*, demonstrando potencial reparativo (ISLAM *et al.*, 2015; MOHAN *et al.*, 2017; RAMUTA & KREFT, 2018).

Por conta disso, a associação da MAH com CTM obtidas do TCU na forma de um PTA é considerado uma opção terapêutica, sendo fundamental atestar parâmetros de segurança e qualidade através da biocompatibilidade, assim como a ausência de toxicidade desse produto (SORRELL & CAPLAN, 2010). Para isso, o PTA precisa ser submetido à testes *in vitro*, de acordo com protocolos nacionais e internacionais vigentes, destinado a validação e registro, para que futuramente possa ser registrado e oferecido como tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

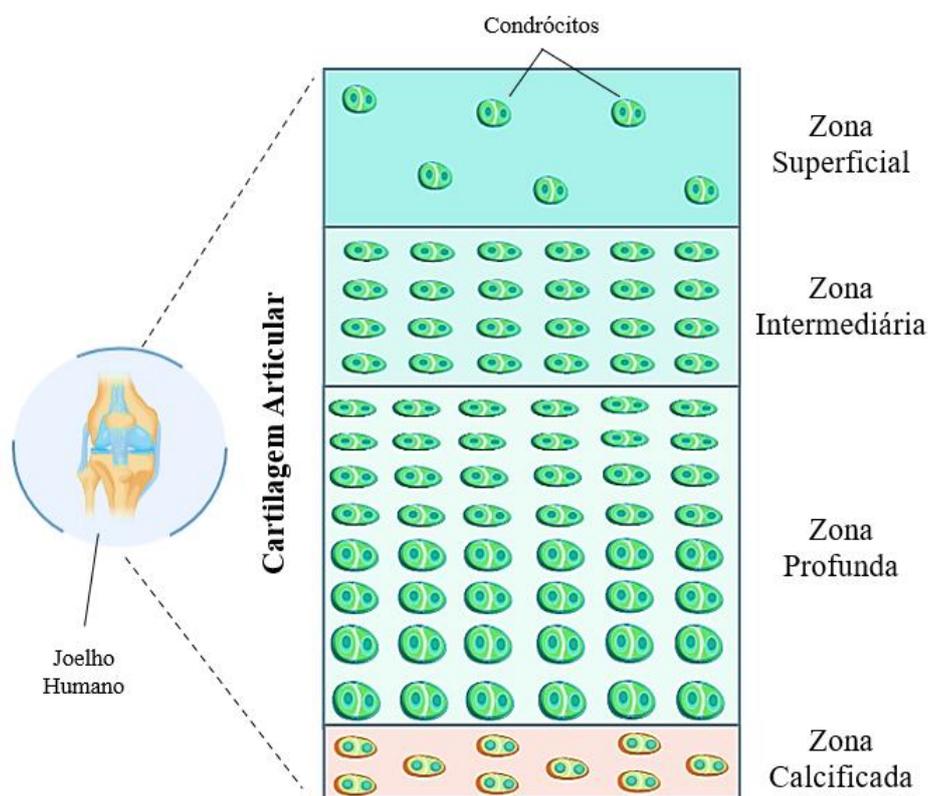
### **3. ESTADO DA ARTE**

#### **3.1 LESÕES DA CARTILAGEM ARTICULAR**

O sistema musculoesquelético (SME) reúne tecidos e estruturas responsáveis pela forma, proteção e movimentação do organismo, destacando-se a associação entre: músculo esquelético, osso, cartilagem articular, tendões e ligamentos (HOY *et al.*, 2014; BOROS & FREEMONT, 2017).

Estima-se que as lesões do SME afetam 1,3 bilhões de pessoas ao redor do mundo (SAFIRI *et al.*, 2020), apesar disso, a importância desse sistema tem sido subestimada, uma vez que raramente se mostra fatal, mas seus danos são considerados irreversíveis e associados ao avanço da idade. Por conta do aumento na expectativa de vida da população, avanços no desenvolvimento de mecanismos médicos voltados à reparação dos tecidos ligados ao SME são de extrema importância (FRONTERA, 2017).

As lesões condrais afetam o SME através do comprometimento da cartilagem articular, estrutura responsável pela absorção de impactos e minimização de atritos, sendo dividida em: zona superficial, com condrócitos arredondados e organizados de forma isolada ou em grupos isógenos; zona intermediária, caracterizada por condrócitos achatados em aglomerados horizontais; zona profunda, que apresenta condrócitos perpendiculares e uma linha basofílica, dita *tidemark*, que forma uma divisória entre a próxima camada; e zona calcificada, localizada acima do osso subcondral, apresentando cartilagem mineralizada e condrócitos em processo de degeneração (Fig. 1) (DA FONSECA, 2011; KUNZ *et al.*, 2015; LONGARAY, 2019).



**Figura 1:** Ilustração representativa das zonas presentes na cartilagem articular. Os condrócitos são distribuídos em diferentes configurações ao longo das quatro zonas presentes na cartilagem hialina articular: superficial, intermediária, profunda e calcificada.

Fonte: O autor (2021), baseado em Kunz *et al.* (2015) e Longaray (2019). Criado com BioRender.com.

O comprometimento da cartilagem articular acarreta no menor desempenho de suas funções, e com o tempo pode se tornar crônico, uma vez que este tecido é hipocelular, avascular, aneural e alinfático, o que diminui a possibilidade de processos regenerativos naturais, sendo importante o desenvolvimento de alternativas voltadas à reparação dessa região, tais como as proporcionadas pela terapia celular (AIGNER & STOVE, 2003; CHAHLA *et al.*, 2016). Por conta disso, é importante o desenvolvimento de alternativas terapêuticas voltadas as diferentes intensidades de lesões condrais, classificadas de acordo com a *International Cartilage Repair Society* (ICRS) (1998): normal (grau 0); quase normal, com amolecimento da cartilagem (grau 1); anormal, com fissuras superficiais (grau 2); lesão grave, com fissuras profundas (grau 3); e lesão muito grave, com erosão óssea (grau 4).

### 3.2 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

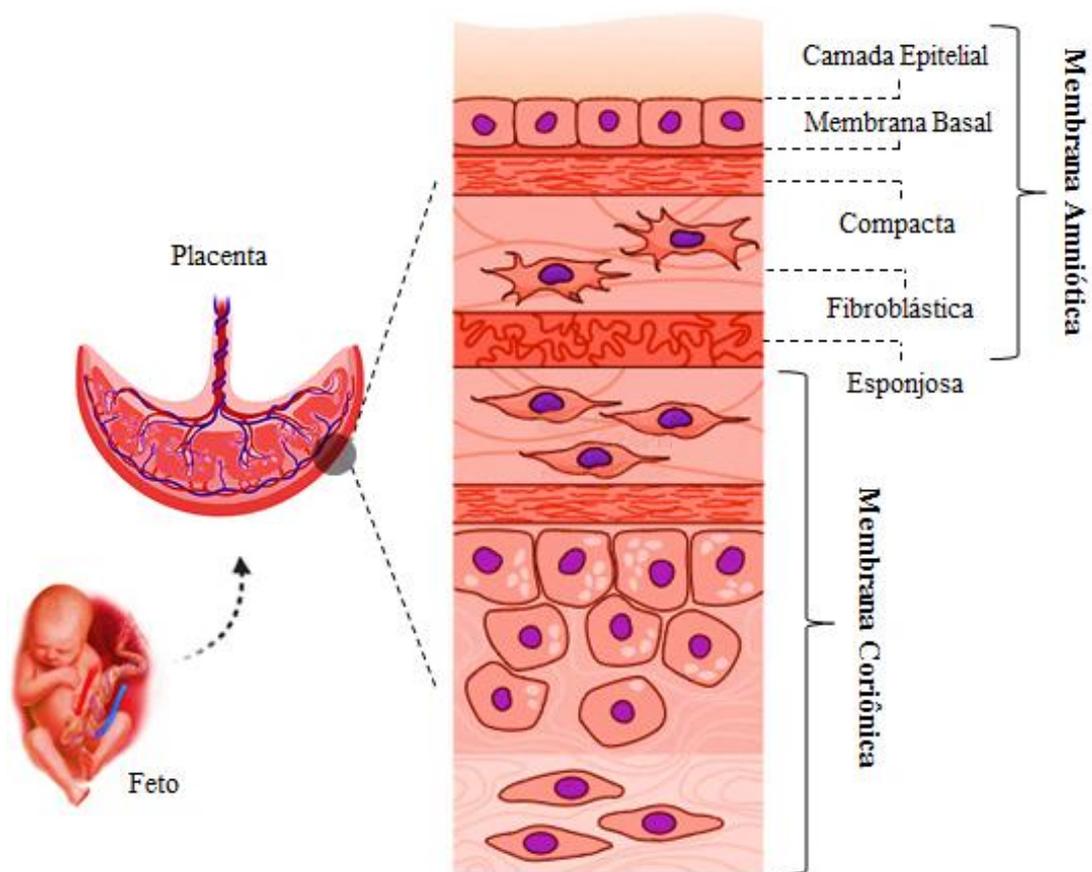
A MAH é um anexo embrionário associado ao córion na placenta de mamíferos, que pode ser dividida estruturalmente em camada epitelial, membrana basal e estroma avascular. A camada epitelial é formada por um epitélio simples de células cuboidais ou colunares, sendo estas dispostas sobre uma espessa membrana basal formada por laminina, fibronectina e colágeno dos tipos III, IV e V.

O estroma avascular é a estrutura mais basal da MAH, sendo subdividido em camada compacta, fibroblástica e esponjosa (ALVES & SANT'ANNA, 2016). A camada compacta é densa e praticamente desprovida de células, sendo encontrada adjacente a membrana basal, formando uma importante rede reticular de colágeno do tipo I e III, além de fibronectina (ALVES & SANT'ANNA, 2016). A camada fibroblástica é responsável pela secreção de colágeno, sendo uma região rica em CTM. Por último, a camada esponjosa é constituída por colágeno do tipo III, além de proteoglicanos e glicoproteínas (Fig. 2) (CHOPRA & THOMAS, 2013).

Além de propriedades específicas associadas a aspectos anti-inflamatórios e reparativos, a MAH apresenta propriedades mecânicas como permeabilidade, estabilidade, flexibilidade, plasticidade e resistência, o que a torna comercialmente atrativa, principalmente por apresenta baixa imunogenicidade, conferindo a membrana biocompatibilidade para ser utilizada em transplantes (CHOPRA & THOMAS, 2013; SILINI *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2014).

Estas propriedades estão presentes em um tecido extra-embrionário que é descartado após o parto como resíduo de saúde, e isso despertou um interesse especial dos pesquisadores, tornando a MAH uma importante fonte de tecido para novas terapias, entre elas as que visam o reparo de funções do corpo comprometidas por algum trauma (ALVES & SANT'ANNA, 2016). Diante disso, a MAH quando

associada a CTM apresentam resultados reparativos promissores, como mostrado por Kim *et al.* (2009) através da cicatrização de feridas em coelhos. Já Kakabadze *et al.* (2019) avaliaram a recelularização da membrana com CTM alogênicas, observando o aumento do processo reparativo de lesões acometidas por queimaduras.



**Figura 2:** Ilustração representativa das divisões estruturais da membrana amniótica humana. Associada ao feto na placenta e anexada a membrana coriônica, a membrana amniótica é subdividida em: camada epitelial, membrana basal e camadas compacta, fibroblástica e esponjosa.

Fonte: O autor (2021), com base em Alves & Sant'Anna (2016). Criado com BioRender.com.

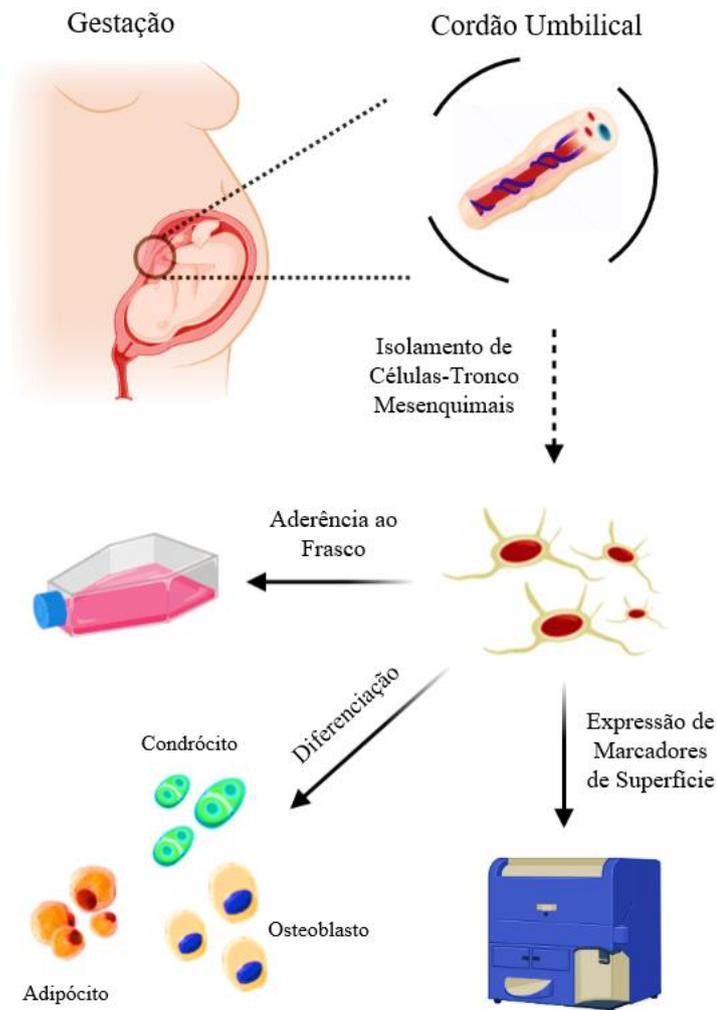
### 3.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL

O cordão umbilical é formado durante o desenvolvimento fetal (aproximadamente na quinta semana de gestação), representando uma conexão entre o feto e a mãe, permitindo a obtenção de nutrientes e trocas gasosas. A morfologia do cordão umbilical envolve uma haste flexível composta por duas artérias, uma veia e a geleia de Wharton – substância volumosa e de aspecto gorduroso, que envolve os vasos (YAMPOLSKY *et al.*, 2008; MALHEIROS *et al.*, 2016; KATHERIA, 2018).

O TCU é uma importante fonte de células para múltiplas pesquisas (SUSS *et al.*, 2015), uma vez que sua utilização apresenta vantagens em relação a outras fontes: praticidade na coleta e manuseio; ausência de riscos para a parturiente e o recém-nascido; facilidade ética frente ao uso em pesquisas experimentais; células com elevada plasticidade e capacidade de expansão (KÖGLER *et al.*, 2004; NAGAMURA-INOUE & HE, 2014).

As CTM ou células estromais mesenquimais são multipotentes, podem ser encontradas em outras fontes além do TCU, como a medula óssea (HORWITZ *et al.*, 1999) e a polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2002), e apresentam o potencial de se diferenciar em pelo menos três tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (HAN *et al.*, 2011; KEATING, 2012).

Além disso, para uma população de células ser considerada mesenquimal, a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) (DOMINICI *et al.*, 2006) estabelece critérios mínimos, tais como: aderência ao frasco quando mantidas em cultivo, potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, e expressão dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência do CD34, CD45, CD14, CD19 e HLA-DR, quantificados por citometria de fluxo (Fig. 3).



**Figura 3:** Ilustração representativa do isolamento de células-tronco mesenquimais (CTM) do tecido do cordão umbilical (TCU). Após a parto, a partir do TCU coletado, são isoladas as CTM. Estas, apresentam aderência ao frasco, diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos e expressam os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e não apresentam CD34, CD45, CD14, CD19 e HLA-DR, de acordo com os critérios definidos pela *International Society for Cellular Therapy*.

CTM: Células-tronco mesenquimais; TCU: Tecido do cordão umbilical; CD: Grupo de diferenciação celular; HLA-DR: Antígeno de histocompatibilidade leucocitária - DR

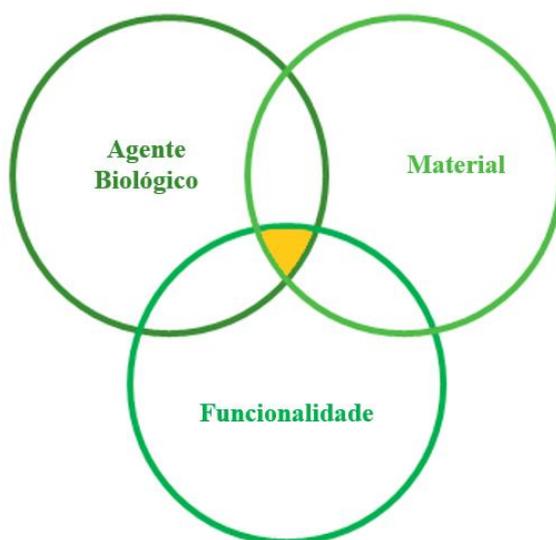
Fonte: O autor (2021), baseado em Kögler *et al.* (2004) e Dominici *et al.* (2006). Criado com BioRender.com.

As CTM apresentam uma variedade de propriedades biológicas e atividades imunomodulatórias, podendo migrar para locais acometidos por lesões teciduais e atuar na modulação da resposta inflamatória (UCCELLI *et al.* 2006; HAN *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2014). Por conta disso, essas células têm sido utilizadas no tratamento de lesões condrais através do reparo tecidual (ABBASI-MALATI *et al.*, 2018; VAN DE

WATER, 2020), onde destaca-se a associação com o transplante autólogo de condrócitos (MIGLIORINI *et al.*, 2020) e a utilização de *scaffolds* de colágeno destinados à recuperação da cartilagem do joelho (KUPCZIK *et al.*, 2021).

### 3.4 BIOCOMPATIBILIDADE: NORMATIVAS E TESTES

A capacidade de um material em interagir com um sistema biológico, sem provocar danos ou rejeição, é definido como biocompatibilidade, composta pela interseção existente entre o material e sua funcionalidade quando inserido em um agente biológico, sendo esta interação dependente da resposta celular e tecidual (Fig. 4) (WILLIAMS, 2008). Sabe-se que, desde o século XX, os dispositivos clinicamente implantáveis teriam melhor desempenho se o material que os constituem não fossem quimicamente reativos com estruturas biológicas, com isso, o conceito de biocompatibilidade passou a se referir a dispositivos com ausência de toxicidade, irritabilidade, imunogenicidade, não trombogênicos ou cancerígenos (KIRKPATRICK *et al.*, 1998; WILLIAMS, 2008).



**Figura 4:** Ilustração representativa da interseção que rege a biocompatibilidade. A biocompatibilidade representa a interseção entre um agente biológico (por exemplo, um paciente) com um material que desempenhará alguma funcionalidade quando aplicado em um local de lesão.

Fonte: O autor (2020), com base em Williams (2008).

Com o avanço das terapias associadas à medicina regenerativa, a biocompatibilidade se tornou um termo recorrente em estudos envolvendo íons de prata em enxertos ósseos (MARQUES *et al.*, 2017), nanopartículas magnéticas associadas a linhagens celulares para a prevenção de doenças sistêmicas (JIANG *et al.*, 2019), *scaffolds* a base de polímeros naturais destinados a engenharia de tecidos (AKILBEKOVA *et al.*, 2018; ASADI *et al.*, 2020) e membranas colágenas de origem xenogênica – doador de espécie diferente do receptor - destinadas à manutenção da integridade tecidual (POZZOLINI *et al.*, 2018).

A grande diversidade de materiais potencialmente biocompatíveis requer mecanismos capazes de investigar o efeito destes em contato com estruturas biológicas. Diante disso, a cultura celular *in vitro* é comumente utilizada, explorando a resposta das células quando expostas a condições específicas. Contudo, estes resultados não podem ser transpostos imediatamente para ensaios *in vivo*, sendo necessário testes capazes de realizar uma triagem seletiva de materiais potencialmente danosos a saúde (PETERS, 2013; PIRES *et al.*, 2016).

### 3.4.1 NORMAS VIGENTES

O Ministério da Saúde do Brasil, por meio da ANVISA dispõe sobre o registro de um PTA conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 338 de 20 de fevereiro de 2020. Esta Resolução estabelece requisitos de eficácia, segurança e qualidade para o registro, uso e comercialização no Brasil de um PTA, visto que o define e diferencia de outros medicamentos, principalmente quando ligado ao uso de células, conforme o capítulo I, seção III, artigo 4º, inciso XXII:

“Produto de terapia celular avançada: produto biológico constituído por células humanas ou seus derivados não quimicamente definidos, que possui a finalidade de obter propriedades terapêuticas, preventivas ou de diagnóstico, por meio de seu modo de ação principal de natureza metabólica, farmacológica e/ou imunológica, para uso autólogo ou alogênico em humanos, sendo que (a) tenha sido submetido a manipulação extensa; e/ou (b) desempenhe no receptor função distinta da desempenhada no doador”

O artigo 4º, incisos XVIII, XIX e XX definem os produtos de terapia celular avançada de classes I – submetidos a manipulação mínima – e classe II – submetido a manipulação extensa. Os produtos de classe II, devem apresentar segundo o capítulo V, artigo 23, um dossiê de qualidade, com informações a respeito da biocompatibilidade:

“Informações sobre suportes, matrizes e dispositivos utilizados, incluindo os testes realizados para avaliação de segurança, biocompatibilidade e durabilidade [...]”.

Referente à biocompatibilidade, a normativa internacional para avaliação biológica de dispositivos médicos, revisada pela ANVISA e aprovada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é representada pela NBR ISO 10993:2009 que especifica e descreve métodos para avaliar a resposta biológica de células *in vitro* em relação a diferentes níveis de toxicidade (ABNT, 2013). A terceira parte desta normativa dispõe de ensaios capazes de avaliar a toxicidade genética do material biológico testado, que deve abranger preferencialmente os três níveis de efeitos genotóxicos: efeitos sobre o ácido desoxirribonucleico (DNA), mutações gênicas e aberrações cromossômicas (ISO, 2009a). A quinta parte da normativa relaciona opções de testes capazes de predizer se o produto testado não acarreta efeitos citotóxicos quando implantado (ISO, 2009b).

Outras normas técnicas são adotadas como guias em conjunto a ABNT para a execução específica de cada teste de citotoxicidade, como é o caso do protocolo n° 17 da *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) para o teste de MTT e do documento n° 129 da *Organization for Economic Cooperation and*

*Development* (OECD) para o teste de vermelho neutro (ECVAM, 1990; OECD, 2010). Já para a genotoxicidade, o teste de micronúcleo e o ensaio de cometa seguem as diretrizes da OECD para testes *in vitro* utilizando células de mamíferos, sendo respectivamente, os guias n° 487, que confere autorização para ensaios a base de citocalasina B, e n° 489, que diz respeito a ensaios de eletroforese em gel (OECD, 2014; OECD, 2016).

### 3.4.2 TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE

Visando validar a biocompatibilidade de um material ou produto destinado ao uso individual ou coletivo, e levando em consideração às normativas vigentes aprovadas por órgãos reguladores, uma série de testes *in vitro* são descritos e utilizados na pesquisa. Alguns destes testes têm como princípio mensurar a morte celular, observando um efeito citotóxico (LEE *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2019). Quando os testes celulares demonstram que o efeito do material *in vitro* causou perda ou alterações de características do material genético, este dano é chamado de genotóxico e implica na suspensão do uso do material em pesquisas clínicas (MASSON, NASCIMENTO & LOMBELLO, 2014; PRZEKORA, 2019).

#### 3.4.2.1 Testes de Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade variam conforme o objetivo no qual são empregados. Alguns buscam avaliar o efeito de um produto farmacológico sobre a viabilidade celular e outros se voltam sobre o efeito na sinalização ou interação celular (FRESHNEY, 2005; NILES *et al.*, 2009). Na prática, estes testes são desenvolvidos devido à dificuldade de simular reações e respostas sistêmicas *in vivo*, buscando analisar a nível

celular estas interações, permitindo uma triagem de produtos de forma econômica e reproduzível (GOLSTEIN & KROEMER, 2007; COLEMAN *et al.*, 2017).

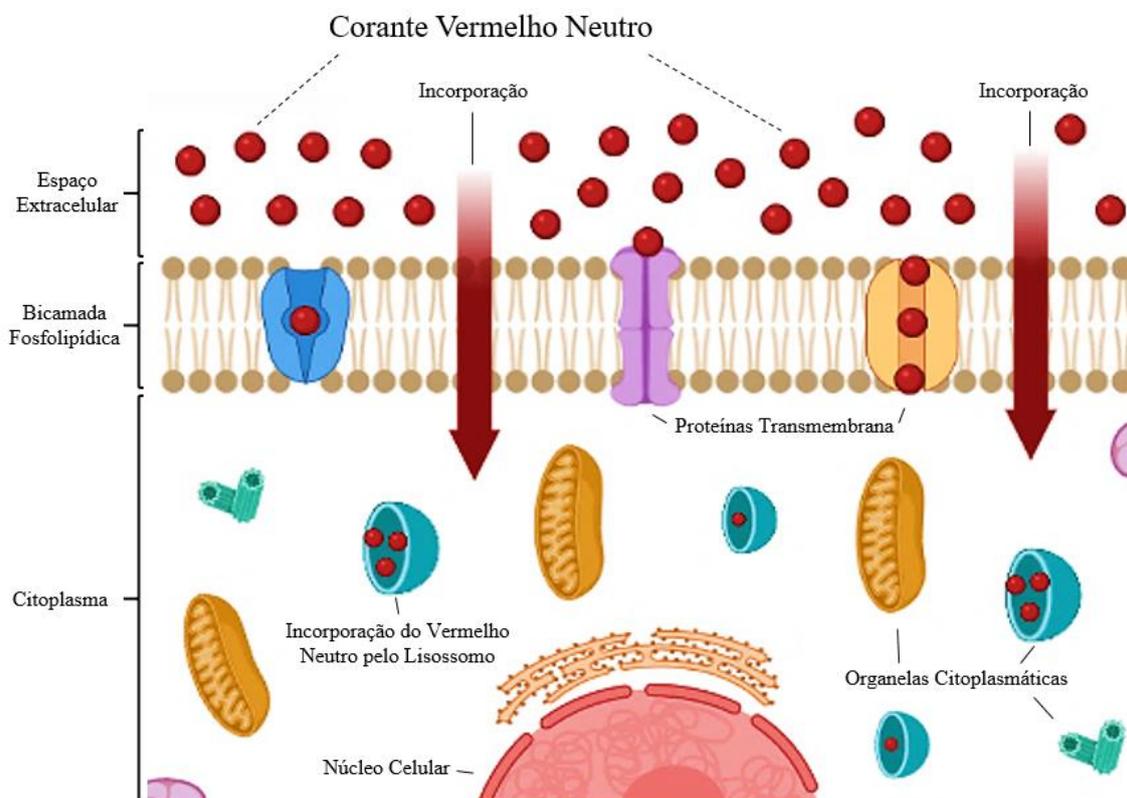
Estes testes têm como base as diferenças físico-químicas entre as células viáveis e as que se apresentam em apoptose ou necrose. As células viáveis apresentam uma distribuição distinta entre os fosfolipídios presentes na membrana plasmática interna e externa, que mantém sua estrutura íntegra. Em contrapartida, células em apoptose ou necrose apresentam alterações morfológicas características, ligadas ao dano da membrana celular e exposição do citoplasma, alterando a permeabilidade e permitindo a entrada do corante utilizado em grande parte dos testes (KERR *et al.*, 1972; GOLSTEIN & KROEMER, 2007; HU *et al.*, 2015).

#### 3.4.2.1.1 *Ensaio Vermelho Neutro*

O ensaio de viabilidade celular por meio da captação do corante vermelho neutro, que interage com a via lisossômica de células viáveis em cultura celular, é capaz de prever as concentrações de uma substância que inibem 20, 50 e 80% do crescimento celular, através da análise dos valores de absorvância (OECD, 2010). Este ensaio vem sendo utilizado para determinar a viabilidade de condrócitos expostos a polímeros biodegradáveis voltados a reparação osteocondral (AOKI & SAITO, 2020; LAMPONI *et al.*, 2020), e de diversas linhagens celulares em contato com hidrogel bioadesivo (CAPELLA *et al.*, 2019).

Segundo a OECD (2010), a utilização do corante vermelho neutro para determinar a viabilidade celular forma um método simples, preciso e reproduzível, sendo útil na triagem de produtos e medicamentos capazes de causar algum efeito citotóxico sobre as células. Seu princípio envolve a permeabilidade das células viáveis ao corante, que quando em contato com o citoplasma, passa a ser incorporado pelas organelas

lisossômicas, sendo liberado com a adição de solventes ácidos, permitindo quantificar o grau de incorporação (FOTOKIS & TIMBRELL, 2006; REPETTO *et al.*, 2008) (Fig. 5).



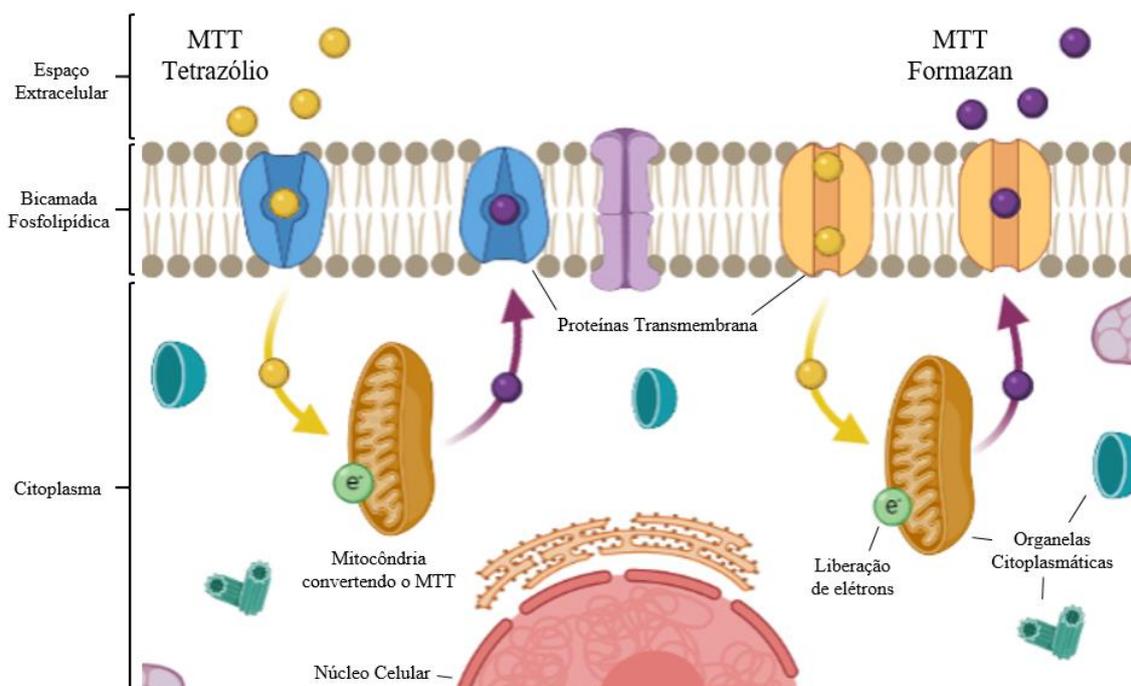
**Figura 5:** Ilustração representativa da incorporação do corante vermelho neutro. As células viáveis - que possuem a bicamada fosfolipídica íntegra - incorporam o corante vermelho neutro presente no espaço extracelular por meio das proteínas transmembranas, o encaminhando para o citoplasma celular. Nessa região, esse corante é incorporado por um grupo de organelas, chamadas lisossomos.

Fonte: O autor (2021), com base na OECD (2010). Criado com BioRender.com.

#### 3.4.2.1.2 *Ensaio MTT*

O ensaio de viabilidade celular através da captação do corante MTT (3 - [4,5 - dimetil-2-tiazolil] - 2,5-difenil - 2H - tetrazólio) se baseia na redução deste em cristais de formazan através da interação com desidrogenases mitocondriais de células viáveis (Fig. 6), sendo capaz de prever as concentrações de uma substância que inibem 20, 50 e 80% do crescimento celular, através da análise dos valores de absorvância (ECVAM, 1990). Este ensaio vem sendo utilizado para determinar a viabilidade de CTM geradoras

de exossomos destinados a angiogênese de células endoteliais, e em contato com *scaffolds* de queratina e colágeno (ARSLAN *et al.*, 2017; TAGHDIRI NOOSHABADI *et al.*, 2019), além de lipossomas utilizados como carreadores de medicamentos contra o câncer (LEWICKI *et al.*, 2017).



**Figura 6:** Ilustração representativa da incorporação do corante MTT. As células viáveis - que possuem a bicamada fosfolipídica íntegra - incorporam o corante MTT tetrazólio por meio das proteínas transmembranas, em seguida, esse corante passa a interagir com organelas mitocondriais presentes no citoplasma, ocorrendo a liberação de elétrons e a conversão em MTT formazan, que passa a ser liberado pelas células no espaço extracelular.

MTT: 3 - [4,5 - dimetil-2-tiazolil] - 2,5 - difenil - 2H - tetrazólio.

Fonte: O autor (2021), com base no ECVAM (1990). Criado com BioRender.com.

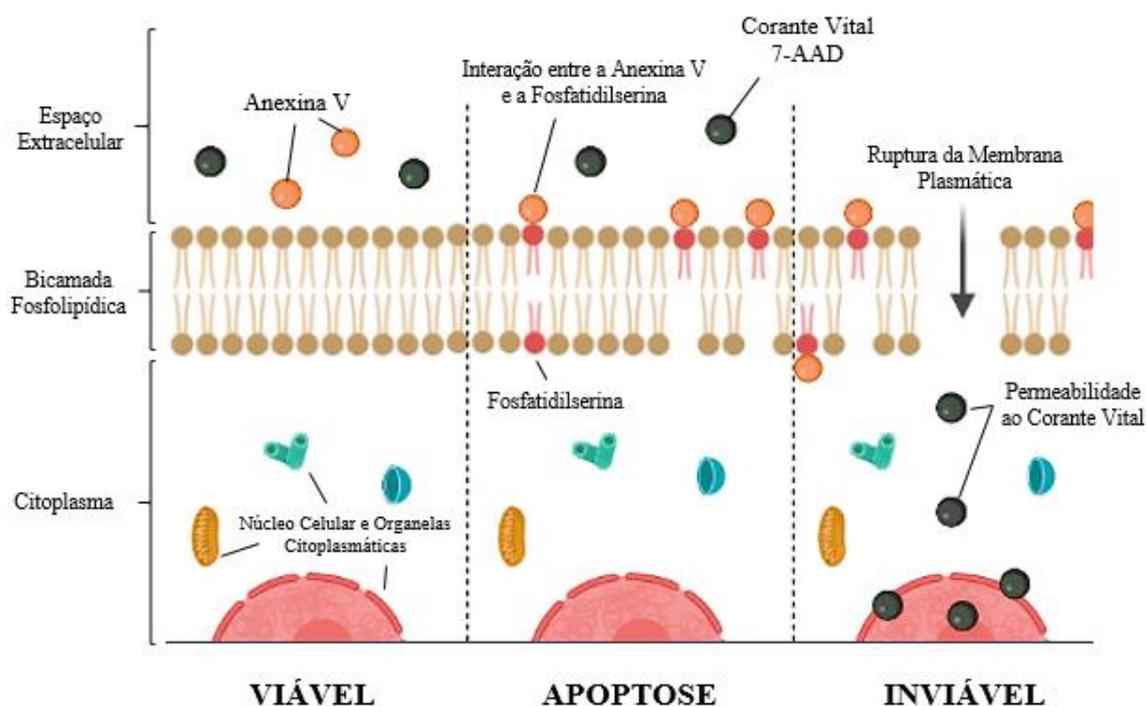
Segundo o ECVAM (1990), o ensaio MTT foi desenvolvido para avaliar a proliferação celular em resposta a diversos fatores de crescimento, citocinas e agentes tóxicos, seu princípio de ação é muito utilizado na quantificação da viabilidade. Isto se deve a conversão do MTT tetrazólio - sal de coloração amarela e solúvel em água - em MTT formazan - sal de coloração púrpura, insolúvel em água - pelas células viáveis, que por possuírem metabolismo ativo, são capazes de doar elétrons pela ação da enzima NAD (P) H oxidoreductase presente nas mitocôndrias, causando a mudança de coloração (VAN MEERLOO *et al.*, 2011; GLORIEUX & CALDERON, 2019).

### 3.4.2.1.3 *Ensaio de Viabilidade e Apoptose*

Diferentes técnicas quantificam a morte celular com base na diversidade de estados estruturais, fisiológicos e genéticos das células, dentre elas a citometria de fluxo, que utiliza marcadores ou corantes fluorescentes (CRONIN & WILKINSON, 2010). A citometria de fluxo é um método multiparamétrico, realizada em um citômetro, que adquire e analisa células coradas com corantes fluorescentes ou marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos, através da excitação destes por fontes de radiação laser emitidas em comprimentos de onda específicos (CARVALHO *et al.*, 2010).

Através da citometria de fluxo, vários marcadores/corantes indicam a viabilidade celular, como por exemplo a anexina V e o corante vital 7-AAD (Fig. 7) (NIGJEN *et al.*, 2018). Anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos que na presença de íons de cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina. A presença da fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre nas células em apoptose (morte celular programada) (ZIMMERMANN & MEYER, 2011).

O 7-AAD (*7-Aminoactinomycin D*) identifica células mortas, cuja permeabilidade da membrana permite a coloração fluorescente, enquanto as células vivas apresentam a membrana intacta, e não absorvem o corante. Dessa forma, a anexina V em combinação com o 7-AAD permite determinar as células viáveis (anexina V<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>) as que estão em estado apoptótico inicial (anexina V<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>) ou apoptótico tardio e necrótico (anexina V<sup>+</sup> / 7-AAD<sup>+</sup>) (ZIMMERMANN & MEYER, 2011; COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017).



**Figura 7:** Ilustração representativa da ação da anexina V/7-AAD. As células viáveis - que possuem a bicamada fosfolipídica íntegra - não interagem com a anexina V e não apresentam permeabilidade ao corante vital 7-AAD. A fosfatidilserina na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre na apoptose celular, que permite a interação entre essa proteína com a anexina V. Já quando a célula está inviável (morta), o corante vital 7-AAD é incorporado, devido a ruptura da membrana plasmática e o contato com o espaço extracelular.

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D

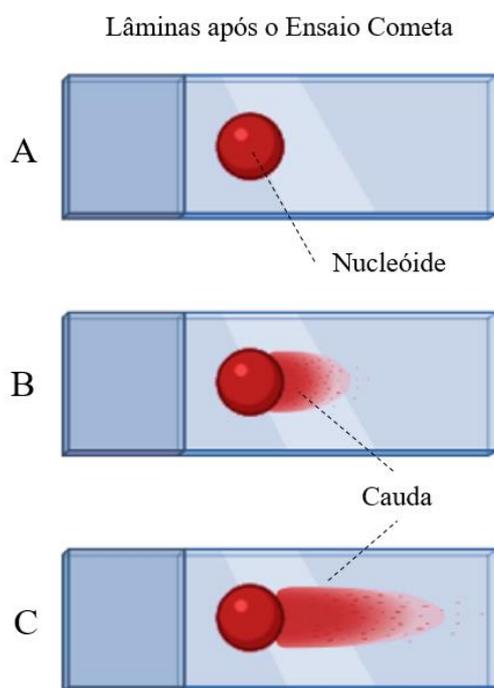
Fonte: O autor (2021), com base em Zimmermann & Meyer (2011) e Nigjen *et al.* (2018). Criado com BioRender.com.

### 3.4.2.2 Testes de Genotoxicidade

Os testes de genotoxicidade buscam identificar através de protocolos validados, características em um composto capaz de afetar o DNA ou proteínas responsáveis por processos a ele ligados, como as topoisomerases, interferindo em sua estrutura ou função (SLOCZNSKA *et al.*, 2014). Quando estas alterações são transmitidas para outras células, se tem uma mutação capaz de acelerar o surgimento de doenças, principalmente quando ocasionadas por agentes genotóxicos (ATIENZAR & JHA, 2006; PRZEKORA, 2019).

### 3.4.2.2.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa ou SCGE (do inglês, *single cell gel electrophoresis*) foi desenvolvido por Ostling & Johanson (1984) e aperfeiçoado por Singh *et al.* (1988) como um teste de eletroforese de célula única capaz de detectar danos no DNA. O nome relacionado ao cometa se deve ao DNA danificado, que se afasta da peça central com o material intacto, dita nucleóide, formando um rastro na forma de cauda - de tamanho e intensidade de fluorescência proporcionais a quebra do DNA (Fig. 8) (BURLINSON *et al.*, 2012).



**Figura 8:** Ilustração representativa do mecanismo que envolve o ensaio do cometa. Após a realização do ensaio cometa em eletroforese, os nucleóides que não passaram por eventos genotóxicos se apresentam intactos (A). Quando o evento genotóxico é de grau leve, a cauda formada na matriz de agarose é proporcional em tamanho do nucleóide (B). Quando existe um elevado grau de quebra do DNA, a cauda se forma com maior intensidade (C).

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Fonte: O autor (2021), com base em Burlinson *et al.* (2012). Criado com BioRender.com.

Este ensaio é vantajoso segundo Lopes *et al.* (2018) por possuir grande sensibilidade e utilizar uma quantidade menor de células ( $< 1 \times 10^4$ ) que sofrerão lise quando submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino, bastando aplicar o

material em uma lâmina contendo gel de agarose. A formação da cauda ocorre após esse processo, que é responsável pelo relaxamento da estrutura do DNA danificada, que normalmente está fortemente compacta no nucleóide, este passará então a migrar em direção ao anodo da eletroforese (TICE *et al.*, 2000; BRIANEZI *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2018).

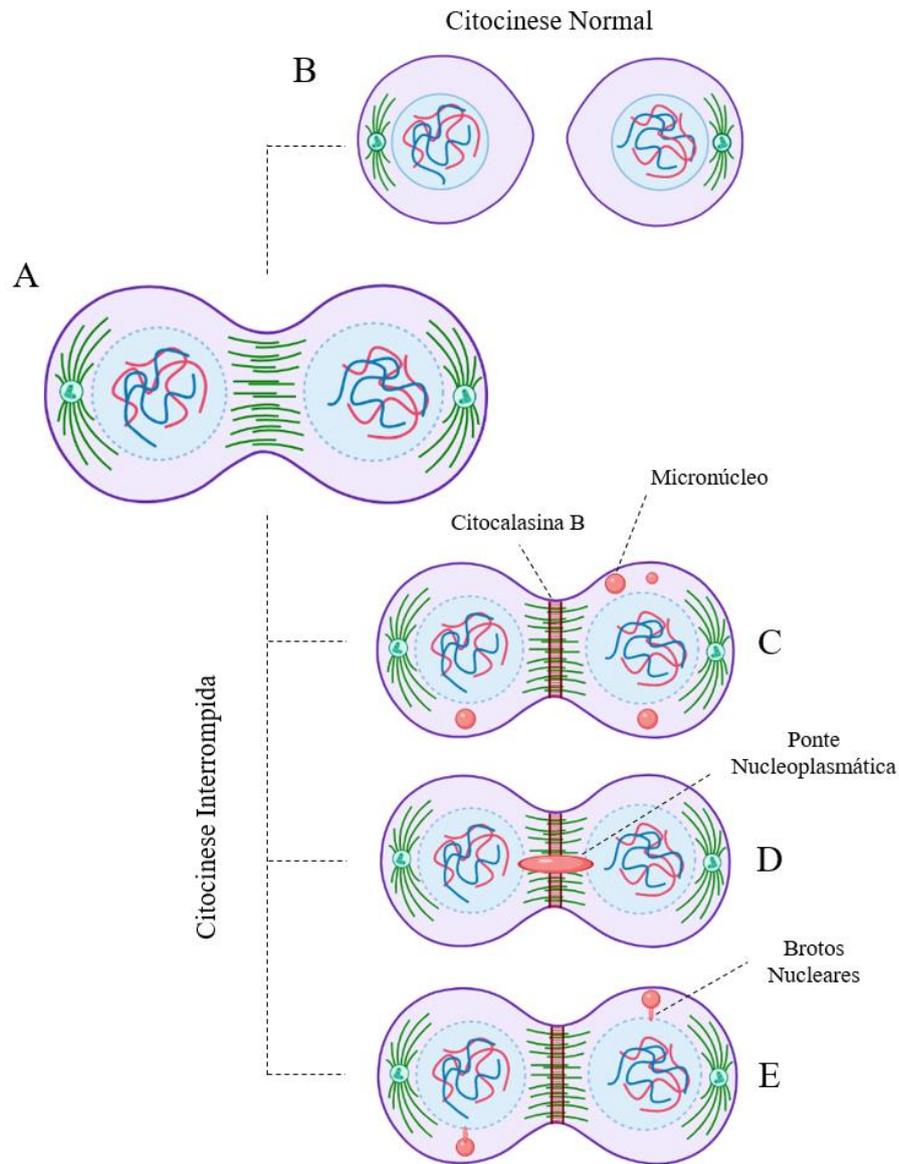
#### 3.4.2.2.2 *Teste de Micronúcleo*

O teste citogenético do micronúcleo permite identificar aumentos na frequência de mutação em células expostas a agentes genotóxicos, detectando quebras e perdas do material genético, sendo considerado um padrão ouro para este fim (FENECH & MORLEY, 1985; RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Sendo descrito pela primeira vez por Schmid (1976), este teste é capaz de identificar os micronúcleos no citoplasma de células interfásicas, podendo se originar de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros incapazes de migrar para os polos durante a formação do fuso mitótico (efeito aneugênico) (OECD, 2016).

Com isso, o teste detecta células que foram expostas a substâncias com atividades clastogênicas e aneugênicas através da localização próxima ao núcleo de uma porção de cromatina de forma arredondada. Este micronúcleo se forma devido ao cultivo da célula avaliada com a citocalasina B, responsável por se ligar a actina presente nos microfilamentos do citoesqueleto durante a mitose, levando ao bloqueio da citocinese e consequentemente na formação de uma única célula contendo o conteúdo de duas células-filhas (ANDRADE *et al.*, 2005; OECD, 2016).

O teste de micronúcleo permite também a identificação de outras modificações nucleares importantes, tais como: pontes nucleoplasmáticas, que representam uma importante ferramenta na identificação de efeitos genotóxicos, sendo observado uma conexão que interliga dois núcleos; e brotos nucleares, sendo identificados por um

fragmento que apresenta uma conexão nucleoplasmática com um núcleo (Fig. 9) (PALAZZO *et al.*, 2011).



**Figura 9:** Ilustração representativa da formação das alterações durante o teste de micronúcleo. Durante o processo de citocinese (A) a célula mãe se dividir em duas células filhas (B). No teste de micronúcleo, a ação da citocalasina B interrompe a citocinese, permitindo a identificação de alterações nucleares em células binucleadas, tais como: micronúcleos (C), pontes nucleoplasmáticas (D) e brotos nucleares (E).

Fonte: O autor (2021), com base em Fenech & Morley (1985) e Rodríguez *et al.* (2019). Criado com BioRender.com.

### 3.4.2.2.3 *Análise Cromossômica por Bandeamento GTG*

A análise de cromossomos durante a metáfase compreende uma das bases de estudo da citogenética clássica, sendo que a organização desses cromossomos em cariogramas, por meio da captura de imagens microscópicas, permitindo a construção do cariótipo (CHETAN *et al.*, 2005). Unindo esses conceitos, a técnica de bandeamento cromossômico GTG (do inglês, *G-bands by Trypsin using Giemsa*) possibilita a identificação de múltiplas alterações estruturais e numéricas (LUPSKI, 2015).

Entre as alterações estruturais, destacam-se: translocações, que é a incorporação de uma porção cromossômica não homóloga; inversões, separação e união invertida de partes homólogas de um cromossomo; deleções, onde ocorre a perda de material genético; e duplicações, onde o material genético se repete. Já entre as alterações numéricas, destacam-se: euploidias, que são alterações de todo o conjunto de cromossomos de uma espécie; e aneuploidias, que são alterações no número de um ou mais cromossomos específicos (MATEUCA *et al.*, 2006; HOWE; UMRIGAR & TSIEN, 2014; KIM *et al.*, 2015).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a biocompatibilidade de um produto de terapia avançada - membrana amniótica recelularizada com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical humano - em co-cultivo com condrócitos.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a citotoxicidade do PTA proposto;
- Avaliar o potencial genotóxico do PTA proposto.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo foi conduzido no Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (NTC/PUCPR). O projeto obteve financiamento pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 443916/2018-7 e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - CAAE: 83139918.1.0000.0020.

Participaram deste estudo os doadores de tecido cartilaginoso, MAH e TCU que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Estes foram informados sobre o projeto, os objetivos da linha de pesquisa e sobre como seria a sua participação.

### **5.2 CARACTERÍSTICA DAS AMOSTRAS**

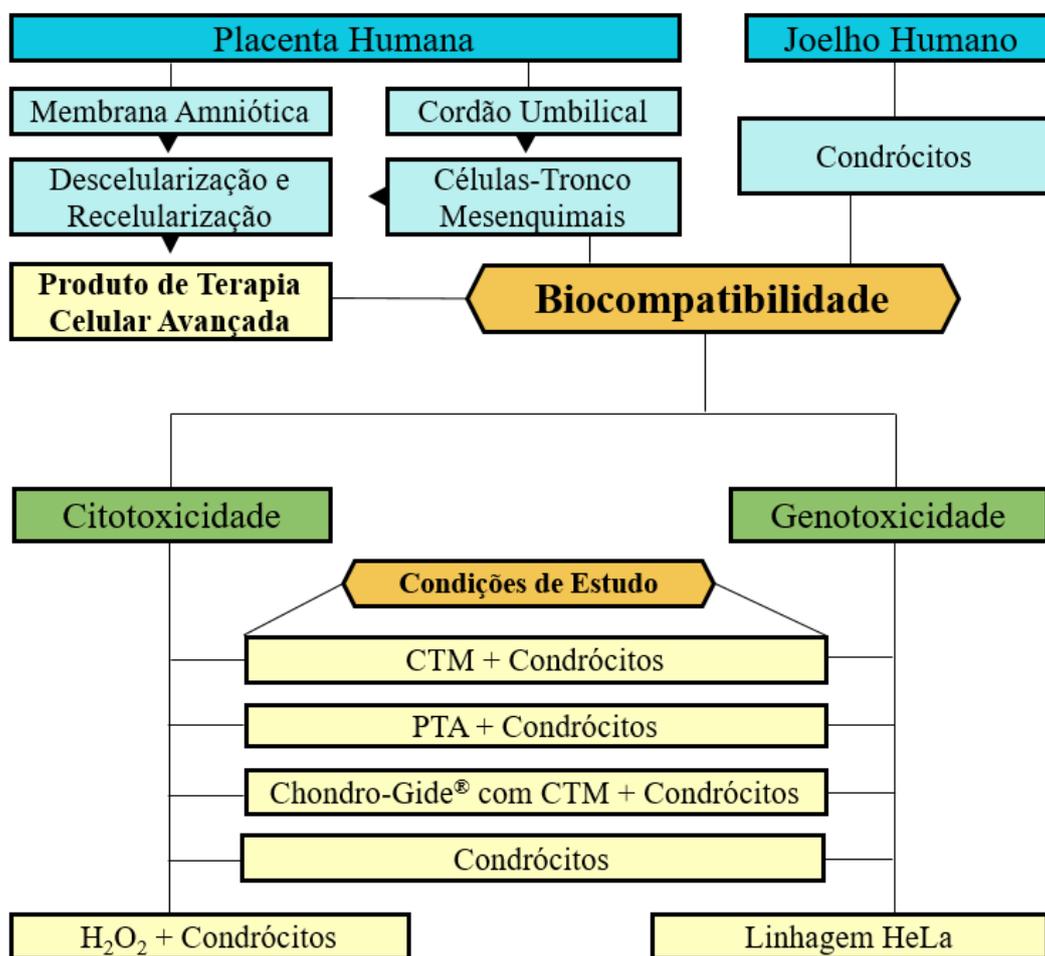
Para a condução deste estudo foram utilizadas três amostras de tecido do cordão umbilical e uma de placenta, destinados ao isolamento das CTM e obtenção da MAH, respectivamente. O PTA foi constituído por MAH recelularizada com CTM obtidas do TCU humano. Os condrócitos utilizados para o co-cultivo foram obtidos de um único doador, a partir de fragmentos de cartilagem retirados durante um procedimento cirúrgico.

As condições de estudo foram formadas por: condrócitos co-cultivados com as CTM (C/CTM), condrócitos co-cultivados com o PTA (C/PTA), condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) celularizada com CTM (C/MC).

Para a comparação dos dados foram utilizados os seguintes controles: a) Positivo: para os danos citotóxicos: condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio

(C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na concentração de 80 μM/μL - responsável por provocar a lise de 50% dos condrócitos em cultivo (PANG *et al.*, 2021); e para os danos genotóxicos: a linhagem celular imortal *HeLa*, células cancerígenas obtidas da americana *Henrietta Lacks*, que apresentam instabilidade genética, com elevadas alterações genotóxicas (LANDRY *et al.*, 2013); b) Negativo: condrócitos (C).

Os testes propostos no estudo foram realizados em triplicatas biológicas para as condições CTM e PTA. Os co-cultivos foram realizados em réplicas técnicas para todas as condições de estudo (Fig. 10).



**Figura 10:** Desenho do estudo. O PTA, representado pela MAH recelularizada com CTM do TCU foi avaliado quanto à sua biocompatibilidade, através de testes de citotoxicidade e genotoxicidade, conforme as condições de estudo.

CTM: Células-tronco mesenquimais; PTA: Produto de Terapia Celular Avançada; HeLa: Linhagem celular cancerígena; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio.

Fonte: O autor (2021).

### **5.3 COLETA, ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

O cordão umbilical humano foi coletado imediatamente após o parto e transportado para o NTC, sendo realizada a antissepsia do seguimento do cordão do sentido distal para o proximal com álcool 70% e clorexidina alcoólica e o esgotamento do sangue. O cordão foi seccionado na região mais próxima à placenta e acondicionado em um frasco estéril contendo 250 mL de Meio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM, do inglês *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) suplementado com 1% de antibiótico (100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina).

O isolamento das CTM ocorreu por meio da fragmentação do TCU por dissociação mecânica do tecido com o auxílio de um bisturi. Em seguida, os fragmentos de tecido foram dissociados pela enzima colagenase tipo II (Gibco<sup>®</sup>, New York, USA) a 0,1% e mantidos em agitação constante em estufa aquecida a 37°C, por 16 h. O material foi então centrifugado para obtenção do concentrado celular, que foi ressuspensionado em meio de cultivo IMDM (Gibco<sup>®</sup>, New York, USA), semeadas em frascos com área de 75 cm<sup>2</sup> com IMDM suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF, Gibco<sup>®</sup>, New York, USA) e 1% de antibiótico. As células foram mantidas em incubadora aquecida a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado.

Na terceira passagem, as células foram caracterizadas pela marcação com os anticorpos: anti-CD14, anti-CD19, anti-CD29, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-HLA-DR, conjugados com os fluorocromos: FITC, PE, PE-Cy5 e APC. A viabilidade celular foi realizada através dos marcadores anexina V e 7-AAD. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur, San Jose, CA, USA) e analisadas no *software* FlowJo v8.0.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

## 5.4 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

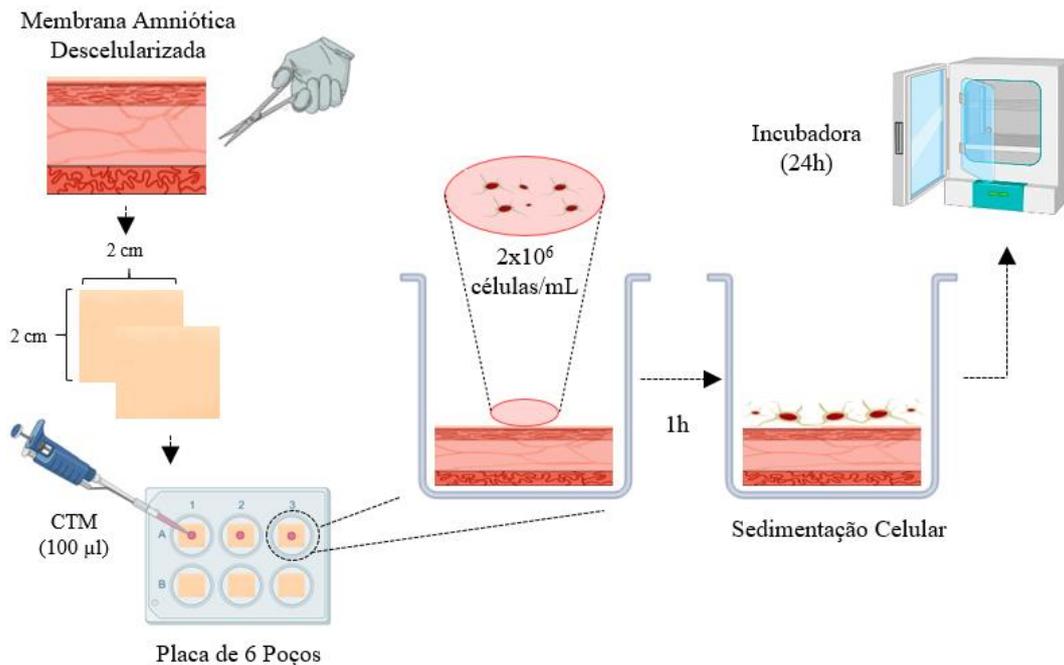
### 5.4.1 COLETA E DESCELULARIZAÇÃO

Após a separação do cordão umbilical, a placenta foi acondicionada em frasco de coleta contendo cloreto de sódio (0,9%), 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de fluconazol. Em seguida, o material foi transportado e processado no NTC.

Inicialmente ocorreu a separação da MAH da membrana coriônica em cabine de segurança biológica. Em seguida, foi realizado o processo de descelularização com detergente enzimático e álcool, seguindo o protocolo estabelecido e validado por Schaidt *et al.* (2019). Após este processo, a MAH descelularizada foi liofilizada e seccionada com o auxílio de um bisturi em fragmentos de 2 cm<sup>2</sup>. Os fragmentos foram posicionados em campos cirúrgicos de igual dimensão e embalados em papel grau cirúrgico para a esterilização por óxido de etileno. Já estéreis, o material foi destinado a recelularização com as CTM provenientes do TCU para posterior co-cultivo com condrócitos.

### 5.4.2 RECELULARIZAÇÃO

As amostras de MAH descelularizada seccionadas e esterilizadas foram inseridas em placas de 6 poços (Falcon®, New Jersey, USA) com o auxílio de duas pinças cirúrgicas. Para a recelularização, foi adicionado na região central da membrana 100 µL de meio IMDM com 1% de antibiótico, contendo CTM na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Após 1 h de sedimentação das células na superfície da membrana, foi adicionado cuidadosamente 2 mL de meio IMDM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico em cada poço. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora aquecida a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado por 24 h (Fig. 11).



**Figura 11:** Ilustração representativa da secção da membrana amniótica humana descelularizada. Os fragmentos de 2 cm<sup>2</sup> da membrana foram inseridos em placa de 6 poços para a recelularização com CTM ( $2 \times 10^6$  células/mL). Após 1 hora de sedimentação celular as placas são incubadas por 24 horas.

CTM: Células-Tronco Mesenquimais

Fonte: O autor (2021). Criado com BioRender.com.

## 5.5 CELULARIZAÇÃO DA MEMBRANA COMERCIAL

A membrana comercial Chondro-Gide<sup>®</sup> foi seccionada com o auxílio de um bisturi em fragmentos de 2 cm<sup>2</sup>, que foram colocados em campos cirúrgicos de igual dimensão e embalados em papel grau cirúrgico para a esterilização por óxido de etileno. Para a celularização, a face com microvilosidades da membrana foi posicionada para cima. Foi adicionado na região central 100 µL de meio IMDM com 1% de antibiótico, contendo CTM na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Após 1 h de sedimentação destas células na superfície da membrana, 2 mL de meio IMDM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico foi acrescentado cuidadosamente em cada poço. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora aquecida a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> e 95% de ar umidificado por 24 h.

## 5.6 COLETA E ISOLAMENTO DO TECIDO CARTILAGINOSO

A coleta do tecido cartilaginoso ocorreu em centro cirúrgico. A amostra foi acondicionada em tubo contendo 10 mL de PBS e 1% de antibióticos e transportada em caixa térmica para o NTC para o seu processamento. O isolamento celular foi realizado pela dissociação mecânica do tecido. Em seguida, os fragmentos foram dissociados pela enzima colagenase tipo I (Gibco<sup>®</sup>, New York, USA) por 3 h, em incubadora aquecida a 37°C.

Após, o meio de transporte contendo os fragmentos foi adicionado em um tubo com 10 mL de meio de cultivo modificado por Dulbecco's (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco<sup>®</sup>, New York, USA) suplementado com 10% de soro SBF e 1% de antibiótico e filtrado. A amostra foi centrifugada por 10 min para obtenção do concentrado celular, que foi ressuscitado para o início do cultivo. As células obtidas ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram distribuídas em cada frasco de cultivo com área de 75 cm<sup>2</sup> contendo 10 mL de meio DMEM suplementado com 20% SBF, 1% de antibiótico, sendo incubadas a 37°C com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>.

Na terceira passagem, as células foram caracterizadas por citometria de fluxo, de acordo com Tesch *et al.* (2018) pela marcação com os anticorpos: anti-CD14, anti-CD19, anti-CD29, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD49C, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-CD151 e anti-HLA-DR, conjugados com os fluorocromos: FITC, PE, PE-Cy5 e APC. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur, San Jose, CA, USA) e analisadas no *software* FlowJo v8.0.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

## 5.7 LINHAGEM CELULAR HeLa

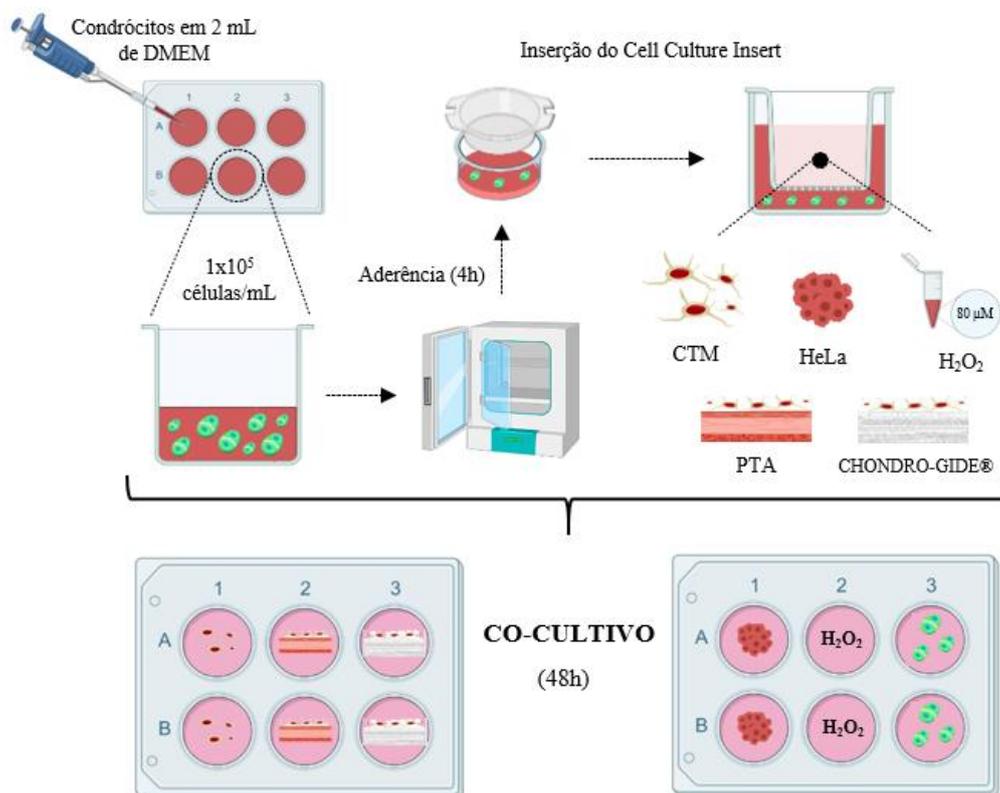
Células da linhagem de adenocarcinoma cervical HeLa, criopreservadas, foram descongeladas e semeadas em frascos de cultivo com área de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 5 mL de meio RPMI (Gibco<sup>®</sup>, New York, USA) suplementado com 10% de soro SBF e 1% de antibiótico, sendo cultivadas em suspensão por aproximadamente quatro semanas. Para obtenção do concentrado celular, as células foram centrifugadas por 10 min sendo utilizados no co-cultivo com condrócitos e nas análises citogenéticas.

## 5.8 TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE

Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados para as condições de estudo, baseados na literatura e normativas internacionais (ISO 10993), que determinam estratégias para investigação do potencial das células produzirem efeitos biológicos potencialmente irreversíveis. Para isso, foram semeadas em placas de 6 poços condrócitos ( $1 \times 10^5$  células/mL) em 2 mL de meio DMEM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> por 4 h.

Após o período de adesão dos condrócitos, o *Cell Culture Insert* (Falcon<sup>®</sup>) - recipiente contendo uma membrana com poros de 3 µm - foi posicionado em cada poço, permitindo a construção do ambiente necessário para o co-cultivo. Na porção superior do inserto, foram adicionados: CTM ( $2 \times 10^5$  células/mL) ressuspensas em 1 mL de meio IMDM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico; PTA ressuspensa em 1 mL de meio IMDM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico; Chondro-Gide<sup>®</sup> (celularizada) imersa em 1 mL de meio IMDM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico; células HeLa ( $2 \times 10^5$  células/mL) ressuspensa em 1 mL de meio RPMI suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 80

$\mu\text{M}$  diluídos em 1 mL de meio DMEM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibiótico (Fig. 12). Após a montagem do co-cultivo conforme as condições do estudo, as placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de tensão de  $\text{CO}_2$  por 48 h.



**Figura 12:** Ilustração representativa das condições de co-cultivo. Condrócitos foram semeados em placas de 6 poços e mantidos em incubação por 4 horas, seguido pela adição do *cell culture insert* em cada poço, nos quais foram adicionados: CTM, HeLa,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , PTA, Chondro-Gide® e condrócitos, de acordo com as condições do estudo.

CTM: Células-tronco mesenquimais; PTA: Produto de Terapia Celular Avançada; HeLa: Linhagem celular cancerígena;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de hidrogênio.

Fonte: O autor (2021). Criado com BioRender.com.

Após o período de incubação de 48 h, os *inserts* foram retirados e o meio de cultivo dos poços removido. As células aderidas no fundo do poço foram lavadas com 2 mL de PBS, seguido pela adição de 1 mL da enzima tripsina/EDTA 0,25% (Gibco®, New York, USA) por 5 min. Em seguida, foi adicionado em cada poço 500  $\mu\text{L}$  de SBF e 3,5 mL de meio DMEM com 1% de antibiótico. O meio contendo condrócitos de cada poço foi removido e centrifugado por 10 min para obtenção do concentrado celular, que foi ressuspendido em meio de cultivo DMEM.

## 5.8.1 TESTES DE CITOTOXICIDADE

### 5.8.1.1 *Ensaio Vermelho Neutro*

Para o teste de vermelho neutro, condrócitos ( $1 \times 10^5$ ) de cada condição de co-cultivo foram ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de DMEM (1:1). Foi realizada a diluição seriada das amostras em placa de 96 poços (50  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 12,5  $\mu\text{L}$  e 6,25  $\mu\text{L}$ ), sendo que cada concentração representa a proporção do produto utilizado. Em seguida, cada poço foi completado com DMEM suplementado com 20% de SBF até atingirem 100  $\mu\text{L}$ , sendo incubados a 37°C com 5% de tensão de  $\text{CO}_2$  por 4 h.

Após o período de incubação se iniciou o teste de vermelho neutro com o kit comercial (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA), conforme instruções do fabricante. Em cada poço foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de solução vermelho neutro (0,33%). Após 3h de incubação o meio de cultivo foi removido, seguido por uma lavagem com solução fixadora (100  $\mu\text{L}$ ) e três lavagens com PBS (200  $\mu\text{L}$ ). Em seguida, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de solução solubilizadora em cada poço, e após 10 min em incubadora a 37°C ocorreu a leitura dos valores de absorbância em leitor de microplacas (VersaMax™, Bioscreen, Finland) com o filtro de 540 nm.

### 5.8.1.2 *Ensaio MTT*

Para o teste de MTT, condrócitos ( $1 \times 10^5$ ) de cada condição de co-cultivo foram ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de DMEM (1:1). Foi realizada a diluição seriada das amostras em placa de 96 poços (50  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 12,5  $\mu\text{L}$  e 6,25  $\mu\text{L}$ ) sendo que cada concentração representa a proporção do produto utilizado (CTM, PTA, MC ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Em seguida, cada poço foi completado com DMEM não suplementado até atingirem 100  $\mu\text{L}$ , sendo incubados a 37°C com 5% de tensão de  $\text{CO}_2$  por 4 h.

Após a diluição seriada e o período de incubação se iniciou o teste de MTT com o

kit comercial (Invitrogen®), conforme instruções do fabricante. Em cada poço foi adicionado 10 µL de solução MTT (0,5 mg/mL). Após 4 h de incubação o meio de cultivo foi removido, mantendo 25 µL em cada poço, onde foi adicionado 50 µL de solução DMSO por poço. Após 10 min em incubadora a 37°C ocorreu a leitura dos valores de absorbância em leitor de microplacas com o filtro de 540 nm.

### 5.8.1.3 *Ensaio de Viabilidade e Apoptose*

A viabilidade celular foi determinada pela análise da anexina V e do 7-AAD por citometria de fluxo. Para isso, condrócitos ( $2 \times 10^5$ ) em cada condição do estudo, foram lavados com 500µL de PBS, homogeneizados, centrifugados por 5 min e incubados na ausência de luz com anexina V e 7-AAD em temperatura ambiente por 30 min. Após este período, o material foi lavado com 500µL de PBS, homogeneizado, centrifugado por 5 min e fixado em paraformaldeído 1%, para serem adquiridas no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur, San Jose, CA, USA) e analisadas no software FlowJo v8.0.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

## 5.8.2 TESTES DE GENOTOXICIDADE

### 5.8.2.1 *Ensaio Cometa*

Para a realização do ensaio do cometa, adaptou-se a metodologia desenvolvida por Villela *et al.* (2006) e Da Silva *et al.* (2007), sendo que duas lâminas histológicas foram preparadas com solução de agarose (1%) para cada condição de estudo. Após essa etapa, condrócitos ( $3 \times 10^5$ ) foram ressuspensos em 30µL de meio DMEM, sendo adicionado 10 µL dessa solução diluída em 7,5 µL de agarose *low melting* (0,5% - Bio-Rad, Madrid, Spain) em cada lâmina. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de lise (pH 10) e mantidas em geladeira (2 a 8°C) por 16 h.

Após esse período, as lâminas foram removidas da solução de lise e acondicionadas na cuba de eletroforese, sendo imersas em solução tampão (NaOH 0,3 mol + EDTA 1mM) por 30 min, para então ser iniciada a condução da corrente elétrica (25 V, 300 mA, 20 min). Após, as lâminas foram neutralizadas com tampão TRIS (0,4M, pH 7,5), lavadas com água destilada (2X) e então permaneceram *overnight* em temperatura ambiente.

Após este período, ocorreu a fixação das lâminas com etanol absoluto e a coloração com 50 µL de brometo de etídio (20 mg/mL, - Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) por 5 min. A análise se deu em microscopia de fluorescência com filtro de excitação 515-560 nm para vermelho. Foram contados em réplicas técnicas 100 cometas/lâmina, realizado a média aritmética e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, seguindo os parâmetros estabelecidos por Villela *et al.* (2006) e Araldi *et al.* (2015), indicando o grau de quebra do DNA de acordo com o *score*: 0 (ausência de cauda, apenas nucleóide), 1 (cauda  $\leq$  ao tamanho do nucleóide), 2 (cauda  $>$  que o tamanho do nucleóide ou  $\geq$  a 2x o tamanho do nucleóide), 3 (cauda  $\geq$  a 2x o tamanho do nucleóide) e 4 (ausência de nucleóide, apenas cauda). O Índice de Danos (ID) foi determinado através da quantidade de cometas analisados multiplicado pelo *score* permitindo identificar um ID variando entre 0% (todas as células sem eventos genotóxicos) e 100% (todas as células com eventos genotóxicos).

#### 5.8.2.2 *Teste de Micronúcleo*

Para a realização do teste do micronúcleo, após o co-cultivo os condrócitos ( $1,2 \times 10^5$ ) foram semeados em frascos com área de 25 cm<sup>2</sup> contendo 3 mL de meio DMEM suplementado com 20% de SBF, sendo incubadas a 37°C com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> por 24 h. Em seguida, foi adicionado 3 µL de citocalasina B (5 µg/mL - Sigma-

Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA) em cada frasco, sendo incubados nas mesmas condições por 24 h. Após esse período, o meio dos frascos foi removido e reservado para, após a dissociação enzimática com tripsina/EDTA 0,25% (1 mL / 5 min) e centrifugação (8 min / 400 g), ser utilizado para ressuspender o concentrado celular. Em seguida, o concentrado celular foi centrifugado (8 min / 400 g) após a adição de solução de cloreto de potássio (500 µL) e fixador metanol/ácido acético (500 µL). Após outra bateria de centrifugação, as células foram ressuspensas em fixador (150 µL), solução utilizada para confecção das lâminas.

Em seguida, foi realizada a contagem de 1000 células por amostra sendo analisadas as células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e polinucleadas, assim como as alterações encontradas: micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos celulares. Com base nisso, será obtido o Índice de Divisão Nuclear (IDN), calculado da seguinte forma: total de células mononucleadas + (total de células binucleadas X2) + (total de células trinucleadas X3) dividido pelo total de células).

### 5.8.2.3 *Análise Cromossômica por Bandeamento GTG*

Para a realização do bandejamento GTG, após o co-cultivo, os condrócitos ( $5 \times 10^4$ ) foram semeados em frascos com área de 25 cm<sup>2</sup> contendo 4 mL de meio DMEM suplementado com 20% de SBF, sendo incubadas a 37°C com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> até atingirem entre 70-80% de confluência (aproximadamente uma semana). Para células da linhagem HeLa a mesma metodologia foi utilizada, substituindo o meio de cultivo para RPMI.

Após o fim do cultivo, a colheita das células foi realizada seguindo o protocolo estabelecido por Borgonovo *et al.* (2014) e Vaz *et al.* (2018), adaptando-o para condrócitos e HeLa. Resumidamente, após atingirem a confluência desejada, foi

adicionado nos frascos com área de 25 cm<sup>2</sup> o interruptor mitótico *Colcemid Solution* (10 µg/mL - Gibco, New York, USA), sendo que após 24h de incubação, o sobrenadante foi transferido e reservado em um tubo cônico. As células foram removidas dos frascos utilizando a enzima tripsina/EDTA 0,25% (1 mL / 5 min), e adicionadas no tubo contendo o meio, que foi centrifugado.

Após esse período de incubação, o meio dos frascos é removido e reservado, para após a dissociação enzimática (1 mL / 5 min) e centrifugação (8 min / 400 g), ser utilizado para ressuspender o concentrado celular. Em seguida, o concentrado celular é centrifugado (8 min / 400 g) após adição de solução de cloreto de potássio (500 µL). Após outra bateria de centrifugação, as células foram ressuspensas em fixador metanol/ácido acético (150 µL), solução utilizada para confecção das lâminas.

A confecção das lâminas utilizadas ocorreu em ambiente úmido, onde gotas da amostra foram pingadas sobre as lâminas, que foram mantidas em estufa aquecida a 60°C. Em seguida, as lâminas passaram por uma bateria de reagentes para o bandeamento: tripsina/EDTA 0,25% (1:250, 0,005 g/ml) (Gibco, New York, USA), 5 segundos; NaCl (0,9%) suplementado com SBF (10%); água destilada (lavagem); e solução de Giemsa (coloração) (Laborclin, Curitiba, Brasil).

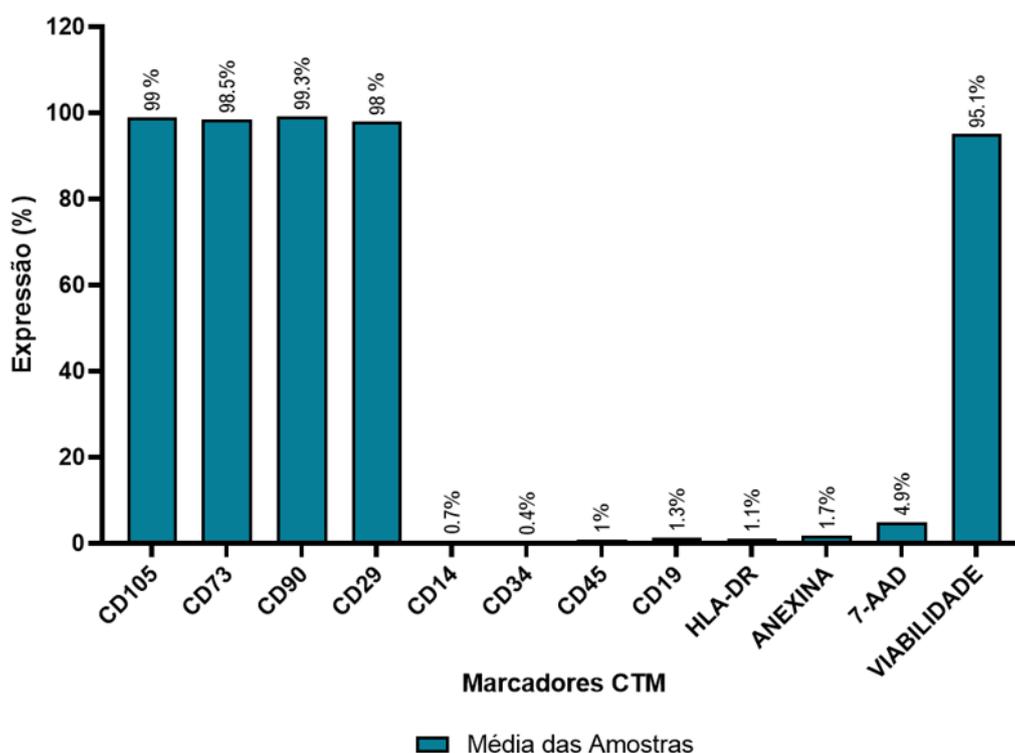
Após a confecção e coloração, as lâminas foram analisadas com base em 20 metáfases, observando a presença de alterações clonais e não clonais nas células, além de sinais de instabilidade cromossômica, de acordo com o *International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (ISCN - 2016) (McGOWAN-JORDAN *et al.*, 2016). As lâminas foram observadas no microscópio Leica (DM2000) e os kariogramas foram analisados no programa LUCIA (*Laboratory Universal Computer Image Analysis do LIM - Laboratory Imaging s.r.o*) para obtenção de kariótipos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS

#### 6.1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Foram isoladas, cultivadas e caracterizadas as CTM obtidas de três pacientes, identificadas como: CTM 01, CTM 02 e CTM 03. As médias obtidas das análises dos marcadores celulares para as CTM foram: CD105 (99%), CD73 (98,5%), CD90 (99,2%), CD29 (98%), CD14 (0,6%), CD34 (0,4%), CD45 (0,9%), CD19 (1,2%) e HLA-DR (1,1%). A expressão média do marcador de apoptose anexina V e do corante vital 7-AAD foram, respectivamente: 0,4%, 2,6% e 2%; e 3%, 6,7% e 5%. A viabilidade celular das três amostras foram, respectivamente: 96,9%, 93,3% e 94,9% (Gráfico 1).



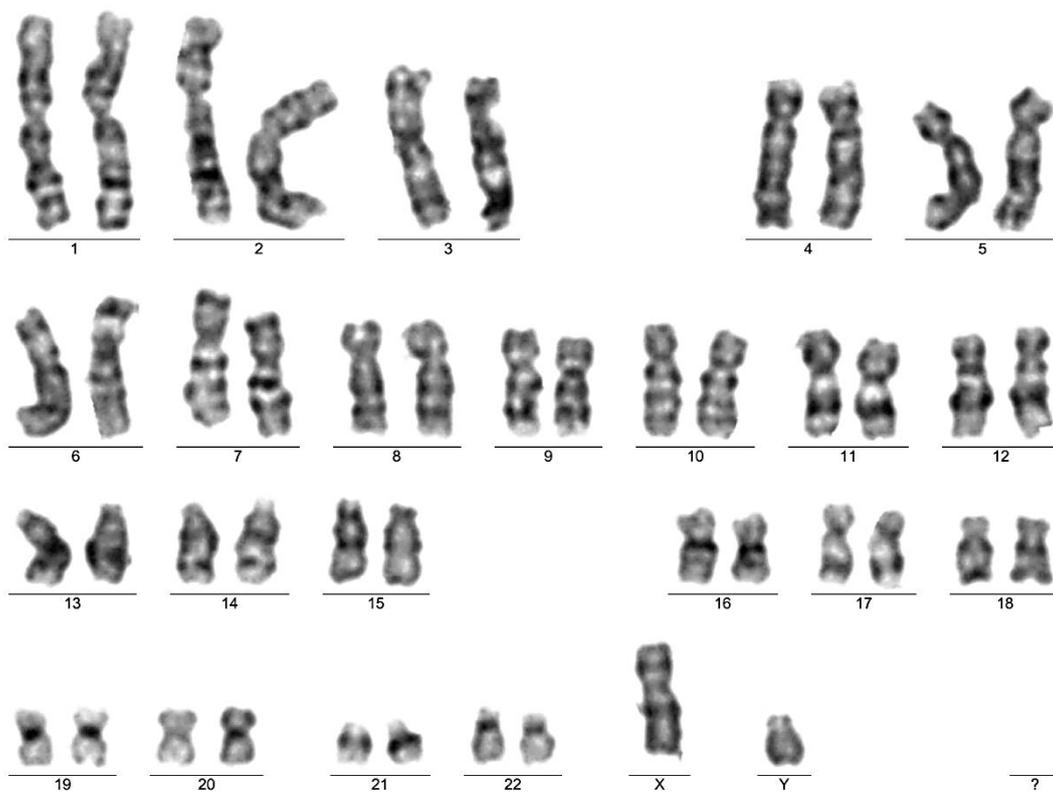
**Gráfico 1:** Expressão média dos marcadores das células-tronco mesenquimais (CTM) e viabilidade celular das amostras do estudo. Os marcadores positivos (CD105, CD73, CD90 e CD29) e negativos (CD14, CD34, CD45, CD19 e HLA-DR) foram analisados por citometria de fluxo, conforme estabelecido pela *International Society for Cellular Therapy*. A expressão da anexina V e do corante vital 7-AAD foram utilizados para determinar a viabilidade celular e a apoptose.

CTM: Células-tronco mesenquimais; CD: Grupo de diferenciação celular; HLA-DR: Antígeno de Histocompatibilidade Leucocitária – DR; 7-AAD: 7-Aminoactinomycin D.

Fonte: O autor (2021).

A análise cromossômica por bandeamento GTG gerou o cariógrama representativo das amostras de CTM utilizadas (Fig. 13), observando-se: vinte metáfases foram analisadas e não apresentaram alterações cromossômicas clonais. Sendo assim, foi determinado o cariótipo obtido para as três amostras analisadas:

CARIÓTIPO: 46,XY[20]

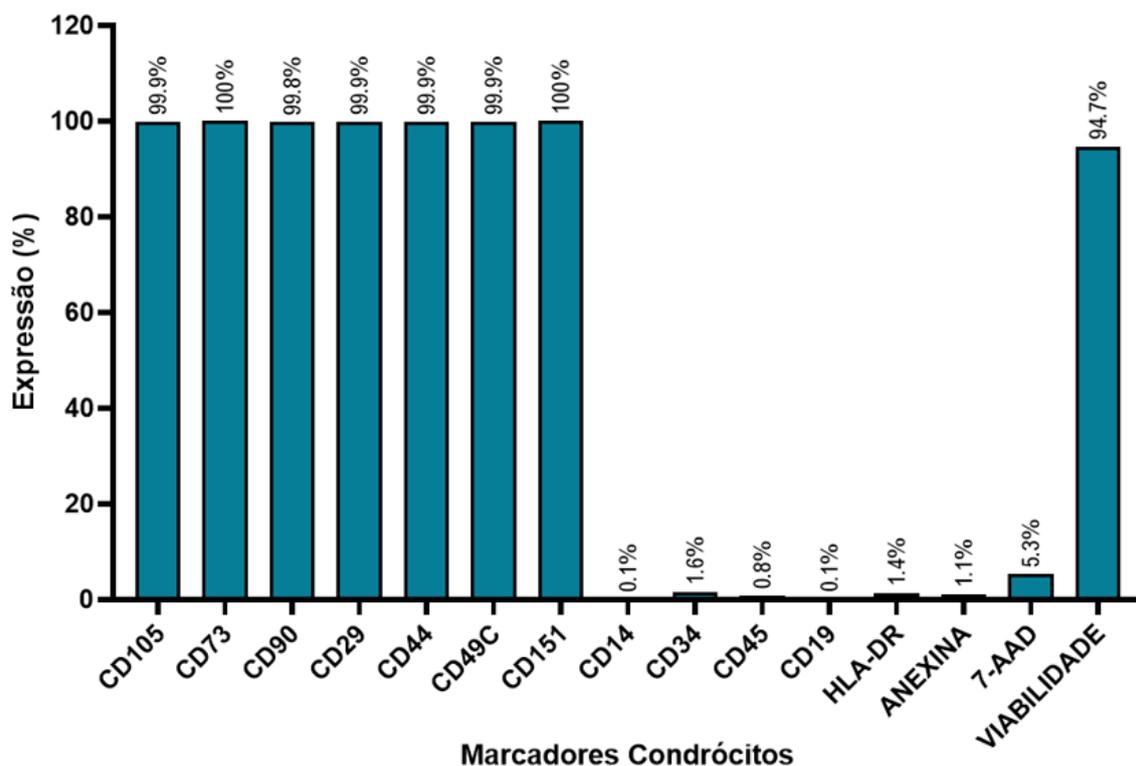


**Figura 13:** Cariograma representativo das células-tronco mesenquimais utilizadas no co-cultivo. Os cromossomos foram visualizados por microscopia e analisados com o auxílio de programas de cariotipagem, onde o cariógrama foi montado, não sendo observado variações no número e estruturas dos cromossomos.

Fonte: O autor (2021).

## 6.1.2 CONDRÓCITOS

Foram isolados, cultivados e caracterizados os condrócitos obtidos de um paciente. A análise dos marcadores celulares para linhagem condrogênica (Gráfico 2) demonstrou os seguintes percentuais: CD105 (99%), CD73 (100%), CD90 (99,8%), CD29 (99,9%), CD44 (99,9), CD49C (99,9%), CD151 (100%), CD14 (0,06%), CD34 (1,6%), CD45 (0,7%), CD19 (0,1%) e HLA-DR (1,3%). A expressão dos marcadores de apoptose anexina V e do corante vital 7-AAD foi respectivamente: 1,08% e 5,29%. A viabilidade celular obtida foi 94,71%.



**Gráfico 2:** Expressão dos marcadores para células derivadas da cartilagem e viabilidade celular. Os marcadores positivos (CD105, CD73, CD90, CD29, CD44, CD49C e CD151) e negativos (CD14, CD34, CD45, CD19 e HLA-DR) foram analisados por citometria de fluxo. A expressão dos marcadores anexina V e do corante vital 7-AAD foram utilizados para determinar a viabilidade celular e apoptose.

CD: Grupo de diferenciação celular; HLA-DR: Antígeno de Histocompatibilidade Leucocitária – DR; 7-AAD: 7-Aminoactinomycin D.

Fonte: O autor (2021).

A análise cromossômica por bandeamento GTG permitiu a construção do cariógrama representativo da amostra (Fig. 14), observando-se: vinte metáfases foram

analisadas e não apresentaram alterações cromossômicas clonais. Sendo assim, foi determinado o cariótipo dos condrócitos analisados:



**Figura 14:** Cariograma representativo dos condrócitos antes de serem co-cultivados. Os cromossomos foram visualizados por microscopia e analisados com o auxílio de programas de cariotipagem, onde o cariógrama foi montado, não sendo observado variações no número e estruturas dos cromossomos.

Fonte: O autor (2021).

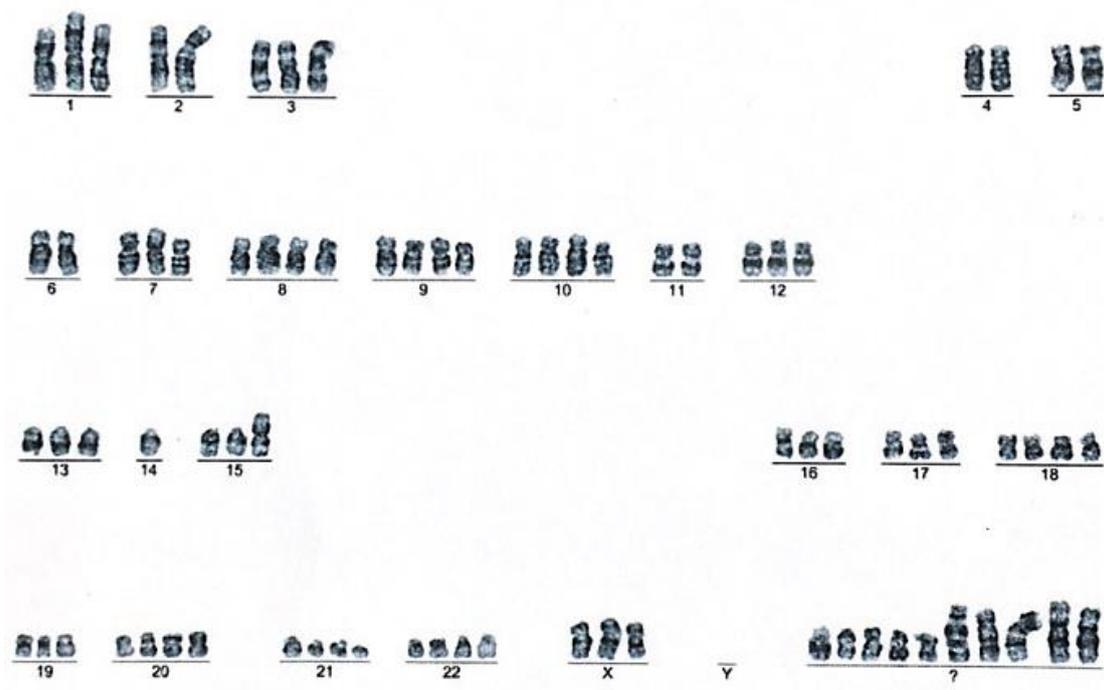
### 6.1.3 LINHAGEM HeLa

Foram cultivadas e caracterizadas, pela análise cromossômica por bandeamento GTG, as células da linhagem HeLa com base no cariógrama representativo da amostra (Fig. 15), observando-se: Dez metáfases foram completamente analisadas, todas hiperdiploides, com número cromossômico variando de 54 a 79. Das inúmeras alterações presentes, foram identificadas como alterações clonais as seguintes: cromossomo derivativo 19, provavelmente resultante de uma translocação t(13;19) e

isocromossomo do braço longo do cromossomo 15. Além dessas, também foram observados vários rearranjos envolvendo o braço curto do cromossomo 1 (1p), resultando em vários tipos de cromossomos derivativos, outros cromossomos derivativos envolvendo os cromossomos 2 e 3 e a presença de vários cromossomos marcadores.

Com base nas observações registradas nos cariogramas, foi determinado o cariótipo das células analisadas:

CARIÓTIPO: 54~79,XX,der(19)t(13;19)(q10,p10),i(15)(q10),inc[cp10]



**Figura 15:** Cariograma representativo da amostra HeLa. Os cromossomos foram visualizados por microscopia e analisados com o auxílio de programas de cariotipagem, onde o cariograma foi montado, sendo observado variações no número e estruturas dos cromossomos.

Fonte: O autor (2021).

O cariótipo completo confirma a presença de instabilidade genética, característica dessa linhagem, justificando seu uso como controle positivo nos testes de genotoxicidade.

## 6.2 Citotoxicidade: Ensaio Vermelho Neutro e MTT

O percentual de citotoxicidade das amostras utilizadas foi determinado para quatro diferentes concentrações dos produtos utilizados, com base nos condrócitos co-cultivados: com CTM (C/CTM), com o PTA (C/PTA), com a membrana comercial Chondro-Gide® (C/MC), com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e com condrócitos (C), por meio dos testes de vermelho neutro e MTT.

Foi possível estabelecer as concentrações de CTM, PTA, MC e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que inibem 20, 50 e 80% do crescimento de condrócitos após o co-cultivo. Determinou-se a ausência de citotoxicidade (0%) para os condrócitos co-cultivados com condrócitos.

Por meio do ensaio vermelho neutro, foi determinado a citotoxicidade das concentrações dos produtos proporcionais a: 6,25x10<sup>3</sup>; 12,5x10<sup>3</sup>; 25x10<sup>3</sup>; 50x10<sup>3</sup> condrócitos (Tabela 1).

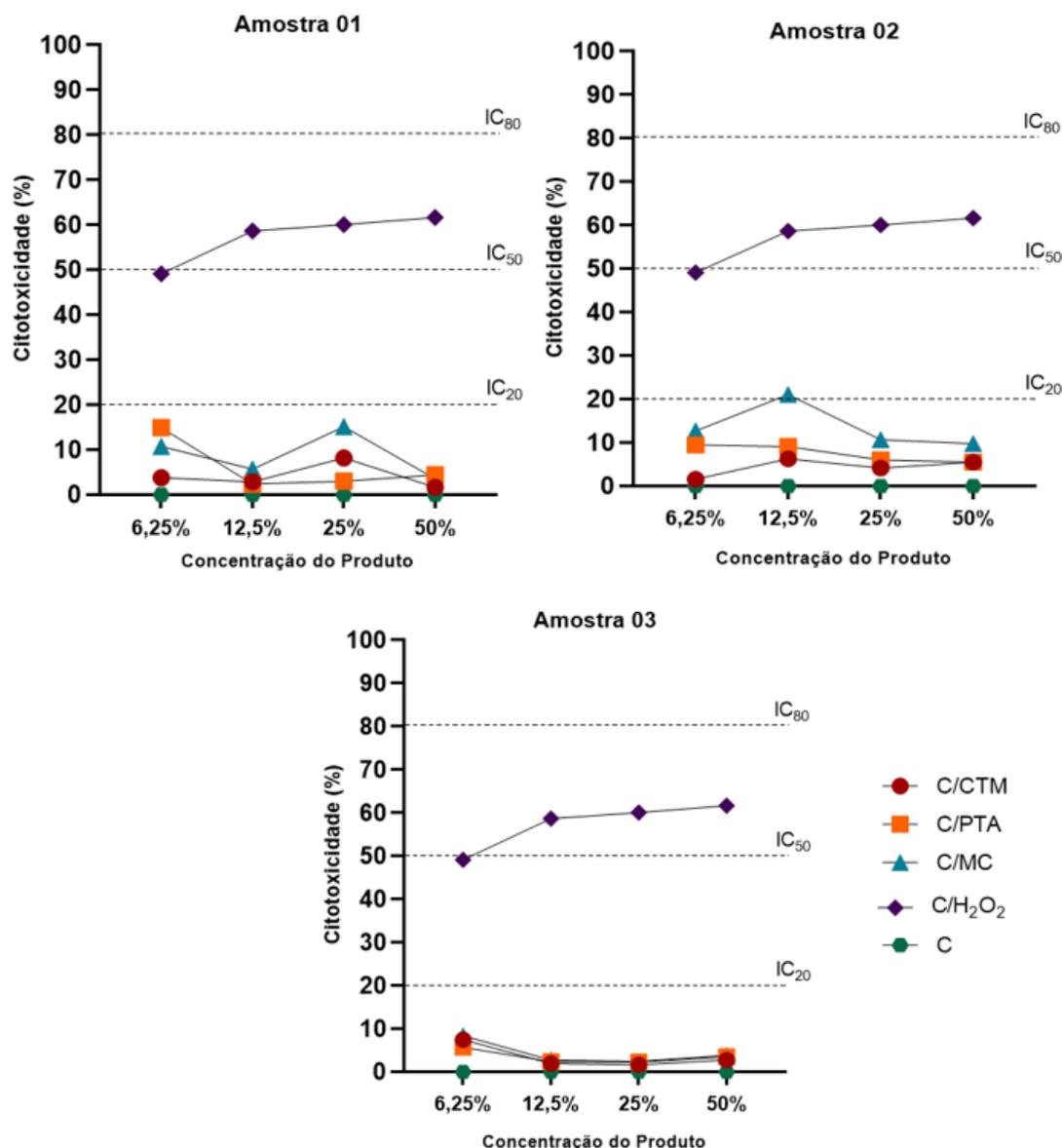
**Tabela 1:** Citotoxicidade dos produtos analisados pelo ensaio vermelho neutro após o co-cultivo com condrócitos. O percentual de concentração dos produtos utilizados seguiu a proporção de condrócitos co-cultivados com: células-tronco mesenquimais (C/CTM), o produto de terapia avançada (C/PTA), a membrana comercial Chondro-Gide (C/MC), o peróxido de hidrogênio (C/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e com condrócitos (C). Essa proporção foi realizada para as triplicatas biológicas (A1, A2 e A3).

Concentração do Produto (%)	Condições de Estudo					
	Amostras	C/CTM	C/PTA	C/MC	C/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C
6,25	A1	3,8	14,9	10,8		
	A2	1,6	9,5	12,7	49,2	0,0
	A3	7,5	5,7	8,4		
12,5	A1	2,9	2,4	5,7		
	A2	6,3	9,1	21,1	58,7	0,0
	A3	2,0	2,4	2,8		
25	A1	8,2	3,0	15,2		
	A2	4,2	6,1	10,7	60,1	0,0
	A3	1,7	2,3	2,5		
50	A1	1,7	4,4	3,6		
	A2	5,5	5,5	9,8	61,7	0,0
	A3	2,8	3,5	3,9		

CTM: Células-tronco mesenquimais; A: Amostra; C/CTM: Condórcitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condórcitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condórcitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condórcitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio; e C: condórcitos.

Fonte: O autor (2021).

As concentrações dos produtos formados por CTM testadas isoladamente e utilizadas para a recelularização do PTA, não afetou 20% o crescimento de 20% dos condrócitos ( $IC_{20}$ ) em todas as concentrações testadas (Gráfico 3). Já a MC não apresentou inibição do crescimento de condrócitos de 20% para todas as concentrações das amostras A1 e A3, contudo, na amostra A2, foi identificado para a concentração de 12,5% do produto, um valor de  $IC > 20$  (21,1%). A concentração de  $H_2O_2$  co-cultivada com condrócitos demonstrou uma citotoxicidade entre os valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{80}$ , sendo o valor mais próximo de inibição de 50% do crescimento de condrócitos identificada para a concentração de 12,5% do produto (49,7%).



**Gráfico 3:** Percentual de citotoxicidade para as condições de estudo por meio do ensaio vermelho neutro. A citotoxicidade (%) foi determinada para quatro concentrações do produto (6,25%; 12,5%; 25%; 50%) em co-cultivo com condrócitos, nas condições de estudo C/CTM, C/PTA, C/MC, C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e C. Foram analisados os valores de citotoxicidade responsáveis por inibir 20% (IC<sub>20</sub>), 50% (IC<sub>50</sub>) e 80% (IC<sub>80</sub>) do crescimento dos condrócitos.

C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio; e C: condrócitos.

Fonte: O autor (2021).

Por meio do ensaio MTT, foi determinado a citotoxicidade das concentrações dos produtos (6,25%, 12,5%, 25%, 50%) co-cultivados com condrócitos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Citotoxicidade dos produtos analisados pelo ensaio MTT após o co-cultivo com condrócitos. O percentual de concentração dos produtos utilizados seguiu a proporção de condrócitos co-cultivados com: células-tronco mesenquimais (C/CTM), o produto de terapia avançada (C/PTA), a membrana comercial Chondro-Gide (C/MC), o peróxido de hidrogênio (C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e com condrócitos (C). Essa proporção foi realizada para as triplicatas biológicas (A1, A2 e A3).

Concentração do Produto (%)	Condições de Estudo					
	Amostras	C/CTM	C/PTA	C/MC	C/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C
0,6	A1	10,6	20,2	22,2		
	A2	11,7	18,7	24,3	63,4	0,0
	A3	10,8	18,8	22,3		
0,12	A1	8,6	17,4	22,9		
	A2	9,1	17,3	22,6	50,5	0,0
	A3	9,3	17,3	22,4		
0,25	A1	6,2	17,8	23,3		
	A2	5,4	17,5	23,1	48,1	0,0
	A3	5,5	17,4	22,5		
0,5	A1	3,2	15,0	20,2		
	A2	3,2	14,9	18,5	43,1	0,0
	A3	3,2	15,2	20,3		

MTT: 3 - [4,5 - dimetil-2-tiazolil] - 2,5 - difenil - 2H - tetrazólio; CTM: Células-tronco mesenquimais; A: Amostra; C/CTM: Condórcitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condórcitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condórcitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condórcitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio; e C: condórcitos.

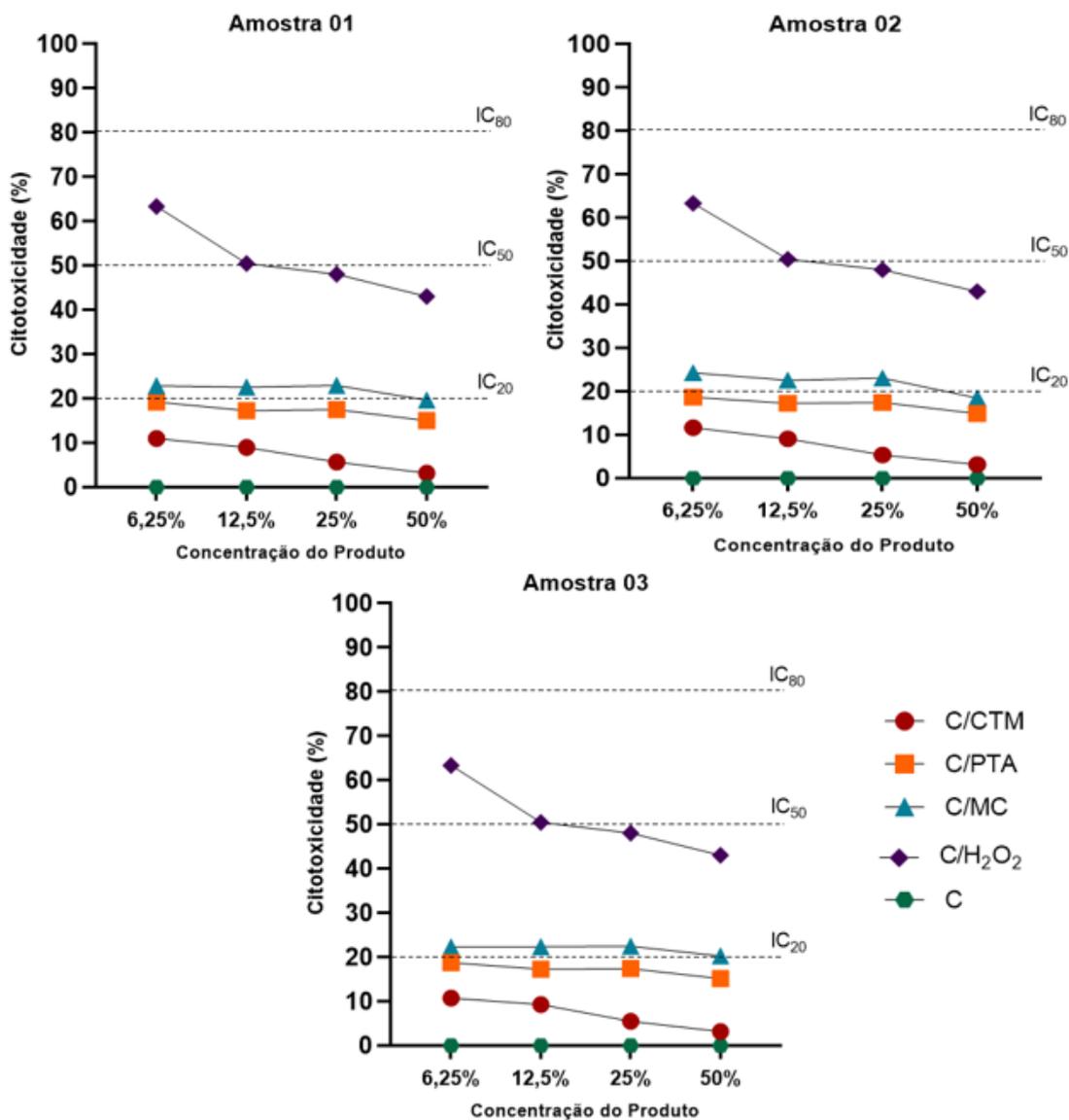
Fonte: O autor (2021).

As concentrações dos produtos formados por CTM testadas isoladamente e utilizadas para a recelularização do PTA, não inibiu 20% do crescimento de condórcitos (IC<sub>20</sub>) em todas as concentrações testadas (Gráfico 4). Já a MC não apresentou inibição do crescimento de condórcitos de 20% para todas as concentrações das amostras A1 e A3, contudo, na amostra A2, foi identificado para a concentração de 12,5% do produto, um valor de IC > 20 (21,1%). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> co-cultivada com condórcitos demonstrou uma citotoxicidade entre os valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>80</sub>, sendo o valor mais

próximo de inibição de 50% do crescimento de condrócitos identificada para a concentração de 12,5% do produto (49,7%).

As concentrações dos produtos formados por CTM testadas isoladamente não inibiu 20% do crescimento de condrócitos ( $IC_{20}$ ) em todas as concentrações celulares testadas. Já o PTA não apresentou inibição do crescimento de condrócitos de 20% para todas as concentrações das amostras A2 e A3, contudo, na amostra A1, foi identificado para a concentração de 6,25% do produto, um valor de  $IC > 20$  (20,2%).

Para a condição C/MC observou-se um  $IC > 20$  para todas as concentrações das amostras A1 e A3, contudo, na amostra A2, foi identificado para a concentração de 50% do produto, um valor de  $IC > 20$  (18,5%). A concentração de  $H_2O_2$  co-cultivada com condrócitos demonstrou uma citotoxicidade entre os valores de  $IC_{20}$  e  $IC_{80}$ , sendo o valor mais próximo de inibição de 50% do crescimento de condrócitos identificada para a concentração de 12,5% do produto (60,5%).

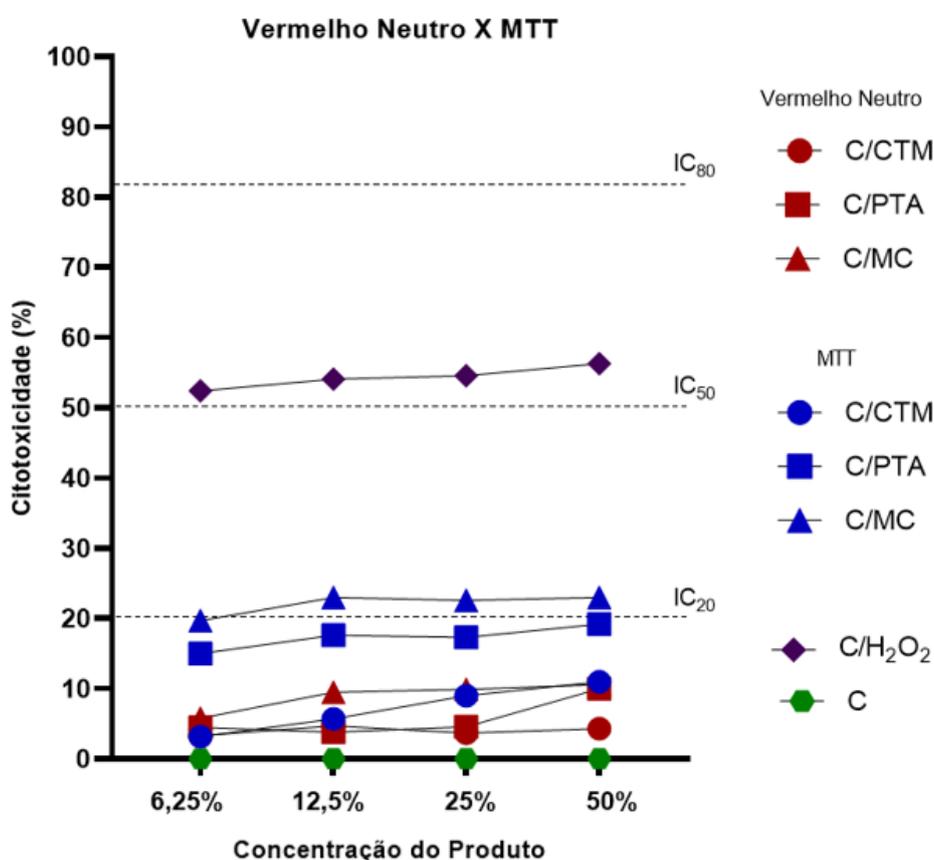


**Gráfico 4:** Percentual de citotoxicidade para as condições de estudo por meio do ensaio MTT. A citotoxicidade (%) foi determinada para quatro concentrações do produto (6,25%; 12,5%; 25%; 50%) em co-cultivo com condrócitos, nas condições de estudo C/CTM, C/PTA, C/MC, C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e C. Foram analisados os valores de citotoxicidade responsáveis por inibir 20% (IC<sub>20</sub>), 50% (IC<sub>50</sub>) e 80% (IC<sub>80</sub>) do crescimento dos condrócitos.

C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide<sup>®</sup> celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio; e C: condrócitos.

Fonte: O autor (2021).

A média da citotoxicidade de todas as concentrações testadas para as amostras A1, A2 e A3, seguiu a tendência observada nos gráficos 3 e 4. Para o teste de vermelho neutro nenhuma condição e concentração apresentou média superior ao IC<sub>20</sub>. Em contrapartida, no teste MTT a condição C/MC apresentou média superior ao IC<sub>20</sub> em três diferentes concentrações, contudo, as diferentes concentrações de C/CTM e C/PTA se mantiveram < IC<sub>20</sub>. A média das condições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi maior que o IC<sub>50</sub> em todas as concentrações (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Percentual médio da citotoxicidade para as condições de estudo por meio dos ensaios vermelho neutro e MTT. A citotoxicidade (%) foi determinada para quatro concentrações do produto (6,25%; 12,5%; 25%; 50%) nas condições de estudo C/CTM, C/PTA e C/MC nos grupos vermelho neutro e MTT. Os controles C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e C foi utilizado para os dois testes. Foram analisados os valores de citotoxicidade responsáveis por inibir 20% (IC<sub>20</sub>), 50% (IC<sub>50</sub>) e 80% (IC<sub>80</sub>) do crescimento dos condrócitos.

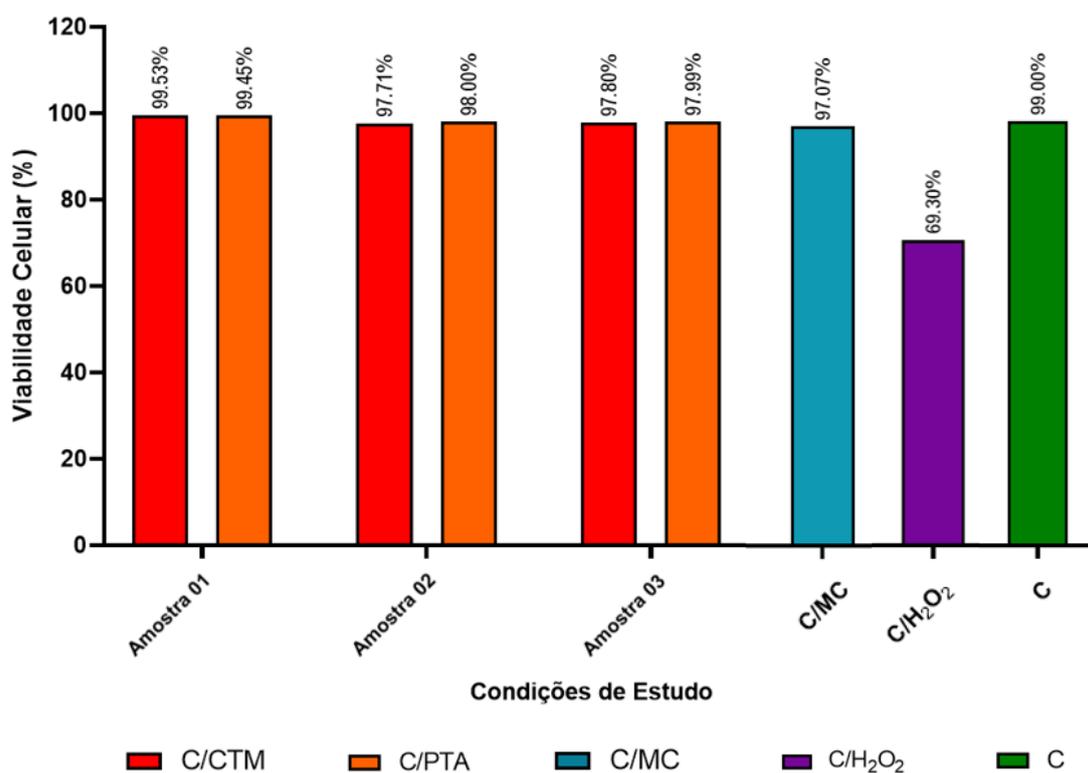
MTT: 3 - [4,5 - dimetil-2-tiazolil] - 2,5 - difenil - 2H - tetrazólio; IC: Concentração inibitória; C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio; e C: condrócitos.

Fonte: O autor (2021).

### 6.3 Citotoxicidade: Viabilidade e Apoptose

Foi realizada a análise da expressão de anexina V e 7-AAD, respectivamente, para as condições C/CTM e C/PTA para as amostras: 01 (0,16%; 0,47%) e (0,06%; 0,55%); 02 (0,65%; 2,29%) e (0,86%; 2%); e 03 (1,1%; 2,2%) e (1,13%; 2,01%). Para os controles, a expressão de anexina V e 7-AAD foram, respectivamente: C/MC (0,2%; 2,93%); C (0,8%; 1%) e C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,7%; 30,7%) (Anexo C e D).

A viabilidade celular foi determinada para as condições C/CTM e C/PTA para as amostras: 01 (99,53%) e (99,45%); 02 (97,71%) e (98%); e 03 (97,80%) e (97,99%). Para os controles a viabilidade celular foi: C/MC (97,07%); C (99%) e C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (69,3%) (Gráfico 6).



**Gráfico 6:** Percentual de viabilidade celular para as condições de estudo. A viabilidade celular (%) foi determinada para as quatro concentrações do produto (6,25%, 12,5%, 25% e 50%) nas condições de estudo C/CTM, C/PTA, C/MC, C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e C.

C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio; e C: condrócitos.

Fonte: O autor (2021).

## 6.4 Genotoxicidade: Ensaio Cometa

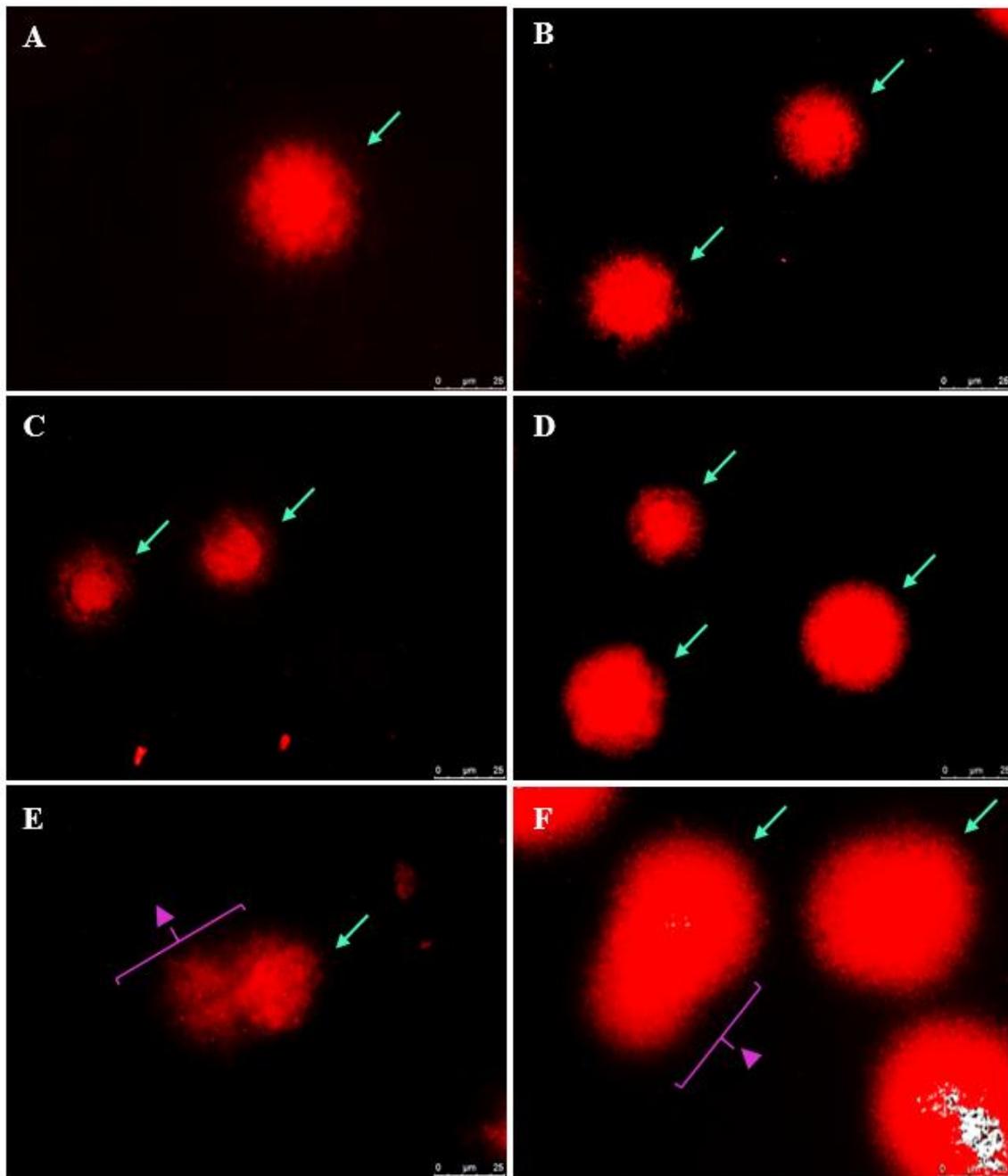
O ensaio do cometa foi realizado com todas as amostras propostas para as condições de estudo. A análise média dos *scores* dos cometas (nucleóide e cauda) das amostras classificou 100% das células das condições C/CTM, C/PTA, C/MC e C como *score* 0 (ausência de cauda, apenas nucleóide) (Tabela 3). Em contrapartida, a análise dos cometas para as células HeLa identificou 91% das células *score* 0 e o restante entre os *scores* 1, 2 e 3. Através dos *scores* obtidos por meio da presença e tamanho de cauda (Fig. 16) foi determinado o Índice de Dano (ID) genotóxico para as condições de estudo: C/CTM (ID = 0%), C/PTA (ID = 0%), C/MC (ID = 0%), C (ID = 0%) e HeLa (ID = 1,7%).

**Tabela 3:** Índice de dano e *scores* obtidos através do ensaio cometa. A análise da média dos *scores* dos cometas após o ensaio do cometa para as condições de estudo: C/CTM - Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA - Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC - Condrócitos co-cultivados com a membrana Chondro-Gide® celularizada com CTM; células da linhagem HeLa; e C - condrócitos. Calculou-se o Índice de Dano (ID) com base nos *scores*.

Condições de Estudo	Scores (%)					Índice de Dano (ID)
	0	1	2	3	4	
C/CTM	100%	0%	0%	0%	0%	0%
C/PTA	100%	0%	0%	0%	0%	0%
C/MC	100%	0%	0%	0%	0%	0%
C	100%	0%	0%	0%	0%	0%
HeLa	91%	3%	4%	2%	0%	1,7%

ID: Índice de dano; C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; HeLa: Células da linhagem de adenocarcinoma cervical; e C: Condrócitos.

Fonte: O autor (2021).



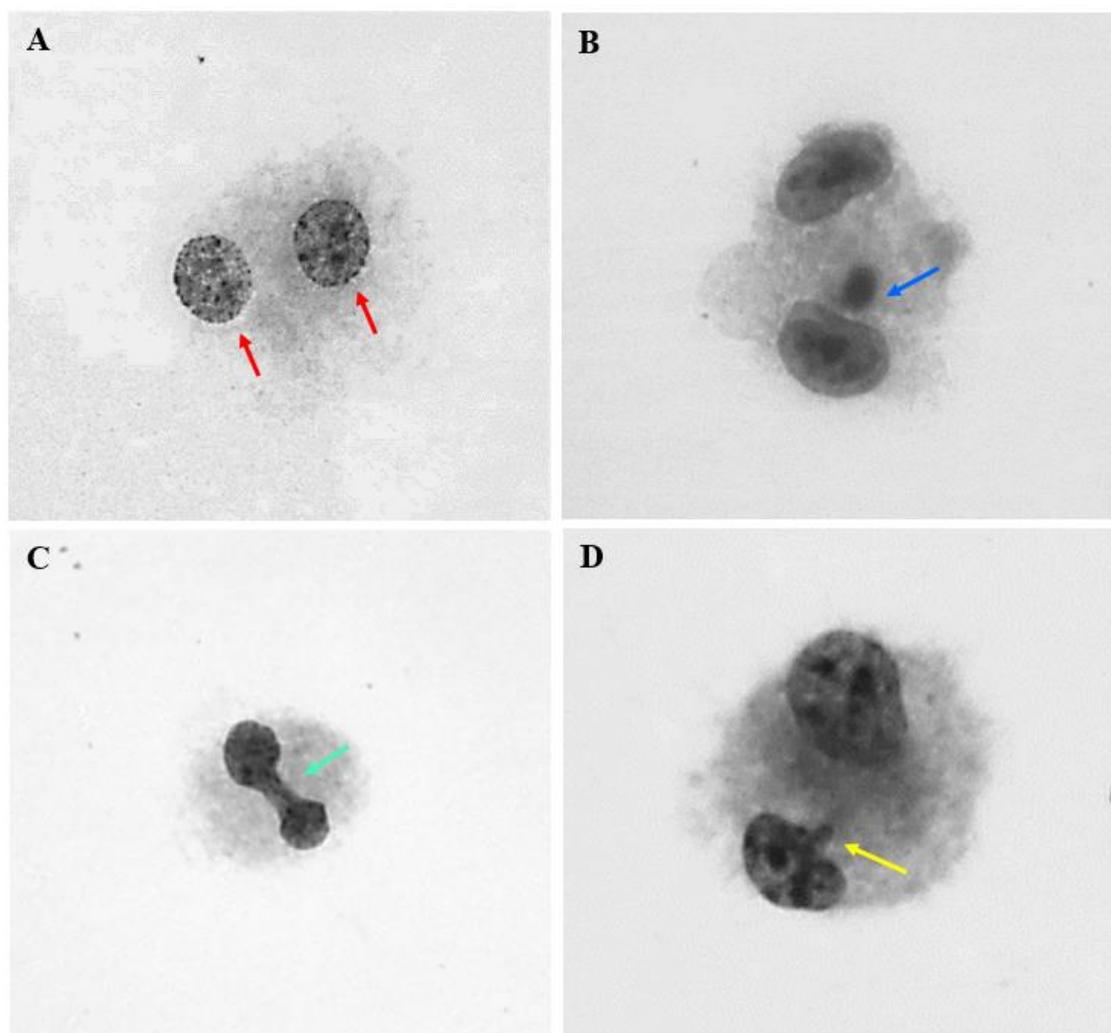
**Figura 16:** Condrócitos após o ensaio do cometa. Os cometas formados após o ensaio de genotoxicidade para as condições de estudo: C/CTM (A), C/PTA (B), C/MC (C), C (D) e células HeLa *score 1* (E) e *score 2* (F). As setas verdes apontam para o nucleóide dos condrócitos, enquanto os triângulos lilás demonstram a área de formação de uma cauda do cometa.

C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana Chondro-Gide® celularizada com CTM; HeLa: Células da linhagem de adenocarcinoma cervical; e C: condrócitos.

Fonte: O autor (2021).

## 6.5 Genotoxicidade: Teste de Micronúcleo

O teste de micronúcleo (Fig. 17) foi realizado com todas as amostras propostas para as condições de estudo. Por meio da análise das 1.000 células/lâmina, obteve-se o índice de divisão nuclear médio para as condições de estudo: C/CTM (IDN = 1,47); C/PTA (IDN = 1,37); C/MC (IDN = 1,26); células HeLa (IDN = 1,5); e C (IDN = 1,46).



**Figura 17:** Análise das células após o teste de micronúcleo. Observa-se com destaque dois núcleos característicos de células binucleadas (A – setas vermelhas), e a formação de micronúcleo (B – seta azul), ponte citoplasmática (C – seta verde) e broto nuclear (D – seta amarela).

Fonte: O autor (2021).

As células binucleadas foram analisadas para as condições de estudo, permitindo identificar percentual de células normais, com micronúcleo, com ponte e com broto (Tabela 4). Dessa maneira, observou-se o percentual médio das células com alterações (micronúcleo, ponte ou broto) das condições: C/CTM (0,9%); C/PTA (0,4%); C/MC (0,4%); células HeLa (24,9%); e C (1,5%).

**Tabela 4:** Média da análise das células binucleadas após o teste de micronúcleo. A análise das células binucleadas (*n*) após o teste de micronúcleo para as condições de estudo: C/CTM - Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA - Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC - Condrócitos co-cultivados com a membrana Chondro-Gide® celularizada com CTM; C - condrócitos; e células da linhagem HeLa. Observou-se o número de células normais, com micronúcleo, com ponte e com broto.

<b>Células Binucleadas</b>	<b>C/CTM (<i>n</i> = 441)</b>	<b>C/PTA (<i>n</i> = 312)</b>	<b>C/MC (<i>n</i> = 264)</b>	<b>Células HeLa (<i>n</i> = 394)</b>	<b>C (<i>n</i> = 273)</b>
Normais	99,1%	99,6%	99,6%	75,1%	98,5%
Com micronúcleo	0,1%	0,2%	0,4%	17%	0%
Com ponte citoplasmática	0,8%	0,2%	0%	6,6%	1,5%
Com broto nuclear	0%	0%	0%	1,3%	0%

CTM: Células-tronco mesenquimais; *n*: valor amostral; C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; HeLa: Células da linhagem de adenocarcinoma cervical; e C: condrócitos.

Fonte: O autor (2021).

## 6.6 Genotoxicidade: Análise Cromossômica por Bandeamento GTG

Através da análise cromossômica por bandeamento GTG, foram analisadas vinte metáfases para cada uma das condições de estudo propostas: C/CTM, C/PTA, C/MC. Os cariótipos não apresentaram aberrações cromossômicas numéricas ou clonais (Tabela 5), com base no cariograma das amostras (Fig. 18).

**Tabela 5:** Cariótipo das condições de estudo através da análise cromossômica por bandeamento GTG. A análise de 20 metáfases não identificou a presença de aberrações cromossômicas nas amostras: C/CTM - Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA - Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC - Condrócitos co-cultivados com a membrana Chondro-Gide® celularizada com CTM.

Cariótipo	Resultado
C/CTM	46,XX[20]
C/PTA	46,XX[20]
C/MC	46,XX[20]

CTM: Células-tronco mesenquimais; *GTG*: *G-bands by Trypsin using Giemsa*; C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM.

Fonte: O autor (2021).



**Figura 18:** Cariograma representativo dos condrócitos co-cultivados com as condições de estudo. Os cromossomos foram visualizados por microscopia e analisados com o auxílio de programas de cariotipagem. Não foram identificadas nos cariógramas, variações no número e estruturas dos cromossomos de condrócitos co-cultivados com: CTM (A), o PTA (B) e a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada (C).

CTM: Células-tronco mesenquimais; PTA: Produto de terapia avançada.

Fonte: O autor (2021).

## 7. DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais isoladas do TCU e cultivadas *in vitro* para os testes de biocompatibilidade expressaram positividade  $\geq 95\%$  para os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e  $\leq 2\%$  dos marcadores de superfície CD14, CD34, CD45, CD19 e HLA-DR uma das características necessárias para confirmar a linhagem mesenquimal, de acordo com os critérios mínimos estabelecidos por Dominici *et al.* (2006). Adicionalmente, nossos dados corroboram com outros autores que utilizaram CTM derivadas do TCU, como Nagamura-Inoue & He (2014), Secunda *et al.* (2015) e Van Pham *et al.* (2016), que também utilizaram o marcador de adesão celular CD29 e obtiveram a expressão  $>95\%$ , complementando a caracterização dos marcadores celulares estabelecidos por Dominici *et al.* (2006).

A importância da viabilidade e integridade das células utilizadas na terapia celular é abordada constantemente na literatura, principalmente quando o objetivo é a utilização em ensaios clínicos, sendo descrito por Riordan *et al.* (2018) como parte do perfil de segurança, sendo importante uma viabilidade  $\geq 75\%$  para a infusão. Com base nesse perfil de segurança, as CTM das três amostras utilizadas no desenvolvimento do PTA testado em nosso estudo apresentaram uma ótima viabilidade celular para estudos clínicos. Entretanto, entende-se por meio da RDC N°338 que é importante avaliar esse parâmetro não apenas no momento inicial da construção do PTA, como feito nesse estudo, mas também previamente à sua utilização clínica, para assegurar a eficiência dessas células no processo reparativo desejado.

As células isoladas do tecido cartilaginoso e cultivadas para os testes de biocompatibilidade apresentaram a expressão positiva dos marcadores de superfície CD105, CD73, CD29, CD29, CD44, CD49C e CD151  $\geq 70\%$  e expressão reduzida para os marcadores CD14, CD34, CD45, CD19 e HLA-DR  $\leq 2\%$  de acordo com os

critérios estabelecidos por Tesch *et al.* (2018). Da mesma forma, o autor considera importante que após o processamento a viabilidade celular permaneça >70%. As células obtidas do tecido cartilaginoso e utilizadas neste estudo estão de acordo com estes critérios.

Seguindo as normativas previstas pela RDC N° 338, é necessário avaliar a biocompatibilidade de um PTA para o registro definitivo frente as agências técnicas nacionais, ou seja, comprovar a ausência de toxicidade do produto utilizado mostra-se fundamental. A combinação dos testes de citotoxicidade vermelho neutro e MTT foi utilizada por Rahmani-Kukia *et al.* (2020) para determinar a viabilidade e citotoxicidade desempenhada por CTM tratadas com estrogênio e co-cultivadas com neutrófilos, observando resultados significativos para diferentes concentrações do produto teste. Em contrapartida, De Simone *et al.* (2020) indica o método de azul de tripan para trabalhos que envolvem CTM, uma vez que essas células tendem a estimular um bloqueio de vias que estimulam respostas de senescência celular. Apesar disso, nossos achados mostram que os ensaios de vermelho neutro e MTT desempenharam a função de determinar a citotoxicidade dos condrócitos em co-cultivo.

Em nosso estudo as CTM, o PTA e membrana comercial Chondro-Gide® foram testados quando a citotoxicidade em condrócitos co-cultivados. A utilização da membrana comercial é respaldada por mais de uma década de estudos clínicos, que comprovam os benefícios de sua utilização como uma matriz colágena para a proliferação de condrócitos (KAISER *et al.*, 2015). Sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade foi observada por Warnke *et al.* (2009), por meio de diversos testes, entre eles o ensaio de MTT.

Além disso, ensaios clínicos demonstram a biocompatibilidade da membrana comercial Chondro-Gide® para o tratamento de lesões do joelho (BENTHIEN *et al.*,

2010; SADLIK *et al.*, 2017), quadril (MANCINI & FONTANA, 2014; FICKERT *et al.*, 2017) e tornozelo (USUELLI *et al.*, 2015). Por essas razões, a utilização dessa membrana comercial se mostrou uma opção neste estudo, observando as diferenças das alterações proporcionadas pelo PTA proposto com uma membrana já aprovada.

O peróxido de hidrogênio é utilizado para ocasionar a lise de diversos tipos celulares, uma vez que essa solução ocasiona dano oxidativo na membrana celular, conforme demonstrado por Mehmood *et al.* (2013). Diferentes níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser utilizadas para determinar alterações citotóxicas, por exemplo, Pang *et al.* (2020) demonstrou a concentração que inibe 25% (IC<sub>25</sub> = 55 µM) e 50% (IC<sub>50</sub> = 82,5 µM) da viabilidade de condrócitos *in vitro*. Por essas razões, utilizamos a concentração de 80 µM/µL, buscando observar um dano citotóxico nos condrócitos utilizados.

Em nosso estudo, a citotoxicidade dos condrócitos co-cultivados com as CTM e com o PTA se manteve menor ou igual aos condrócitos co-cultivados com a membrana comercial, na maioria das concentrações testadas, tanto no teste de vermelho neutro quanto no MTT. O IC<sub>20</sub> foi ultrapassado pela condição C/MC na maioria das concentrações de células utilizadas para o teste de MTT, situação não observada pelas condições C/CTM e C/PTA. As três condições de estudo apresentaram maiores percentuais de citotoxicidade que o grupo controle, entretanto, a similaridade entre os grupos com a membrana comercial já aprovada, ajuda a demonstrar a ausência de citotoxicidade das amostras, levando em consideração os achados de Warnke *et al.* (2009).

É interessante observar também que os condrócitos co-cultivados com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram IC próximo dos 50% na concentração de 12,5% do produto utilizado, para os condrócitos no teste MTT, corroborando os achados de Pang *et al.* (2020), que utilizou a mesma concentração utilizada nesse estudo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para determinar o valor

de IC<sub>50</sub> para condrócitos. Esses dados complementam os estudos Wu *et al.* (2016) que avaliou a utilização da MAH somada as CTM como um *scaffold* adequadamente biocompatível.

Da mesma maneira, Dorazehi *et al.* (2018) utilizou o ensaio de MTT e não encontrou evidências de toxicidade ou alterações da proliferação celular ocasionada pela MAH descelularizada, em uma avaliação realizada por período de 15 dias. Esses estudos somam aos nossos achados, mostrando a segurança no uso de *scaffolds*, ao contrário do que foi descrito por Sachlos *et al.* (2003), avaliando a toxicidade celular em matrizes colágenas.

A média da citotoxicidade das amostras nos testes de vermelho neutro e MTT corroboram as análises individuais. Diante disso, entende-se, com base no método utilizado, e nos testes de vermelho neutro e MTT, os mediadores produzidos pela associação das CTM à MAH não induzem danos citotóxicos maiores que os produzidos pela membrana comercial, utilizada atualmente em cirurgias ortopédicas. Os achados indicam também que a utilização do PTA proposto pode ser vantajosa em relação a membrana comercial, uma vez que aparentemente existe uma redução na citotoxicidade, sendo importante verificar se essa associação é significativa estatisticamente.

Observamos também que os condrócitos co-cultivados com as CTM, o PTA e a MC não apresentaram oscilações de viabilidade celular superiores a 5% em relação ao controle negativo. Dessa maneira, os produtos testados não interferiram na viabilidade dos condrócitos durante o período de co-cultivo utilizado, situação não observada para os condrócitos que foram co-cultivados com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que apresentaram variação na viabilidade superior a 30%, situação já esperada levando em consideração os achados de Pang *et al.* (2020).

Assim como o proposto em nosso estudo, a quantificação da viabilidade celular por meio do 7-AAD é considerada por Kiesgen *et al.* (2021) como um padrão bem estabelecido, sendo utilizado para determinar a viabilidade em ensaios de citotoxicidade de diversos tipos celulares, em que se destaca linfócitos T (HERMANS *et al.*, 2004), macrófagos (BRACHER *et al.*, 2007) e CTM (RYU *et al.*, 2014).

A ausência de genotoxicidade do PTA complementa os achados referentes a citotoxicidade na comprovação da biocompatibilidade desse produto em relação aos condrócitos. Foi observado no ensaio do cometa que as amostras C/CTM e C/PTA apresentaram ID=0%, assim como a amostra C/MC e C. Em contrapartida, as células HeLa apresentaram ID=1,7%, demonstrando como controle positivo um percentual de dano superior as amostras não alteradas. Situação semelhante foi observada em outras linhagens celulares comparadas com amostras de células HeLa, conforme demonstrado por Jagetia *et al.* (2015), associando que os produtos testados não fragmentaram o DNA dos condrócitos para serem visualizadas alterações, contudo a análise isolada desses índices deve ser cautelosa, por conta de limitações associadas a técnica.

As limitações do ensaio do cometa, segundo a OECD (2014), são: as diferentes taxas de migração do DNA, que podem ser resultantes de processos celulares naturais, e não necessariamente de danos genotóxico; e a capacidade em identificar pequenas lesões na fita de DNA resultantes de eventos genotóxicos de curta duração e facilmente reparáveis pela maquinaria celular, por isso a importância da comparação com outro produto já aprovado para esse uso, conforme realizamos nesse estudo.

A primeira limitação do ensaio cometa pode ser solucionada com a realização de ensaios de citotoxicidade em paralelo aos ensaios de genotoxicidade (neste estudo realizamos, por exemplo, os ensaios de vermelho neutro e MTT), uma vez que segundo a OECD (2014), existe o aumento na migração de DNA na presença de evidências

claras de citotoxicidade. Por conta disso, o ensaio cometa pode ser útil em complementar os ensaios de citotoxicidade, uma vez que a ausência de migração do DNA e/ou dano genotóxico observada nos condrócitos testados pode ser alinhada com o baixo percentual de citotoxicidade das três amostras utilizadas.

A segunda limitação do ensaio cometa é associada à danos de curta duração na estrutura do DNA, mas esses danos podem ser perpetuados para outras gerações celulares durante a metáfase, sendo importante a combinação desse ensaio com o teste de micronúcleo.

Segundo Araldi *et al.* (2015), o teste de micronúcleo é um padrão ouro para a verificação de danos genotóxicos ou mutagênicos, por apresentarem alta sensibilidade, poder estatístico e versatilidade. O teste de micronúcleo demonstrou que todas as células estavam em estado proliferativo, uma vez que o IDN mais próximo de 1,0 indica células com menor atividade proliferativa e mais próximo de 2,0 indica maior atividade proliferativa (FENECH, 2000).

Diante disso, as células HeLa (IDN = 1,5) e a amostra C/CTM (IDN = 1,47) apresentaram potencial proliferativo semelhante, o que pode estar associado aos benefícios das CTM em estimular a atividade proliferativa e reparativa de condrócitos, como é observado nos estudos de Skowronski & Rutka (2013) e Goldberg *et al.* (2017). Já o poder proliferativo elevado das células HeLa se deve a sua característica cancerígena, conforme demonstrado por Macville *et al.* (1999) e Landry *et al.* (2013). A semelhança do IDN das amostras C/PTA e C/MC complementa o ensaio do cometa, demonstrando uma similaridade dos efeitos *in vitro* do PTA em relação a membrana comercial Chondro-Gide®.

O teste de micronúcleo mostrou baixa porcentagem de células com formação de micronúcleos, pontes citoplasmáticas e brotos nucleares nas amostras C/CTM, C/PTA,

C/MC e C (< 2%), principalmente quando comparado com a amostra HeLa (24,9%), que foi caracterizada como extremamente alterada. Estudos realizados por Sahu *et al.* (2014) Lepleux *et al.* (2019) demonstraram em condrócitos expostos a fatores indutores de genotoxicidade, que células alteradas apresentam entre 20% a 60% de micronúcleos, pontes citoplasmáticas e/ou brotos nucleares durante o teste de micronúcleo (como demonstrado pelas células HeLa), em contrapartida, os grupos controles tendem a apresentar micronúcleos em poucas células, concluindo sobre a importância de outros testes capazes de melhor elucidar os mecanismos por trás destas alterações.

A análise cromossômica por bandeamento GTG não identificou alterações nos cariótipos dos condrócitos analisados individualmente e co-cultivados com as condições de estudo. Segundo Sato *et al.* (2019) o bandeamento GTG é um indicador de instabilidade de células por meio da visualização de diversas alterações no cariótipo, sendo considerado uma técnica precisa para esse fim.

A comparação de células estáveis com células alteradas, como as da linhagem HeLa, é indicada por Barkholt *et al.* (2013) Kusakawa *et al.* (2015) devido à falta de controles positivos, enaltecendo a importância de linhagens imortalizadas nesse processo, conclusão corroborada em nossos achados, que observaram diferenças no cariótipo dos condrócitos com o das células HeLa.

Diante da ausência de danos citotóxicos e genotóxicos do PTA analisado, entende-se que de acordo com os critérios propostos pela RDC N° 338, a NBR ISO 10993:2009 e os documentos guias da ECVAM e OECD, o produto se mostra viável para ser utilizado em ensaios pré-clínicos e clínicos, se mostrando uma alternativa promissora no tratamento de lesões que afetam a cartilagem articular.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o PTA formado pelas CTM associadas à MAH não causa efeitos citotóxicos ou genotóxicos nos condrócitos derivados da cartilagem humana, de acordo com os testes realizados *in vitro*, seguindo as normativas nacionais e internacionais vigentes. Observamos também que a biocompatibilidade do PTA, no que se refere a toxicidade, se mostra semelhante a membrana comercial Chondro-Gide<sup>®</sup>, utilizada atualmente em tratamentos clínicos associados a lesões da cartilagem articular. Sendo assim as CTM associadas à MAH, no que diz respeito a citotoxicidade e a genotoxicidade, apresentam-se como uma excelente alternativa para utilização em terapias, particularmente no caso das lesões da cartilagem.

## 9. REFERÊNCIAS

ABAZARI, M. F. et al. Decellularized amniotic membrane scaffolds improve differentiation of iPSCs to functional hepatocyte-like cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 1169-1181, 2020.

ABBASI-MALATI, Z. et al. Mesenchymal stem cells on horizon: a new arsenal of therapeutic agents. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 14, n. 4, p. 484-499, 2018.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISSO 10993: Avaliação biológica de produtos para a saúde. **Norma Brasileira**, Rio de Janeiro, 2013.

AIGNER, T., & STÖVE, J. Collagens - major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1569-1593, 2003.

AKILBEKOVA, D.; SHAIMERDENOVA, M.; ADILOV, S., & BERILLO, D. Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 324-333, 2018.

ALVES, P. C. S. & SANT'ANNA, L. B. Potencial da membrana amniótica humana na odontologia. **Revista UNIVAP**, v. 22, n. 40, p. 87, 2016.

ANDRADE, M. G. S.; DE ALMEIDA REIS, S. R.; ROBINSON, W. M., & BORGES-OSÓRIO, M. R. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 48, p. 137-141, 2005.

AOKI, K. & SAITO, N. Biodegradable polymers as drug delivery systems for bone regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 95, 2020.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

ARSLAN, Y. E.; ARSLAN, T. S.; DERKUS, B.; EMREGUL, E., & EMREGUL, K. C. Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell-derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to regenerative medicine products. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 160-170, 2017.

ASADI, N.; DEL BAKHSHAYESH, A. R.; DAVARAN, S., & AKBARZADEH, A. Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Chemistry and Physics**, v. 242, p. 122528, 2020.

ATIENZAR, F. A. & JHA, A. N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 613, n. 2-3, p. 76-102, 2006.

BARKHOLT, L. et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints. **Cytotherapy**, v. 15, n. 7, p. 753-759, 2013.

BENTHIEN, J. P. & BEHRENS, P. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC). A one-step procedure for retropatellar articular resurfacing. **Acta Orthopædica Belgica**, v. 76, n. 2, p. 260, 2010.

BORGONOVO, T. et al. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 3, p. 202-207, 2014.

BOROS, K. & FREEMONT, T. Physiology of ageing of the musculoskeletal system. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 2, p. 203-217, 2017.

BRACHER, M. et al. Three-colour flow cytometric method to measure antibody-dependent tumour cell killing by cytotoxicity and phagocytosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 323, n. 2, p. 160-171, 2007.

BRIANEZI, G. et al. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BURLINSON, B. The in vitro and in vivo comet assays. **Genetic Toxicology**, p. 143-163, 2012.

CAPELLA, V.; RIVERO, R. E.; LIAUDAT, A. C.; IBARRA, L. E.; ROMA, D. A.; ALUSTIZA, F., & RODRIGUEZ, N. Cytotoxicity and bioadhesive properties of poly-N-isopropylacrylamide hydrogel. **Heliyon**, v. 5, n. 4, p. 14-74, 2019.

CARVALHO, A. T. et al. Apostila de Citometria de Fluxo. **FIOCRUZ**, v. 1, p. 1-111, 2010.

CHAHLA, J.; DEAN, C. S.; MOATSHE, G.; PASCUAL-GARRIDO, C.; SERRA CRUZ, R.; LAPRADE, R. F. Concentrated Bone Marrow Aspirate for the Treatment of Chondral Injuries and Osteoarthritis of the Knee. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2016.

CHETAN, G. K.; MANJUNATHA, K. R.; VENKATESH, H. N.; BALU, S.; VENKATASWAMY, E.; ROY, S.; GIRAMAJI, S. R. Genetic Analysis of Mental Retardation: The Genes and the Means. **JACAM**, v. 1, n. 2, p. 1-11, 2005.

CHOPRA, A. & THOMAS, B. S. Amniotic membrane: a novel material for regeneration and repair. **Journal of Biomimetics, Biomaterials & Tissue Engineering**, v. 18, n. 106, p. 2, 2013.

COLEMAN, B. R. et al. Manipulation and quantification of graphene oxide flake size: Photoluminescence and cytotoxicity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 34, p. 911-921, 2017.

COLLADO-GONZÁLEZ, M.; GARCÍA-BERNAL, D.; OÑATE-SÁNCHEZ, R. E.; ORTOLANI-SELTENERICH, P. S.; ÁLVAREZ-MURO, T.; LOZANO, A., & RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 50, p. 19-30, 2017.

CRONIN, U. P. & WILKINSON, M. G. The potential of flow cytometry in the study of *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1-16, 2010.

DA FONSECA, E. M. F. Opções de tratamento das lesões cartilagíneas focais do joelho. **Faculdade de Medicina da Universidade do Porto**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2011.

DA SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, p. 30-37, 2007.

DE SIMONE, Uliana et al. In vitro evaluation of magnetite nanoparticles in human mesenchymal stem cells: comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 30, n. 1, p. 48-59, 2020.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DORAZEHI, F.; NABIUNI, M.; JALALI, H. Potential use of amniotic membrane-derived scaffold for cerebrospinal fluid applications. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 7, n. 2, p. 91, 2018.

ECVAM, E. Protocol n ° 17: MTT Assay. **EURL ECVAM DB - ALM: PROTOCOL**, p. 1-5, 1990.

FENECH, M. & MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n. 1-2, p. 29-36, 1985.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FICKERT, S. et al. Biologic reconstruction of full sized cartilage defects of the hip: A guideline from the DGOU group" clinical tissue regeneration" and the hip committee of the AGA. **Zeitschrift fur Orthopadie und Unfallchirurgie**, v. 155, n. 6, p. 670-682, 2017.

FOTAKIS, G. & TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FRESHNEY, R. I. Cytotoxicity. **Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique**, p. 1-15, 2005.

FRONTERA, W. R. Physiologic changes of the musculoskeletal system with aging: a brief review. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics**, v. 28, n. 4, p. 705-711, 2017.

GLORIEUX, C. & CALDERON, P. B. Cancer cell sensitivity to redox-cycling quinones is influenced by NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 polymorphism. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 369, 2019.

GOBBI, A. et al. 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.

GOLDBERG, A. et al. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 12, n. 1, p. 1-30, 2017.

GOLSTEIN, P. & KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 23, p. 32-37, 2007.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GUPTA, I. et al. Placental tissues: fixing smiles. **International journal of innovation and scientific research**, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2014.

HAN, S. W.; CARVALHO, A. C. C.; SOUZA, C. F. Células-tronco: novas perspectivas terapêuticas em cardiologia. **Atheneu Editora**, p. 258, 2011.

HERMANS, I. F. et al. The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. **Journal of Immunological Methods**, v. 285, n. 1, p. 25-40, 2004.

HORWITZ, E. M. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v. 5, n. 3, p. 309-313, 1999.

HOWE, B.; UMRIGAR, A. & TSIEN, F. Chromosome preparation from cultured cells. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 83, p. 1-5, 2014.

HOY, D.; MARCH, L.; BROOKS, P.; BLYTH, F.; WOOLF, A.; BAIN, C.; BUCHBINDER, R. et al. The global burden of low back pain: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 6, p. 968-974, 2014.

HU, Q. et al. A cell apoptosis probe based on fluorogen with aggregation induced emission characteristics. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 8, p. 4875-4882, 2015.

INTERNATIONAL CARTILAGE REPAIR SOCIETY. The cartilage standard evaluation form/knee. **Newsletter**, v. 1, n. 1, p. 5-7, 1998.

ISLAM, R. et al. Properties and therapeutic potential of human amniotic membrane. **Asian Journal of Dermatology**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2015.

ISO, PNEN. 10993-3: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices - Part 3: Tests for Genotoxicity, Carcinogenicity and Reproductive Toxicity. **International Organization for Standardization, Geneva, 2009a.**

ISO, PNEN. 10993-5: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. **International Organization for Standardization, Geneva, 2009b.**

JAGETIA, G. C. et al. Isoquinoline alkaloid berberine exerts its antineoplastic activity by inducing molecular DNA damage in HeLa cells: A comet assay study. **Biology and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1, 2015.

JIANG, Z.; SHAN, K.; SONG, J.; LIU, J.; RAJENDRAN, S.; PUGAZHENDHI, A., & CHEN, B. Toxic effects of magnetic nanoparticles on normal cells and organs. **Life Sciences**, v. 220, p. 156-161, 2019.

KAISER, N. et al. Clinical results 10 years after AMIC in the knee. **Swiss Medical Weekly**, p. 43, 2015.

KAKABADZE, Z.; CHAKHUNASHVILI, D.; GOGILASHVILI, K.; EDIBERIDZE, K.; CHAKHUNASHVILI, K.; KALANDARISHVILI, K.; KARALASHVILI, L. Bone Marrow Stem Cell and Decellularized Human Amniotic Membrane for the Treatment of Nonhealing Wound After Radiation Therapy. **Experimental and Clinical Transplantation**, v. 17, n. 1, p. 92-98, 2019.

KARAMI, A. et al. Extraction and characterization of collagen with cost-effective method from human placenta for biomedical applications. **World Journal of Plastic Surgery**, v. 8, n. 3, p. 352, 2019.

KATHERIA, A. C. Umbilical cord milking: a review. **Frontiers in pediatrics**, v. 6, p. 335, 2018.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. **Cell stem cell**, v. 10, n. 6, p. 709-716, 2012.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KIESGEN, S. et al. Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity. **Nature Protocols**, p. 1-12, 2021.

KIM, J. et al. Cytogenetic heterogeneity and their serial dynamic changes during acquisition of cytogenetic aberrations in cultured mesenchymal stem cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 777, p. 60-68, 2015.

KIM, S. S.; SONG, C. K.; SHON, S. K.; LEE, K. Y.; KIM, C. H.; LEE, M. J.; WANG, L. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. **Cell and Tissue Research**, v. 336, n. 1, p. 59-66, 2009.

KIRKPATRICK, C. J.; BITTINGER, F.; WAGNER, M.; KÖHLER, H.; VAN KOOTEN, T. G.; KLEIN, C. L., & OTTO, M. Current trends in biocompatibility testing. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 212, n. 2, p. 75-84, 1998.

KÖGLER, G. et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 2, p. 123-135, 2004

KUNZ, R. I., SILVA, L. I., COSTA, J. R. G. D., SOARES, C. L. R., BERTOLINI, G. R. F., BRANCALHÃO, R. M. C., & RIBEIRO, L. D. F. C. Histomorphometric changes in the knee joint of Wistar rats after remobilization in a water environment. **Physiotherapy and Research**, v. 22, n. 3, p. 317-324, 2015.

KUPCZIK, F. et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells or microfractures associated to a collagen matrix for bilateral knee chondral lesions repair: a clinical comparative study. **Cytotherapy**, v. 23, n. 4, p. 18, 2021.

KUSAKAWA, S. et al. Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

LAMPONI, S.; LEONE, G., CONSUMI, M., NELLI, N., & MAGNANI, A. Porous multi-layered composite hydrogel as cell substrate for in vitro culture of chondrocytes. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, p. 1-10, 2020.

LANDRY, J. J. M. et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 3, n. 8, p. 1213-1224, 2013.

LEE, Y. H., CHENG, F. Y., CHIU, H. W., TSAI, J. C., FANG, C. Y., CHEN, C. W. E WANG, Y. J. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4706-4715, 2014.

LEPLEUX, C. et al. Bystander effectors of chondrosarcoma cells irradiated at different LET impair proliferation of chondrocytes. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 13, n. 3, p. 343-356, 2019.

LEWICKI, S.; LEŚNIAK, M.; MACHAJ, E. K.; ANTOS-BIELSKA, M.; TRAFNY, E. A.; KOCIK, J., & POJDA, Z. Physical properties and biological interactions of liposomes developed as a drug carrier in the field of regenerative medicine. **Journal of Liposome Research**, v. 27, n. 2, p. 90-98, 2017.

LONGARAY, M. P. Restauração da cartilagem hialina articular com uso de células-tronco mesenquimais, hidrogel de colágeno tipo II e condroblastos em lesão troclear do joelho. **Lume Repositório Digital**, v. 1, n. 1, p. 1-68, 2019.

LOPES, M. P. et al. Avaliação do dano ao DNA pelo ensaio cometa e análise dos pontos de variação dos genes CYP2E1, CYP1A1 e OGG1 em etilistas do município de Goiânia-GO. **Repositório UFG**, p. 1-84, 2018.

- LUPSKI, J. R. Cognitive phenotypes and genomic copy number variations. **JAMA**, v. 20, n. 313, p. 2029-2030, 2015.
- MACVILLE, M. et al. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 141-150, 1999.
- MALHEIROS, G. C. et al. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO CORDÃO UMBILICAL. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2016.
- MANCINI, D. & FONTANA, A. Five-year results of arthroscopic techniques for the treatment of acetabular chondral lesions in femoroacetabular impingement. **International Orthopaedics**, v. 38, n. 10, p. 2057-2064, 2014.
- MARQUES, C. F.; OLHERO, S.; ABRANTES, J. C. C.; MAROTE, A.; FERREIRA, S.; VIEIRA, S. I., & FERREIRA, J. M. Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine. **Ceramics International**, v. 43, n. 17, p. 15719-15728, 2017.
- MASSON, A. O.; NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Análise comparativa de diferentes métodos de citotoxicidade in vitro. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, Uberlândia, p. 2484-2488, 2014.
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006.
- MCGOWAN-JORDAN J. et al. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. **Karger Medical and Scientific Publishers**, 2016.
- MEHMOOD, A. et al. Vitamin E protects chondrocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in vitro. **Inflammation Research**, v. 62, n. 8, p. 781-789, 2013.
- MIGLIORINI, F. et al. Autologous chondrocyte implantation and mesenchymal stem cells for the treatments of chondral defects of the knee-A systematic review. **Current stem cell research & therapy**, v. 15, n. 6, p. 547-556, 2020.
- MINISTÉRIA DA SAÚDE, B. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 338, de 20 de fevereiro de 2020. **ANVISA**, p. 1-20, 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-338-de-20-de-fevereiro-de-2020-244803291>. Acesso em: mar, 2021.
- MOHAN, R. et al. Human amnion membrane: potential applications in oral and periodontal field. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 15, 2017.
- MURPHY, E. P. et al. Matrix-associated stem cell transplantation is successful in treating talar osteochondral lesions. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 27, n. 9, p. 2737-2743, 2019.

NAGAMURA-INOUE, T. & HE, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 195, 2014.

NIGJEH, S. E.; YEAP, S. K.; NORDIN, N.; KAMALIDEGHAN, B.; KY, H., & ROSLI, R. Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2018.

NILES, A. L.; MORAVEC, R. A.; RISS, T. L. In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. **Current Chemical Genomics**, v. 3, p. 33-41, 2009.

OECD, 2010. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests No. 129. **OECD Environment, Health and Safety Publications**, 2010.

OECD, 2014. Test No. 489: In vitro mammalian alkaline comet assay. **OECD Publishing**, p. 1-25, 2014.

OECD, 2016. Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. **OECD Publishing**, p. 1-29, 2016.

OSTLING, O & JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PALAZZO, R. P. et al. Dna damage and repair through the single-cell gel electrophoresis and cytokinesis-blocked micronucleus assays in individuals with ataxia-telangiectasia and their parents. **Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 31, 2011.

PANG, K. L.; CHOW, Y. Y.; LEONG, L. M.; LAW, J. X., GHAFAR, N. A.; SOELAIMAN, I. N., & CHIN, K. Y. Establishing SW1353 Chondrocytes as a Cellular Model of Chondrolysis. **Life**, v. 11, n. 4, p. 272, 2021.

PETERS, O. A. Research that matters—biocompatibility and cytotoxicity screening, **International Endodontic Journal**, v. 46, p. 195-197, 2013.

PINTUS, E. et al. Stem cells in osteochondral tissue engineering. **Osteochondral Tissue Engineering**, p. 359-372, 2018.

PIRES, C. W.; BOTTON, G.; CADONÁ, F. C.; MACHADO, A. K.; AZZOLIN, V. F.; DA CRUZ, I. B. M., & PRAETZEL, J. R. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 8, p. 737-745, 2016.

POZZOLINI, M.; SCARFÌ, S.; GALLUS, L.; CASTELLANO, M.; VICINI, S.; CORTESE, K., & GIOVINE, M. Production, characterization and biocompatibility evaluation of collagen membranes derived from marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 111, 2018.

PRZEKORA, A. The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for

tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v. 97, p. 1036-1051, 2019.

RAHMANI-KUKIA, N. et al. The effects of 17 Beta-Estradiol primed mesenchymal stem cells on the biology of co-cultured neutrophil. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 1-7, 2020.

RAMUTA, T. Ž. & KREFT, M. E. Human amniotic membrane and amniotic membrane-derived cells: how far are we from their use in regenerative and reconstructive urology? **Cell Transplantation**, v. 27, n. 1, p. 77-92, 2018.

REPETTO, G.; DEL PESO, A. & ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125, 2008.

RIORDAN, N. H. et al. Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2018.

RODRÍGUEZ, M. Á. R. et al. Análisis de genotoxicidad por presencia de arsénico en el suelo: prueba de micronucleos en extractos de tradescantia clone 4430 (trad- mcn). **Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA**, v. 17, n. 1, p. 56-63, 2019.

RYU, H. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- $\beta$  and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 352, n. 2, p. 220-227, 2014.

SACHLOS, E. et al. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells & Materials**, v. 5, n. 29, p. 39-40, 2003.

SADLIK, B. et al. All-arthroscopic autologous matrix-induced chondrogenesis-aided repair of a patellar cartilage defect using dry arthroscopy and a retraction system. **The Journal of Knee Surgery**, v. 30, n. 09, p. 925-929, 2017.

SAFIRI, S. et al. Prevalence, deaths and disability adjusted life years (DALYs) due to musculoskeletal disorders for 195 countries and territories 1990-2017. **Arthritis & Rheumatology**, 2020.

SAHU, S. C. et al. Comparative genotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells evaluated by fluorescent microscopy of cytochalasin B-blocked micronucleus formation. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 11, p. 1200-1208, 2014.

SATO, Y. et al. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider. **Cytotherapy**, v. 21, n. 11, p. 1095-1111, 2019.

SCHAITD, B.; BROFMAN, P. R. S.; SENEGAGLIA, A. C.; STIMAMIGLIO, M. A. et al. Análise da preservação da arquitetura tecidual da membrana amniótica humana descélularizada e sua biocompatibilidade com células-tronco mesenquimais para uso na medicina regenerativa. **Teses e Dissertação PPGCS**, 2019. Dados em processo de patente.

- SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. **Chemical Mutagens**, p. 31-53, 1976.
- SECUNDA, R. et al. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. **Cytotechnology**, v. 67, n. 5, p. 793-807, 2015.
- SHARMA, R. R. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. **Transfusion**, v. 54, n. 5, p. 1418-1437, 2014.
- SILINI, A. et al. Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2013.
- SILVA, S. A., NOGUEIRA, R. E. F. Q., TEIXEIRA, J. M. D. C., ALBUQUERQUE, J. S. V., & DUARTE, E. B. Citotoxicidade in vitro de nanopartículas de fosfato tricálcico- $\beta$  sintetizado via reação em estado sólido. **Matéria**, v. 24, n. 1, 2019.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SKOWROŃSKI, J. & RUTKA, M. Osteochondral lesions of the knee reconstructed with mesenchymal stem cells-results. **Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja**, v. 15, n. 3, p. 195-204, 2013.
- SLOCZYNSKA, K.; POWROZNIK, B.; PEKALA, E., & WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 2, p. 273-285, 2014.
- SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 4, p. 30, 2010.
- SUSS, P. H. et al. Direct intracardiac injection of umbilical cord-derived stromal cells and umbilical cord blood-derived endothelial cells for the treatment of ischemic cardiomyopathy. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 7, p. 969-978, 2015.
- TAGHDIRI NOOSHABADI, V.; VERDI, J.; EBRAHIMI-BAROUGH, S.; MOWLA, J.; ATLASI, M. A.; MAZOOCHI, T., & BANAFSHE, H. R. Endometrial mesenchymal stem cell-derived exosome promote endothelial cell angiogenesis in a dose dependent manner: a new perspective on regenerative medicine and cell-free therapy. **Archives of Neuroscience**, v. 6, n. 4, 2019.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H., & SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- UCCELLI, A.; MORETTA, L. & PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 10, p. 2566-2573, 2006.

- USUELLI, F. G. et al. All-arthroscopic autologous matrix-induced chondrogenesis for the treatment of osteochondral lesions of the talus. **Arthroscopy Techniques**, v. 4, n. 3, p. 255-259, 2015.
- VAN DE WATER, T. Historical aspects of gene therapy and stem cell therapy in the treatment of hearing and balance disorder. **The Anatomical Record**, 2020.
- VAN MEERLOO, J; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: **Cancer Cell Culture**, p. 237-245, 2011.
- VAN PHAM, P. et al. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 2, p. 289-302, 2016.
- VAZ, I. M. et al. Avaliação da integridade genômica por análise cromossômica em células-tronco pluripotentes induzidas. **Teses e Dissertação PPGCS**, 2018. Disponível em: <https://www.pucpr.br/escola-de-medicina/mestrado-e-doutorado/producao-academica/>. Acesso em: mar, 2021.
- VELOSA, A. P. P., TEODORO, W. R., & YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 3, p. 160-166, 2003.
- VILLELA, I. V. et al. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86, 2006.
- WARNKE, P. H. et al. Tissue engineering of periosteal cell membranes in vitro. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 8, p. 761-766, 2009.
- WHITWORTH, D. J. & BANKS, T. A. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 416-424, 2014.
- WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.
- WU, P. H. et al. Amniotic membrane and adipose-derived stem cell co-culture system enhances bone regeneration in a rat periodontal defect model. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 3, p. 186-194, 2016.
- YAMPOLSKY, M. et al. Modeling the variability of shapes of a human placenta. **Placenta**, v. 29, n. 9, p. 790-797, 2008.
- ZIMMERMANN, M. & MEYER, N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. **Mammalian Cell Viability**, v. 8, p. 57-63, 2011.

## 10. ANEXOS

Anexo A - Termo de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEP/PUCPR).



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Cultivo de células-tronco mesenquimais sobre matriz de membrana amniótica

**Pesquisador:** Alexandra Cristina Senegaglia

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 83139918.1.0000.0020

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.549.762

#### Apresentação do Projeto:

A lesão condral é um dos problemas mais comuns na ortopedia e reparar o problema é um dos maiores desafios das cirurgias ortopédicas. Os tratamentos mais comuns para tratar a lesão na cartilagem são a mosaicoplastia, microfratura e o transplante de condrócitos, sendo esta é definida como um tecido avascular, onde se encontram células distribuídas dispersamente em uma ampla matriz extracelular formada por água, colágeno do tipo II e proteoglicanos. A capacidade de regeneração do tecido cartilaginoso é bastante limitada por ser pouco vascularizado e pela baixa atividade mitótica dos condrócitos. Apesar de haver tratamentos para a doença, nenhum age de forma satisfatória e efetiva. Recentemente, as células-tronco mesenquimais têm sido sugeridas no tratamento para a recuperação da cartilagem. As CTMs são de fácil obtenção, isolamento e proliferação em cultivo, e podem induzir a proliferação de condrócitos, a síntese proteica da matriz celular e de colágeno tipo II por apresentarem este potencial de diferenciação em linhagens mesodérmica. Desta forma, a terapia celular propõe o restabelecimento funcional do tecido lesionado por meio do transplante autólogo, alogênico ou xenogênico de CTMs que tem se mostrado promissor nesta modalidade terapêutica. Associado a isso, o uso de matrizes biológicas sido empregada na medicina regenerativa. Na engenharia de tecidos, essas matrizes possuem a propriedade de biocompatibilidade, evitando assim uma reação inflamatória. A membrana amniótica humana apresenta propriedades de grande importância e interesse para formar uma estrutura de apoio em sua utilização na área da medicina regenerativa. Portanto, o uso da

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@pucpr.br



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/  
PR



Continuação do Parecer: 2.549.762

membrana amniótica apresenta diversas vantagens em aplicações clínicas e demonstra ser uma promissora candidata na engenharia de tecidos, sendo que já demonstrou resultados favoráveis do seu uso em um cultivo com CTMs na regeneração da cartilagem articular.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Realizar a avaliação estrutural e funcional da membrana amniótica descelularizada e posteriormente recelularizada com células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais, para posterior uso na recuperação da cartilagem articular.

##### Objetivo Secundário:

- Coletar a placenta humana e obter a membrana amniótica;
- Descelularizar a membrana amniótica;
- Comprovar a descelularização através de análises de DNA residual e análises morfológicas;
- Avaliar a integridade e ultraestrutura da membrana através de análises morfológicas;
- Coletar sangue de cordão umbilical humano para a realização de análises sorológicas;
- Coletar, isolar e expandir células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas do cordão umbilical humano;
- Recelularizar a membrana amniótica com as CTMs;
- Analisar a adesão, viabilidade e proliferação celular após o cultivo das CTMs sobre a membrana;
- Realizar as análises estatísticas pertinentes.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### Riscos:

Não haverá riscos ou desconforto para o bebê e as gestantes e o procedimento do parto não terá alterações. Vale ressaltar que o cordão umbilical e a placenta humana seriam descartados após a realização do parto.

##### Benefícios:

Este estudo não trará benefícios para as gestantes ou para os bebês e o procedimento do parto não terá alterações.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está objetivamente relatada, não havendo necessidade de mais esclarecimentos.

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@pucpr.br



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/  
PR



Continuação do Parecer: 2.549.762

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos necessários para a realização do projeto foram apresentados e estão de acordo com a Resolução CNS 466/2012.

**Recomendações:**

Recomenda-se ajustar o TCLE de forma a garantir sua adequação a Carta Circular no 51-SEI/2017-CONEP/SECNS/MS, com esclarecimentos adicionais sobre a redação do TCLE, o qual recomenda que: "O termo de consentimento é um documento que deve ser redigido no formato de convite. Não é adequado que o corpo do TCLE seja escrito como declaração, já que isto pode reduzir a autonomia do indivíduo... As sentenças devem ser redigidas com afirmações do pesquisador dirigidas ao participante de pesquisa. Exemplos: "será coletado um pouco de sangue da veia do seu braço (...)", "gostaríamos de pedir autorização para verificar o seu prontuário".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou ementas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

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



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/  
PR



Continuação do Parecer: 2.549.762

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1040126.pdf	02/02/2018 08:08:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/02/2018 08:06:05	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
Outros	Termo_concordancia_DepTocoginecologiaHC.pdf	31/01/2018 13:40:06	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
Outros	Anuencia_Maternidade_VictorFdoAmaraI.pdf	31/01/2018 13:38:16	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa.pdf	31/01/2018 13:36:15	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	31/01/2018 13:28:49	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 19 de Março de 2018

---

Assinado por:  
**NAIM AKEL FILHO**  
(Coordenador)

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@pucpr.br

## Anexo B - Termo de aceitação de apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



3539701074552324

### TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROPOSTA DE NATUREZA CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E/OU DE INOVAÇÃO

Processo: 443916/2018-7

Título do Projeto: Medicina Regenerativa: Isolamento, Cultivo e Expansão de Células-Tronco pelos Centro de Tecnologia Celular (CTC) da PUCPR; participante da Rede Nacional De Terapia Celular (RNTC)

Instituição de Vínculo: \*\*\*\*\*

CNPJ: \*\*\*\*\*

Instituição de Execução: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CNPJ: 76659820000313

Chamada: MEDICINA REGENERATIVA: ISOLAMENTO, CULTIVO E EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO PELOS CENTROS DE TECNOLOGIA CELULAR (CTC) DA REDE NACIONAL DE TERAPIA CELULAR (RNTC)

Eu, Paulo Roberto Slud Brofman, 167.864.759-49, declaro conhecer, concordar e atender integralmente às exigências N° CPF (ou PASSAPORTE, se estrangeiro) da Chamada acima especificada e às Condições Gerais para Apoio Financeiro que regem a concessão dos recursos especificados abaixo:

#### AUXÍLIO FINANCEIRO

Custeio: R\$ 409.652,62

Valor Global: R\$ 409.652,62

#### BOLSA DE LONGA DURAÇÃO

Modalidade: Desenvolvimento Tecnológico Industrial - DTI

Nível: C

Duração: 21 Meses

Quantidade: 1

Modalidade: Desenvolvimento Tecnológico Industrial - DTI

Nível: B

Duração: 24 Meses

Quantidade: 1

Tenho ciência:

a) de que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura deste Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente, acrescido dos dias necessários para que a vigência final seja no último dia do respectivo mês de término; e

b) das disposições legais e procedimentos para a adequada utilização de recursos financeiros e a correta prestação de contas (Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas).

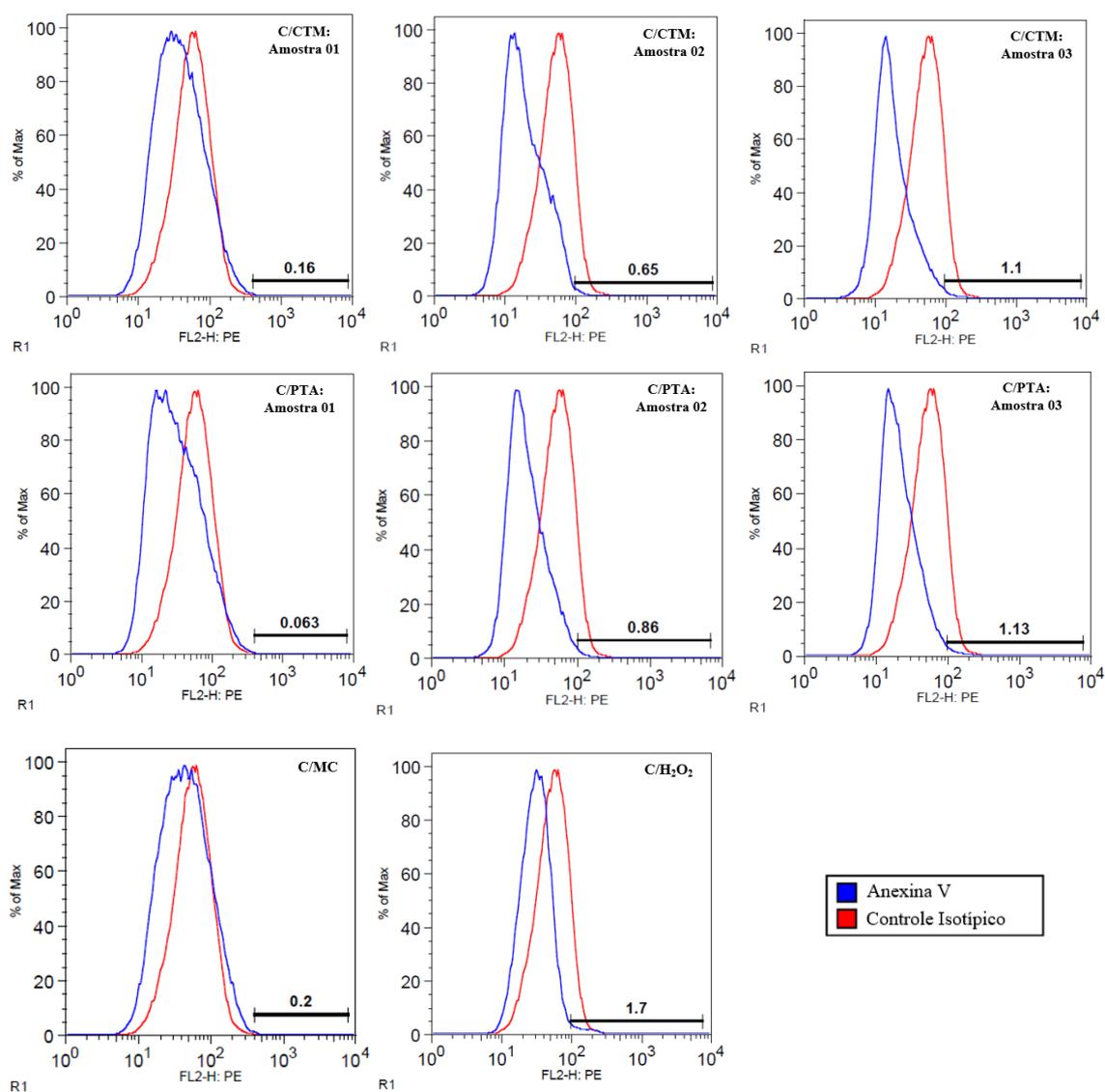
#### 1. DA CONCESSÃO:

1.1. Ao aceitar o apoio financeiro, o BENEFICIÁRIO declara formalmente:

a) dedicar-se às atividades pertinentes à proposta aprovada;

b) observar o disposto nas Leis nº 8.666/93 e nº 10.973/04, nos Decretos nº 93.872/86 e nº 5.563/05 e na Lei nº 8.112/90, no

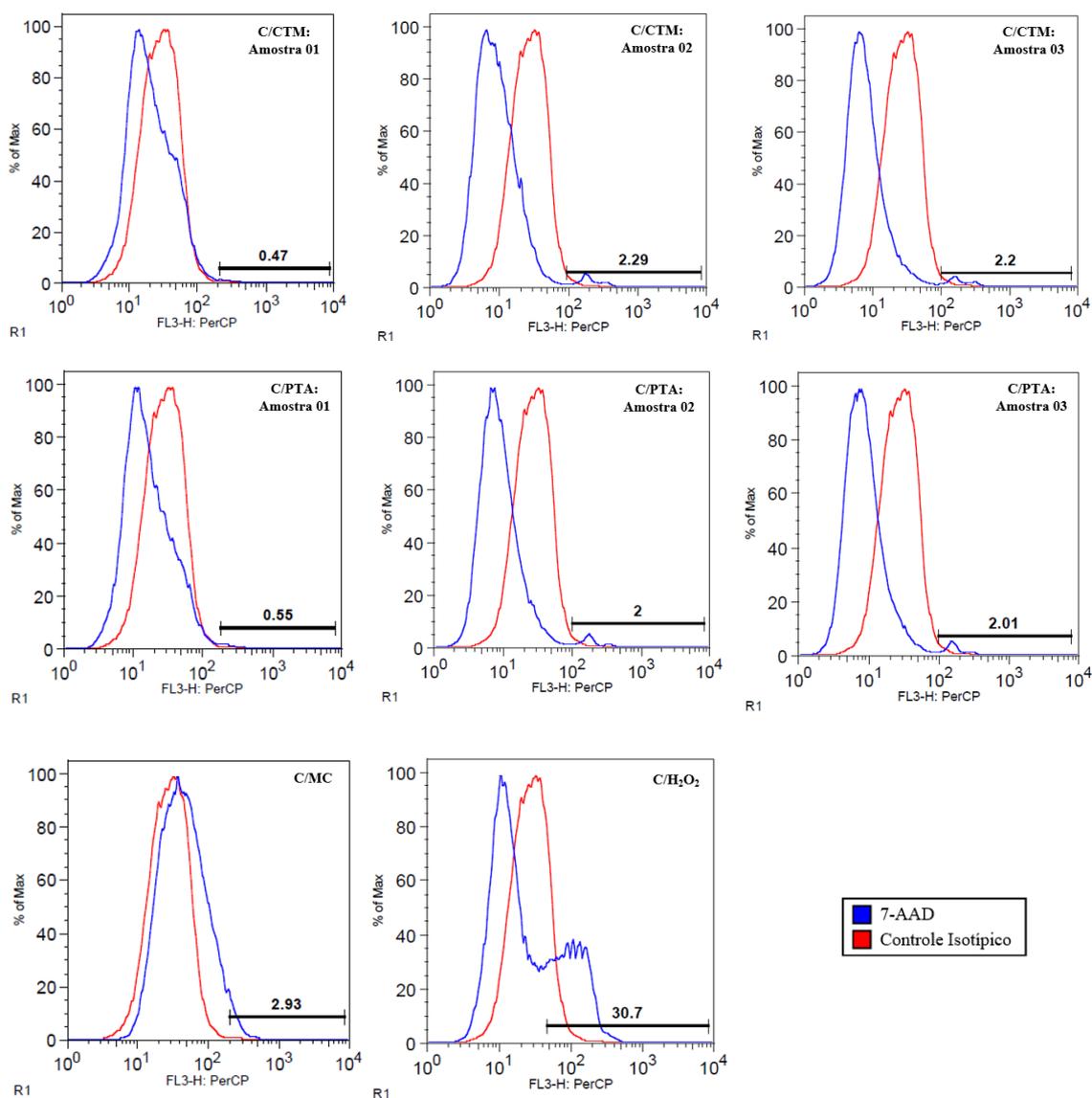
## Anexo C - Marcação das amostras com anexina V em relação ao grupo controle no ensaio de viabilidade e apoptose



Legenda: C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide<sup>®</sup> celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio.

Fonte: O autor (2021).

Anexo D - Marcação das amostras com o corante vital 7-AAD em relação ao grupo controle no ensaio de viabilidade e apoptose



Legenda: C/CTM: Condrócitos co-cultivados com células-tronco mesenquimais; C/PTA: Condrócitos co-cultivados com o produto de terapia avançada; C/MC: Condrócitos co-cultivados com a membrana comercial Chondro-Gide® celularizada com CTM; C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Condrócitos co-cultivados com o peróxido de hidrogênio; e C: condrócitos.

Fonte: O autor (2021).

## Anexo E – Submissão de artigo em revista científica

Artigo submetido para a revista “*The Knee*”, intitulado: *A Standard Protocol for the In Vitro Expansion of Human Chondrocytes: An Integrative Review for Use in Knee Cartilage Repair*.

**The Knee**  
**A STANDARD PROTOCOL FOR THE IN VITRO EXPANSION OF HUMAN CHONDROCYTES: AN INTEGRATIVE REVIEW FOR USE IN KNEE CARTILAGE REPAIR**  
--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Review Article
<b>Section/Category:</b>	Review
<b>Keywords:</b>	Cell therapy; Isolation; Cultivation; Characterization
<b>Corresponding Author:</b>	Alexandra Cristina Senegaglia BRAZIL
<b>First Author:</b>	Henrique Trigo de Castro Junior, MSc
<b>Order of Authors:</b>	Henrique Trigo de Castro Junior, MSc Lidiane Maria Boldrini-Leite, PhD Alexandra Cristina Senegaglia, PhD Fabiano Kupczik, PhD Paulo Roberto Slud Brofman, PhD
<b>Abstract:</b>	<p>Background: Cell therapy involves the transplantation of stem, progenitor and primary cells or genetically modified cells facilitating the repair of damaged tissue and organs. In orthopedics, the use of chondrocytes to treat articular cartilage lesions is present in clinical practice. However, there is no standardization of cell isolation, characterization, and cultivation. This study aims to conduct an integrative literature review of the methods most frequently used, aiming to develop a standardized protocol.</p> <p>Methods : Bardin's method was used to characterize in electronic spreadsheets the findings referring to the descriptors "Chondrocyte", "Chondrocyte isolation", "Chondrocyte cultivation" and "Chondrocyte characterization" on the ClinicalTrials, PubMed, and Scopus platforms. Based on the methodological parameters, the efficiency of the techniques found in the literature review.</p> <p>Results: The review identified few studies directly related to the theme proposed in this research. Even though it was possible to establish the proposed protocol. The knee cartilage was the area with the highest cells for isolation (31.4%) which we standardized in our study to 3 mm<sup>2</sup> biopsies, enzymatically dissociated with type II collagenase. In 30.8% of the studies, expression time was stated, with two weeks being standardized for cellular confluence at passage three. A protocol using flow cytometry to characterize cells before their use in therapy has also been established.</p> <p>Conclusion: The integrative literature review supported constructing a clear and objective protocol about the isolation, culture, and characterization of human chondrocytes, all set to be applied in laboratory routine to standardize and optimize the treatment of joint injuries.</p>

## Anexo F - Resumos publicados em revista científica

Resumo publicado no suplemento da revista “*Cytotherapy*”, intitulado: *An Integrative Review of the Advances in the Expansion of Human Chondrocytes for use in Knee Cartilage Repair*.



ScienceDirect



Download

### Cytotherapy

Volume 23, Issue 4, Supplement, April 2021, Pages 2-3

6

## AN INTEGRATIVE REVIEW OF THE ADVANCES IN THE EXPANSION OF HUMAN CHONDROCYTES FOR USE IN KNEE CARTILAGE REPAIR

HT Castro Junior <sup>1</sup>, AC Senegaglia <sup>1</sup>, PRS Brofman <sup>1</sup>, F. Kupczik <sup>2</sup>, LM Boldrini-Leite <sup>1</sup>

Show more ▾

☰ Outline | 🔗 Share 📄 Cite

<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.02.013>

[Get rights and content](#)

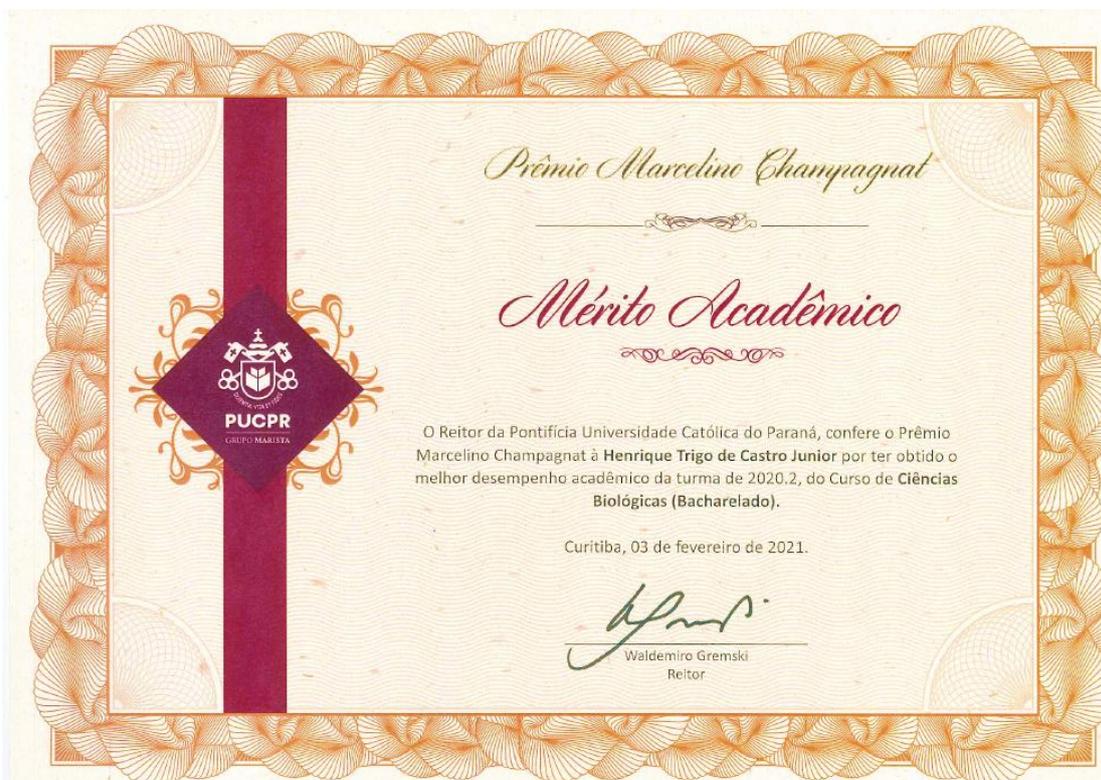
### Background

Cell therapy, which involves the transplantation of stem cells, progenitor cells, primary cells and/or genetically modified, may facilitate the repair of damaged tissue and organs. In orthopedics, the use of chondrocytes to treat articular cartilage lesions is already present in clinical practice. However, there is a demand for the standardization of cells isolation, characterization and expansion. The aim of this study was to conduct an integrative literature review about the methods used, purposing at the development of a standardized research laboratory protocol.

### Methods

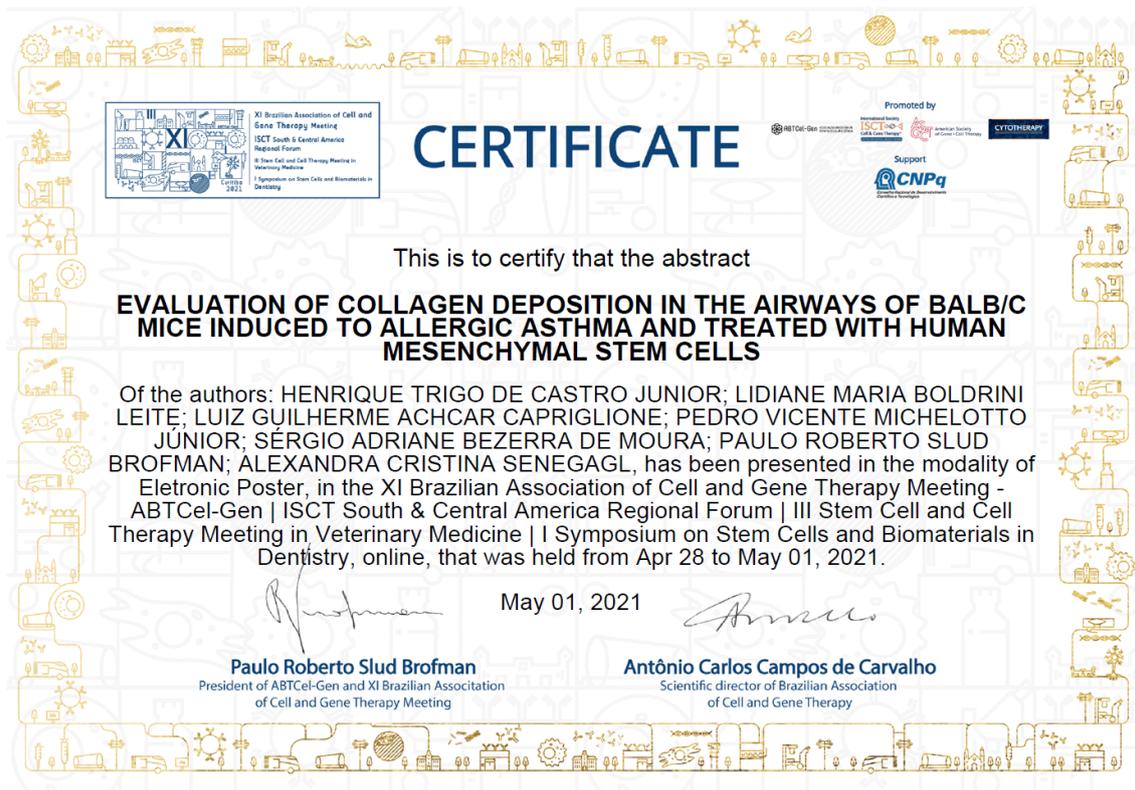
Bardin's method (2011) was used to characterize in electronic spreadsheets the findings referring to the descriptors “Chondrocyte”, “Chondrocyte isolation”, “Chondrocyte cultivation” and “Chondrocyte characterization” on the ClinicalTrials, PubMed and Scopus platforms. Based on the methodological parameters, the efficiency of the techniques found in the literature review, a new protocol was developed for the isolation, characterization and expansion of chondrocytes obtained from the knee cartilage.

Anexo G - Prêmio Marcelino Champagnat - Mérito Acadêmico



## Anexo H - Participação em eventos científicos

Certificado de apresentação de pôster eletrônico no *XI Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting – ABTCel-Gen | isct South & Central America Regional Forum | III Stem Cell and Cell Therapy Meeting in Veterinary Medicine | I Symposium on Stem Cells and Biomaterials in Dentistry.*



Certificado de apresentação de pôster eletrônico no *XI Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting – ABTCel-Gen | isct South & Central America Regional Forum | III Stem Cell and Cell Therapy Meeting in Veterinary Medicine | I Symposium on Stem Cells and Biomaterials in Dentistry.*

**CERTIFICATE**

promoted by

Support

This is to certify that the abstract

**AN INTEGRATIVE REVIEW OF THE ADVANCES IN THE EXPANSION OF HUMAN CONDROCYTES FOR USE IN KNEE CARTILAGE REPAIR**

Of the authors: HENRIQUE TRIGO DE CASTRO JUNIOR; ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA; PAULO ROBERTO SLUD BROFMAN; FABIANO KUPCZIK; LIDIANE MARIA BOLDRINI LEI, has been presented in the modality of Electronic Poster, in the XI Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting - ABTCel-Gen | ISCT South & Central America Regional Forum | III Stem Cell and Cell Therapy Meeting in Veterinary Medicine | I Symposium on Stem Cells and Biomaterials in Dentistry, online, that was held from Apr 28 to May 01, 2021.

May 01, 2021

**Paulo Roberto Slud Brofman**  
President of ABTCel-Gen and XI Brazilian Association of Cell and Gene Therapy Meeting

**Antônio Carlos Campos de Carvalho**  
Scientific director of Brazilian Association of Cell and Gene Therapy

Certificado de participação da *Abstract Evaluation Committee* durante o *XX Congress of Brazilian Society for Cell Biology*.



Congress of the Brazilian Society  
for Cell Biology

online  
January  
27th-29th  
2021

Organization  
**SBBC**  
Sociedade Brasileira  
de Biologia Celular



## CERTIFICATE

We certify that

**Henrique Trigo de Castro Junior**

participated as **Abstract Evaluation Committee** for the  
XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology held online,  
between January 27th and 29th, 2021.

Patricia Gama  
SBBC PRESIDENT

Marimélia Porcionatto  
CO-CHAIR OF THE SBBC CONGRESS