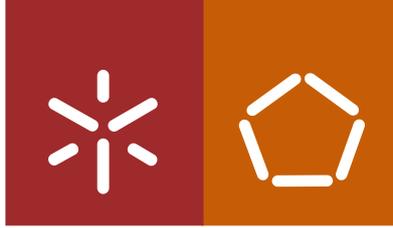


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Isabel Sofia Melo Pereira

**Estudos preliminares da bioatividade
de hidrolisados de matriz extracelular**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Isabel Sofia Melo Pereira

Estudos preliminares da bioatividade de hidrolisados de matriz extracelular

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Susana Margarida Gomes Moreira
e co-orientação do
Professor Doutor Francisco Miguel Portela da Gama

Outubro de 2012

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO.

Universidade do Minho, __/__/____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

*"Where shall I begin, please your Majesty?" he asked. "Begin at the beginning" the King said, gravely,
"and go on till you come to the end: then stop."*

Alice's Adventures in Wonderland, Lewis Carroll

No mundo da investigação, muitas vezes, o início deixa de ser início e passa a ser o travão de arranque..., o desenvolvimento do trabalho... Como o hei-de ultrapassar e prosseguir!? Sozinha não será certamente!

Neste sentido, termino o meu ano de dissertação sem coragem para dizer consegui mas antes, CONSEGUIMOS. É um conseguimos, porque foram muitas as pessoas que me ajudaram, me deram suporte emocional e contribuíram de forma direta ou indireta para o progresso, não só do trabalho descrito em seguida, mas também para o meu crescimento enquanto futura investigadora e como pessoa. Assim, expresso aqui o meu reconhecimento e gratidão a todos eles.

À minha orientadora, Susana, pela imensa confiança depositada, amizade, incentivo e paciência e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Miguel Gama, pela confiança, incentivo, prontidão e disponibilidade.

A todos os colegas do FUNCARB, Ana Cristina, Sara, Jorge, Dina, Alexandre, Paula, Sílvia, João, Joana, Sofia, João Pedro, Vera e Catarina (penso que não me esqueci de ninguém!) pela vossa paciência e disposição para me ajudarem em qualquer situação.

E claro que não podia faltar um agradecimento do fundo do coração a todos os meus grandes amigos (fora e dentro da universidade), especialmente aos meus amigos de longa data e aos meus companheiros de mestrado e simpatizantes. Foram vocês que me deram maior suporte emocional, força e bons momentos! Independentemente do caminho que cada um siga futuramente, ficarão sempre no meu coração!

Por fim, e não menos importante, a toda a minha família, pela compreensão e apoio incondicional, por acreditarem em mim e por respeitarem as minhas decisões.

A todos, um grande e sincero OBRIGADO!

RESUMO

A medicina regenerativa e a engenharia de tecidos têm como objetivo promover a regeneração de tecidos ou substituir os órgãos não funcionais, através da combinação de um *scaffold*, células adequadas e moléculas bioativas. Os *scaffolds* de matriz extracelular descelularizada (MEC) têm sido utilizados com sucesso em aplicações da medicina regenerativa para facilitar e promover a remodelação construtiva de inúmeros tecidos. Os mecanismos pelos quais a remodelação do tecido hospedeiro é conseguida ainda não são totalmente compreendidos, mas estudos recentes sugerem que alguns produtos de degradação da MEC (matricinas) desempenham papéis fundamentais. O presente estudo teve como objetivos obter diferentes frações de matricinas da matriz da bexiga de porco (UBM), através da digestão enzimática com pepsina e fracionamento por centrifugação e ultrafiltração, e avaliar e comparar a atividade quimiotática e mitogénica das diferentes frações de UBM em células estaminais mesenquimais de rato (MSCr) e em fibroblastos. Foi ainda testada a biocompatibilidade e o potencial osteogénico *in vivo* dos produtos de degradação da UBM incorporados num hidrogel de dextrino na reparação de pequenos defeitos ósseos. Neste trabalho foi analisada a bioatividade de três frações de UBM. Os resultados de proliferação obtidos com os fibroblastos mostraram que a fração de produtos totais da degradação de UBM inibe a proliferação celular. As frações de péptidos solúveis e com peso molecular inferior a 30 KDa não afetam o crescimento dos fibroblastos. Em relação às MSCr, os resultados da atividade proliferativa, embora preliminares, não confirmam o efeito pró-mitogénico dos produtos de degradação sobre estas células estaminais: a fração solúvel de UBM inibe a proliferação das MSCr, enquanto a fração de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa não afeta o crescimento destas células. Os resultados obtidos para a atividade quimiotática das frações de UBM, não foram conclusivos, uma vez que é necessário otimizar as condições do ensaio de migração. As diferenças no efeito mitogénico verificadas entre as distintas frações de UBM sugerem que, no final da digestão, o hidrolisado poderá conter matricinas pró- e anti-mitogénicas e até matricinas neutras. Assim, do fracionamento do hidrolisado podem resultar frações mais enriquecidas com um determinado tipo de matricinas (por exemplo, matricinas anti-mitogénicas) ou então, a sobreposição de um dos efeitos pode dever-se não à quantidade de matricinas que exibam esse efeito, mas sim à potência do efeito dessas matricinas e eventuais efeitos sinérgicos. Nas frações em que não se verificou qualquer propriedade mitogénica, a coexistência de matricinas com ação pró- e anti-mitogénica pode levar a uma anulação mútua desse efeito e/ou haver matricinas que não modulam a mitogénese das células usadas.

Os resultados *in vivo*, embora preliminares, mostraram que o dextrino com UBM incorporada não provocou reação inflamatória e os produtos de degradação incorporados pareceram afetar o comportamento das células no hidrogel, dado que se observou uma organização celular semelhante a células de cartilagem. A formação de uma estrutura semelhante à cartilagem sugere que a formação óssea poderá ocorrer via endocondral.

ABSTRACT

The regenerative medicine and tissue engineering aim at promoting the regeneration of tissues and the replacement of failing or malfunctioning organs by means of combining a scaffold, cells and bioactive molecules. Scaffolds composed of decellularized extracellular matrix (ECM) have been used successfully in numerous regenerative medicine applications to facilitate and promote the constructive remodeling of several tissues. The mechanisms by which the host remodeling response occurs are not fully understood, but recent studies suggest that some degradation products of ECM (matrikines) play key roles. The present study aimed to obtain different matrikines fractions by enzymatic digestion of porcine urinary bladder matrix (UBM) using pepsin, their fractionation by centrifugation and ultrafiltration, and to evaluate and compare chemotactic and mitogenic activities of the different fractions in rat mesenchymal stem cells (MSCr) and fibroblasts. Biocompatibility and osteogenic potential of degradation products incorporated into a dextrin hydrogel was also tested *in vivo* in the repair of small bone defects. The bioactivity of the three UBM fractions was analyzed. Results of fibroblasts proliferation showed that the fraction of total products resulted from degradation of UBM inhibited cell proliferation. The soluble fraction of UBM and the fraction of peptides with a molecular weight less than 30 kDa did not affect the growth of fibroblasts. Regarding MSCr, the results of the proliferative activity, although preliminary, did not confirm pro-mitogenic effect of degradation products on these stem cells: the soluble fraction of UBM inhibits MSCr proliferation, while the fraction of peptides with molecular weight less than 30 kDa did not affect the growth of these cells. The results obtained for chemotactic activity using UBM fractions were not conclusive, since the conditions for migration assay need further optimization. Differences between mitogenic effect observed on the distinct UBM fractions suggest that, at the end of the digestion, the hydrolyzate may contain matrikines with pro- and anti-mitogenic or neutral effect. Thus, after fractionating the hydrolyzate, fractions containing greater amount of a particular type of matrikines (for example, anti-mitogenic matrikines) may be obtained, or one of the effects overlap each other due not to the amount of matrikines with specific effect, but due to the potency of such matrikines and/or synergetic effects. In the fractions in which mitogenic activity was not observed, the coexistence of matrikines with pro- and anti-mitogenic actions can lead to mutual annulment of mitogenic proprieties and/or it is possible that there are matrikines which not modulate mitogenesis on this cells. *In vivo* results, although preliminary, shown that dextrin with total UBM products embedded caused no inflammatory reaction and these degradation products seems to affect cell behavior in the hydrogel since it was observed cellular organization similar to cartilage cells. The formation of a structure like cartilage suggests that bone formation may occur via endochondral process.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Medicina regenerativa e engenharia de tecidos.....	3
1.1.1 <i>Scaffolds</i> usados em engenharia de tecidos e medicina regenerativa: biomateriais e biofuncionalização	5
1.1.1.1 Hidrogéis em engenharia de tecidos: dextrino	7
1.1.2 Células usadas em engenharia de tecidos e medicina regenerativa.....	8
1.1.3 <i>Homing</i> de células estaminais e regeneração <i>in situ</i>	10
1.2 <i>Scaffolds</i> de matriz extracelular.....	12
1.2.1. Produtos de degradação dos <i>scaffolds</i> de matriz extracelular	14
1.3 Regiões bioativas da matriz extracelular.....	17
1.3.1 Matricinas: conceito, bioatividade e aplicações	18
1.4 Objetivos do trabalho.....	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 Reagentes	23
2.2 Preparação dos produtos da degradação da matriz extracelular.....	23
2.2.1 Extração da matriz extracelular da bexiga de porco	23
2.2.2 Hidrólise enzimática da matriz extracelular.....	23
2.3 Fracionamento do hidrolisado.....	24
2.4 Caracterização das frações de UBM obtidas na hidrólise com pepsina.....	24
2.4.1 Quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados.....	24
2.4.2 Análise proteica das frações de UBM por eletroforese em condições desnaturantes	25
2.4.2.1 Análise das amostras por SDS-PAGE	26
2.4.2.2 Análise das amostras por Tricina-SDS-PAGE	26
2.4.2.3 Coloração pelo método de azul de <i>Comassie</i>	27
2.4.2.4 Coloração pelo método de nitrato de prata	27
2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade das frações de UBM hidrolisada	27
2.5.1 Extração de células mesenquimais de medula óssea de rato.....	28
2.5.2 Cultura de células	28

2.5.3 Ensaio de proliferação celular	28
2.5.4 Ensaio de migração celular	29
2.6 Avaliação da capacidade de regeneração óssea dos produtos de degradação de UBM incorporados num hidrogel de dextrino.....	30
2.6.1 Preparação do hidrogel de dextrino com produtos de degradação de UBM incorporados.....	30
2.6.2 Ensaios <i>in vivo</i>	31
2.6.3 Análise histológica.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 Caracterização das frações dos produtos de degradação da matriz extracelular	35
3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade das frações de UBM hidrolisada	38
3.2.2 Avaliação da atividade mitogénica das frações de UBM.....	38
3.2.3 Avaliação da atividade quimiotática das frações de UBM.....	44
3.3 Avaliação da capacidade de regeneração óssea dos produtos de degradação da UBM incorporados num hidrogel de dextrino em mamíferos adultos.....	45
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	49
5. BIBLIOGRAFIA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estratégias usadas na engenharia de tecidos para aplicação na medicina regenerativa. Existem diferentes estratégias para a regeneração de tecidos: regeneração <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> dos tecidos vivos. Ambos os métodos utilizam um <i>scaffold</i> poroso com células incorporadas. Os <i>scaffolds</i> também podem ser funcionalizados com diferentes moléculas para melhorar as funções celulares. Componentes, tais como, fármacos, genes, proteínas ou péptidos adesivos, podem ser incorporados em nanopartículas e posteriormente libertados de forma controlada (adaptado de Engel <i>et al.</i> , 2007).	5
Figura 1.2: Representação esquemática da estrutura molecular do dextrino (adaptado de Hreczuk-Hirst <i>et al.</i> , 2001).....	8
Figura 1.3: Esquema representativo da estratégia de “auto-cura” através do <i>homing</i> de células estaminais endógenas em resposta a lesões. Existem dois modos principais de <i>homing</i> de células estaminais endógenas: no primeiro, as células estaminais estão presentes na corrente sanguínea e são capazes de reconhecer e interagir com as células endoteliais de um local alvo específico. Este processo é regulado por uma série de sinais bioquímicos. O segundo é conhecido por migração intersticial ou movimento amebóide ativo e dita que as células reconheçam e obedecem a sinais extravasculares (adaptado de Chen <i>et al.</i> , 2011).	11
Figura 1.4: Etapas de processamento para a obtenção das várias formas de <i>scaffolds</i> de matriz extracelular descelularizada. A folha hidratada pode ser utilizada diretamente como <i>scaffold</i> . Várias folhas hidratadas podem originar um <i>scaffold</i> multilaminado. As folhas hidratadas também podem ser liofilizadas e estas, por sua vez, podem ser cominuídas para obter uma forma particulada do material. O material triturado pode ser digerido enzimaticamente para liquefazer o material, que pode ser gelificado, misturado com um polímero sintético para fazer um <i>scaffold</i> híbrido ou reticulado para retardar a degradação do <i>scaffold</i> (adaptado de Badylak <i>et al.</i> , 2009 e Kim <i>et al.</i> , 2005).	13
Figura 2.1: Esquema representativo do processo de obtenção da matriz extracelular descelularizada da lâmina própria e do urotélio da bexiga de porco: (A) e (B) Extração mecânica da lâmina própria e do urotélio da bexiga de porco, (C) UBM descelularizada antes de ser liofilizada.....	24
Figura 2.2: Componentes e montagem da câmara de Neuro Probe AP48, usada nos ensaios de migração celular.....	30
Figura 3.1: Aspetto final da UBM após o corte em pequenos pedaços.....	36

Figura 3.2: Análise, por eletroforese em condições desnaturantes, dos produtos de degradação da matriz extracelular da bexiga de porco (UBM) com pepsina, bem como das frações obtidas por centrifugação e ultrafiltração do hidrolisado inicial. **M** representa o marcador de pesos moleculares (*Bio-Rad*). Géis de SDS-PAGE 10% (p/v) de poliacrilamida corados com azul de *Coomassie*: **(A)** O retângulo indica a banda correspondente à pepsina; **(B)** Representa o perfil proteico da UBM no final da digestão, na ausência de pepsina (controlo negativo) e **(C)** Representa o perfil proteico da fração de péptidos superior a 30 KDa, após a segunda lavagem do retentado. **(D)** Gel de Tricina-SDS-PAGE 16,5% (p/v) de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.37

Figura 3.3: Efeito de diferentes concentrações de fração de UBM Total **(A)** e da fração contendo péptidos com pesos moleculares inferior a 30 KDa **(B)** na proliferação dos Fibroblastos 3T3, em meio contendo 10% de CALF. A proliferação foi medida pelo ensaio de MTT, ao longo de 72 h. Os valores encontram-se expressos em média \pm desvio padrão e a linha tracejada corresponde ao controlo.39

Figura 3.4: Efeito das diferentes concentrações da fração solúvel na proliferação dos Fibroblastos 3T3, em meio contendo 2% de CALF **(A)** e 10% de CALF **(B)**. A proliferação foi medida pelo ensaio de MTT, ao longo de 72 h. Os valores encontram-se expressos em média \pm desvio padrão e a linha tracejada corresponde ao controlo.40

Figura 3.5: Efeito de diferentes concentrações de fração solúvel **(A)** e de fração inferior a 30 KDa **(B)** na proliferação das MSCr, em meio contendo 10% de FBS. A proliferação foi medida pelo ensaio de MTT, ao longo de 72 h. Os valores encontram-se expressos em média \pm desvio padrão e a linha tracejada corresponde ao controlo.42

Figura 3.6: Imagens histológicas do local de impante do hidrogel coradas com *Masson's trichrome*. Foram criados pequenos defeitos ósseos na tibia de coelhos machos *New Zealand*, e o local do defeito foi preenchido com oDex ou oDex-UBM. Os animais foram sacrificados três semanas depois do implante. Na ampliação de 40x é possível distinguir uma melhor organização celular do tecido, na presença do Odex-UBM, cujas células parecem-se com as células de cartilagem.47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Propriedades essenciais dos <i>scaffolds</i> para a medicina regenerativa.....	6
Tabela 1.2: Lista parcial de <i>scaffolds</i> de matriz extracelular descelularizada comercialmente disponíveis (adaptado de Badylak, 2007).....	14
Tabela 1.3: Efeitos biológicos dos produtos de degradação da matriz extracelular em células progenitoras/estaminais e em bactérias.	16
Tabela 1.4: Matricinas e sítios metacrípticos de alguns componentes da matriz extracelular e respetivas funções conhecidas.....	19
Tabela 2.1: Volumes a adicionar para a preparação de géis.....	26
Tabela 2.2: Volumes a adicionar para a preparação de géis.....	27
Tabela 3.1: Massas obtidas em cada fração, após o fracionamento do hidrolisado inicial.....	36
Tabela 3.2: Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados nas diversas frações de UBM obtidas. Os resultados encontram-se expressos em média \pm desvio padrão.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

A

ADH	Dihidrazida de ácido adípico
ANOVA	Do inglês <i>one-way analysis of variance</i>
APS	Persulfato de amônio
ASCs	Células estaminais adultas

B

b-FGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
-------	---

C

CALF	Do inglês <i>newborn calf serum</i>
------	-------------------------------------

D

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dH ₂ O	Água destilada
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's media</i>
DMEM-LG	Do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's media low glicose</i>

E

EGF	Fator de crescimento epidermal
ESCs	Células estaminais embrionárias

F

FBS	Do inglês <i>fetal bovine serum</i>
FDA	Do inglês <i>Food and drug administration</i>

G

GAG-S	Glicosaminoglicanos sulfatados
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos

H

HCl	Ácido clorídrico
HEKn	Células progenitoras dos queratinócitos
HMVECs	Células endoteliais microvasculares humanas

I

iPSCs	Células estaminais pluripotentes induzidas
-------	--

K

KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
-----	--

M

MEC	Matriz extracelular
MLPCs	Células progenitoras de multilinhagens

MMPs	Metaloproteases da matriz
MSCs	Células estaminais mesenquimais
MSCr	Células mesenquimais de rato
MTT	Do inglês <i>3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide</i>
MWCO	Do inglês <i>molecular weight cut-off</i>

N

Na ₂ EDTA	Do inglês <i>disodium ethylenediaminetetraacetic acid</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

O

oDex	Dextrino oxidado com periodato de sódio
------	---

P

PBS	Do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas-BB
PE	Penicilina e estreptomicina
PGA	Ácido poliglicólico
PHSRN	Prolina-Histidina-Serina-Arginina-Asparagina
PLA	Ácido polilático
PLGA	Ácido poli(lático-co-glicólico)

R

RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
-----	----------------------------

S

SDS-PAGE	Do inglês <i>sodium dodecyl sulphate polyacryamide gel electroforesis</i>
SIS	Submucosa do intestino delgado

T

TEMED	N, N, N',N'-tetrametiletenodiamina
TGF-β	Fator de crescimento de transformação beta

U

UBM	Matriz da bexiga urinária
-----	---------------------------

V

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
------	--



1. INTRODUÇÃO



1.1 Medicina regenerativa e engenharia de tecidos

Um traumatismo num tecido inicia uma série de eventos que visa a restauração da integridade do tecido e da homeostasia (Eming *et al.*, 2009; Palatinus *et al.*, 2010). Tal pode ser conseguido através da regeneração ou cicatrização.

A regeneração é o processo pelo qual os tecidos lesados são restaurados para a sua estrutura e função original. Alguns vertebrados, como é o caso de anfíbios e peixes são excecionais na sua capacidade de regenerar tecidos e órgãos anatomicamente completos e totalmente funcionais, mesmo na idade adulta. Em particular, os tritões e as salamandras podem regenerar um conjunto diversificado de órgãos e tecidos. A análise da regeneração dos membros destes animais recebeu maior atenção, e muitos progressos têm sido feitos para entender melhor a sua base molecular. Nestes anfíbios, a regeneração envolve a desdiferenciação de células no local da amputação, seguindo-se da sua proliferação para produzir um blastema, responsável por regenerar o novo membro (Brockes & Kumar, 2008). A excelente capacidade de regeneração pode estar relacionado com o facto de a resposta regenerativa apenas induzir um processo inflamatório mínimo nestas espécies (Eming *et al.*, 2009).

No caso dos mamíferos, o processo de regeneração apenas ocorre durante o desenvolvimento fetal no útero, dado que nos mamíferos adultos, a resposta para a cura na maioria dos tecidos termina com a formação de uma cicatriz. A reparação por cicatrização caracteriza-se por uma resposta inflamatória mais acentuada e pelo recrutamento e proliferação de fibroblastos para o local lesado, que são os principais responsáveis pela formação do tecido de granulação, que mais tarde dará origem ao tecido cicatricial (Midwood *et al.*, 2004; Metcalfe & Ferguson, 2007; Eming *et al.*, 2009; Palatinus *et al.*, 2010).

A reparação por cicatrização não ocorre com o mesmo grau em todos os tecidos, devido às diferenças nas propriedades intrínsecas dos tipos de células envolvidas, da matriz extracelular (MEC), das citocinas e do stress mecânico existente à volta da ferida. Genericamente, os tecidos menos diferenciados e mitoticamente mais ativos apresentam menor grau de cicatrização e de fibrose, preservando melhor a sua estrutura comparativamente com os tecidos altamente diferenciados (Metcalfe & Ferguson, 2007; Palatinus *et al.*, 2010). Este é certamente o caso das células do intestino, do fígado e da medula óssea, onde o *turnover* celular, em condições normais, é relativamente rápido (Palatinus *et al.*, 2010) (Agrawal *et al.*, 2010). Por outro lado, lesões em órgãos mitoticamente menos ativos, como o coração, resultam numa fibrose (cicatrização excessiva) com o mínimo de regeneração (Palatinus *et al.*, 2010). Embora a cicatrização contribua para o restauro da ferida e ofereça um suporte estrutural e funcional parcial, o resultado final da formação da cicatriz pode, em muitos casos, ser mais pernicioso do que a lesão inicial (Metcalfe & Ferguson, 2007; Palatinus *et al.*, 2010). Isto é especialmente verdade no caso do coração, que é sensível às heterogeneidades elétricas e às propriedades mecânicas alteradas produzidas pela cicatrização, podendo levar à disfunção do órgão, e conseqüente morte do paciente (Palatinus *et al.*, 2010). A estratégia tradicional nos casos em que os

1. INTRODUÇÃO

Órgãos deixam de ser funcionais consiste no transplante de órgãos. Contudo, a escassez de órgãos disponíveis para doação, o risco de rejeição e a morbidade associada a um regime de terapia imunossupressora para o resto da vida impulsionou a procura de estratégias melhores e mais eficazes (Badylak *et al.*, 2011). Além disso, a dificuldade em curar/tratar doenças fibróticas e feridas crônicas (por exemplo, úlceras de pele associadas à diabetes) também representam grandes problemas clínicos e sócio-econômicos e aguardam igualmente por terapias inovadoras (Midwood *et al.*, 2004; Eming *et al.*, 2009; Palatinus *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de estratégias inovadoras e eficientes para melhorar a reparação e regeneração de tecidos e órgãos é, portanto, uma tarefa importante. Neste cenário, nas últimas décadas tem-se assistido à emergência da medicina regenerativa, que visa a criação de tecidos funcionais para reparar ou substituir a função de tecidos ou órgãos que entretanto perderam a sua função devido à idade, doença, lesões ou defeitos congênitos. Esta área mantém a promessa de regeneração de tecidos e órgãos danificados no corpo, através da estimulação da cura endógena. A medicina regenerativa também pressupõe o crescimento de tecidos e órgãos em laboratório e a sua implantação com segurança no organismo (Maienschein, 2011). O alcance dos objetivos da medicina regenerativa, em última análise, requer a contribuição de inúmeras áreas, incluindo a engenharia de tecidos, a terapia celular (utilizando, por exemplo, as células estaminais) e a terapia molecular (por exemplo: entrega de genes e de fármacos, clonagem terapêutica) (Atala, 2007; Polak, 2009; Kim *et al.*, 2011). De entre estas áreas, a engenharia de tecidos tem recebido uma atenção considerável, apresentando-se como uma ferramenta fundamental nas estratégias da medicina regenerativa (Atala, 2007; Kim *et al.*, 2011).

A engenharia de tecidos é descrita como uma área interdisciplinar que aplica os princípios da biologia e da engenharia no desenvolvimento de substitutos biológicos funcionais que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um tecido. Para tal, a engenharia de tecidos procura compreender os processos envolvidos na formação e regeneração de tecidos sob uma perspectiva integrativa que envolve investigadores dos vários ramos do conhecimento (Salgado *et al.*, 2004).

Os elementos básicos para a engenharia de tecidos são células, moléculas de sinalização e *scaffolds* especialmente concebidos (Kim *et al.*, 2011). Estes três elementos podem ser combinados, para criar estruturas semelhantes aos tecidos; no entanto, a sua combinação pode ter de ser alterada de acordo com diversas variáveis, tais como: a idade do paciente, sexo, saúde, condições sistémicas, hábitos e forma anatómica do implante. Além disso, a mesma estratégia deve também ser adaptada ao local onde será aplicada, porque as diferentes regiões do corpo têm diferentes propriedades/funções e graus de vascularização (Salgado *et al.*, 2004).

A engenharia de tecidos possui duas estratégias principais a aplicar na medicina regenerativa (**Figura 1.1**). Na primeira estratégia, as células estaminais são recolhidas do paciente, expandidas *in vitro* e semeadas em *scaffolds* tridimensionais (3D) dentro de um reator. A construção híbrida resultante é depois implantada no paciente (juntamente com fatores de crescimento) como uma matriz de tecido.

Contudo, a necessidade de recolha e expansão das células estaminais apresenta grandes problemas de eficiência que definem o sucesso de todo o processo. A segunda estratégia baseia-se no desenvolvimento de *scaffolds* biofuncionais capazes de enviar sinais às células estaminais presentes no tecido doente ou lesado ou de recrutar células estaminais de outros locais por forma a desencadear o processo regenerativo *in situ*. (Engel *et al.*, 2007).

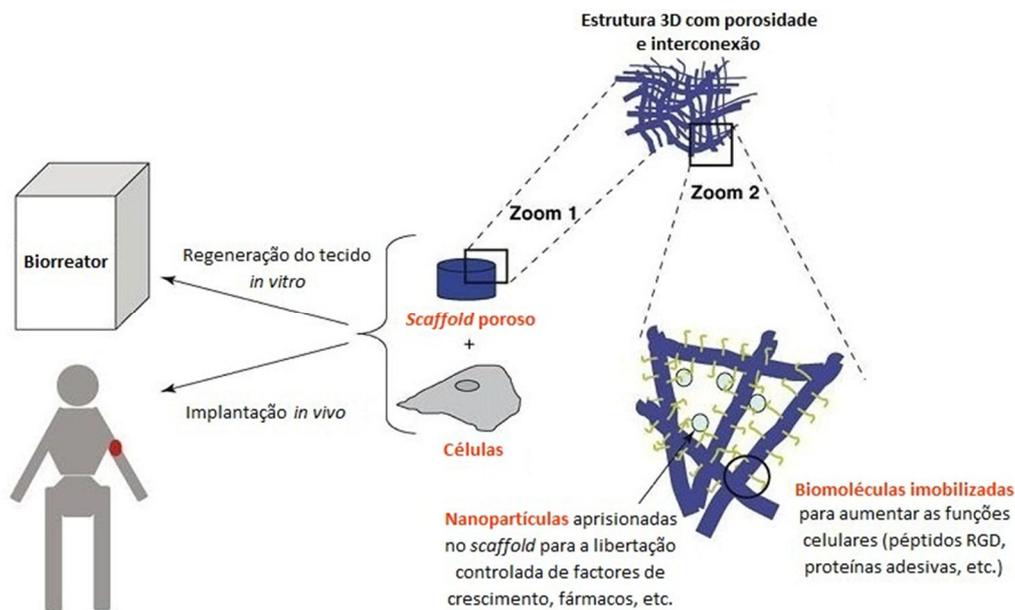


Figura 1.1: Estratégias usadas na engenharia de tecidos para aplicação na medicina regenerativa. Existem diferentes estratégias para a regeneração de tecidos: regeneração *in vivo* ou *in vitro* dos tecidos vivos. Ambos os métodos utilizam um *scaffold* poroso com células incorporadas. Os *scaffolds* também podem ser funcionalizados com diferentes moléculas para melhorar as funções celulares. Componentes, tais como, fármacos, genes, proteínas ou péptidos adesivos, podem ser incorporados em nanopartículas e posteriormente libertados de forma controlada (adaptado de Engel *et al.*, 2007).

1.1.1 *Scaffolds* usados em engenharia de tecidos e medicina regenerativa: biomateriais e biofuncionalização

O *scaffold* é um componente essencial nas estratégias de engenharia de tecidos/medicina regenerativa. Um tecido vivo é constituído por uma MEC e por um ou vários tipos de células. *In vivo*, a MEC é o *scaffold* 3D que proporciona às células um ambiente e conformação estrutural específicos para o desenvolvimento de um determinado tecido/órgão. Adicionalmente, esta atua como um reservatório de nutrientes, fatores de crescimento, água e citocinas necessárias para o crescimento e manutenção do tecido. Assim, no âmbito da medicina regenerativa, um *scaffold* pressupõe-se atuar como uma MEC temporária para a proliferação celular e deposição de matriz extracelular até que o novo tecido se regenere. Alternativamente, o *scaffold* poderá participar ativamente no processo regenerativo através da incorporação de moléculas bioativas na sua estrutura (Salgado *et al.*, 2004). Para tal, este deve possuir uma série de propriedades que o tornem adequado para os propósitos da engenharia de tecidos/medicina regenerativa. Tais propriedades encontram-se descritas na **Tabela 1.1**.

1. INTRODUÇÃO

A primeira e a mais crítica etapa das estratégias na engenharia de tecidos é a escolha do material apropriado para a produção de um *scaffold*. Existem vários fatores importantes a considerar na escolha de um biomaterial para o fabrico do *scaffold*. Um deles é referente à natureza do tecido ou órgão para o qual o *scaffold* é concebido: os biomateriais usados na engenharia de tecidos necessitam de propriedades semelhantes às do tecido que se pretende regenerar (Salgado *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Assim, as limitações e as capacidades do biomaterial selecionado para o *scaffold* devem ser compatíveis com as características estruturais e funcionais do local de interesse, para além de possuírem as propriedades resumidas na **Tabela 1.1**.

Tabela 1.1: Propriedades essenciais dos *scaffolds* para a medicina regenerativa.

Propriedade	Descrição	Referências
Biocompatibilidade	Os <i>scaffolds</i> devem ser integrados no tecido hospedeiro sem suscitarem uma resposta inflamatória.	Williams, 2008
Porosidade	Os <i>scaffolds</i> devem possuir uma elevada porosidade, total interconexão geométrica e uma elevada relação área superficial/volume. Estas propriedades permitirão o crescimento celular no interior do <i>scaffold</i> de forma uniforme, bem como a neovascularização da estrutura e a difusão de nutrientes e metabolitos celulares	Freed & Vunjak-Novakovic, 1998
Tamanho dos poros	Os poros não devem ser demasiado pequenos pois, caso contrário, as células poderão provocar a sua oclusão, e conseqüente inibição da penetração celular, neovascularização e produção de matriz extracelular no interior da estrutura.	Leong <i>et al.</i> , 2003
Superfície	A superfície dos <i>scaffolds</i> deve possuir propriedades bioquímicas e topográficas que promovam a adesão celular e direcionem o destino das células durante o processo de reparação/regeneração.	Causa <i>et al.</i> , 2007; Shekaran & Garcia, 2011.
Propriedades mecânicas	Os <i>scaffolds</i> devem exibir resistência mecânica suficiente para suportarem o constante stress mecânico e a contínua pressão hidrostática a que estarão sujeitos depois de implantados. O <i>scaffold</i> poderá requerer de mais flexibilidade ou rigidez, de acordo com a sua aplicação.	Mitragotri & Lahann, 2009
Degradabilidade	Os <i>scaffolds</i> devem ser biodegradáveis, possuir uma velocidade de degradação coincidente com a velocidade de formação do novo tecido, e os produtos da sua degradação não deverão ser tóxicos.	Kim <i>et al.</i> , 2011

Existe uma grande variedade de materiais metálicos, cerâmicos e poliméricos, de origem natural ou sintética, que são utilizados tanto na investigação como na clínica. A maioria dos metais e cerâmicas não são biodegradáveis e apresentam baixa estabilidade mecânica, razão que motivou os investigadores a optarem cada vez mais pelo estudo de biomateriais poliméricos (Salgado *et al.*, 2004). Os polímeros estudados podem ocorrer naturalmente ou serem produzidos sinteticamente. Como exemplos de polímeros sintéticos tem-se o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e o seu co-polímero (PLGA). Exemplos de polímeros naturais são os polissacarídeos (alginato e amido), as proteínas

(colagénio e fibrina), poliésteres bacterianos (polihidroxibutiratos) e MEC descelularizada (Mano *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011).

Os polímeros sintéticos são os mais comumente utilizados na engenharia de tecidos. Estes são produzidos por processos controlados, que permite a reprodutibilidade do produto final, mesmo em larga escala, e são mais facilmente manipulados/processados de forma a obter *scaffolds* com propriedades mecânicas, estruturais e funcionais desejáveis. Em relação aos polímeros naturais, embora apresentem uma baixa reprodutibilidade, eles podem interagir mais eficientemente com o tecido hospedeiro e apresentam geralmente um comportamento bioativo (Mano *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011).

Para que o *scaffold* possa participar ativamente no processo de reparação/regeneração precisa de ser biofuncional, ou seja, deve incorporar agentes químicos, bioquímicos e biofísicos de forma a mimetizar melhor as propriedades da MEC. Assim, os *scaffolds* poderão atuar como matrizes instrutivas, que permitem a adesão das células, desencadeando eventos de sinalização de modo a direcionar corretamente o seu destino (adesão, migração, proliferação, diferenciação) durante o crescimento e o desenvolvimento de novos tecidos/órgãos, quer *in vitro* ou *in vivo*. Também deverão, em alguns casos, serem capazes de recrutar células e moléculas biológicas *in situ* (Causa *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011; Shekaran & Garcia, 2011; Liu *et al.*, 2012). Esta estratégia é particularmente importante no caso dos *scaffolds* de polímeros sintéticos, dado que estes não exibem comportamento bioativo (Causa *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012).

A biofuncionalização de *scaffolds* pode ser conseguida, por exemplo, com a imobilização de proteínas ou péptidos na sua superfície. Inicialmente começou-se por imobilizar proteínas envolvidas na adesão celular (fibronectina, colagénio e laminina), mas hoje, sabe-se que a funcionalidade dessas proteínas reside em pequenas sequências oligopeptídicas que se conservam funcionais quando isolados da proteína nativa. Os recentes avanços da nanotecnologia têm permitido a imobilização de um ou vários tipos de proteínas/péptidos adesivos com orientações e localizações espaciais precisas e em densidades anormalmente elevadas (Causa *et al.*, 2007; Shekaran & Garcia, 2011; Liu *et al.*, 2012). Os *scaffolds* também podem incorporar sinais bioativos solúveis, tais como fatores de crescimento e de diferenciação, citocinas e quimiocinas. Estas moléculas de sinalização podem ser encapsuladas em micro/nanopartículas biodegradáveis e serem libertadas de forma controlada, mas também podem ser imobilizadas nos *scaffolds* e utilizadas em combinação com péptidos adesivos para melhor direcionar as respostas de células específicas de cada tecido durante o processo de regeneração/restauração (Causa *et al.*, 2007; Berthiaume *et al.*, 2011; Shekaran & Garcia, 2011).

1.1.1.1 Hidrogéis em engenharia de tecidos: dextrino

Os hidrogéis são redes poliméricas, altamente hidrofílicas que conseguem reter uma quantidade significativa de água ou de fluídos biológicos sem se dissolverem. Estes podem ser obtidos através da reticulação química ou física de polímeros (naturais, sintéticos ou de ambos) e as suas propriedades

1. INTRODUÇÃO

dependem da composição química, densidade de reticulação e hidrofobicidade (Hoare & Kohane, 2008; Geckil *et al.*, 2010). Os hidrogéis são geralmente considerados materiais altamente biocompatíveis, devido à sua capacidade para inchar e reter água e também à sua similitude físicoquímica com a MEC nativa, tanto em termos de composição (em particular, no caso dos hidrogéis baseados em polissacarídeos), como em termos mecânicos (Hoare & Kohane, 2008). Além disso, os hidrogéis podem responder a diversos estímulos provenientes do meio ambiente onde se encontram, como o pH, a temperatura e a luz. Uma outra vantagem que os hidrogéis apresentam está relacionada com os métodos de implante no organismo, isto porque, alguns hidrogéis podem ser entregues de uma maneira minimamente invasiva (hidrogéis injetáveis) (Geckil *et al.*, 2010; Khang *et al.*, 2010). Por estas razões, tais materiais estão a ser usados em diversas aplicações na área biomédica, biotecnológica e farmacêutica. Os hidrogéis podem ser usados em engenharia de tecidos como *scaffolds* para suportar e promover a regeneração de tecidos e como sistemas para a libertação controlada de agentes ativos (Drury & Mooney, 2003; Hoare & Kohane, 2008; Geckil *et al.*, 2010).

Os polímeros baseados em amido, como o dextrino, são exemplos de polímeros naturais, com um grande potencial para o desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis devido à sua comprovada tolerabilidade clínica. O dextrino (**Figura 1.2**) é um polímero composto por unidades de glicose ligadas por ligações $\alpha(1-4)$ e é obtido pela hidrólise parcial do amido. Este pode apresentar ainda algumas ramificações com ligações $\alpha-1,6$ (cerca de 5%), e da sua degradação *in vivo* pelas amilases resultam os resíduos de maltose ($\alpha-1,6$) e isomaltose ($\alpha-1,4$), que são facilmente eliminados do organismo (Hreczuk-Hirst *et al.*, 2001; Frampton & Plosker, 2003; Carvalho *et al.*, 2010a). O dextrino é usado como transportador biodegradável de fármacos e foi aprovado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) como solução de diálise peritoneal (Hreczuk-Hirst *et al.*, 2001; Treetharnmathurot *et al.*, 2009).

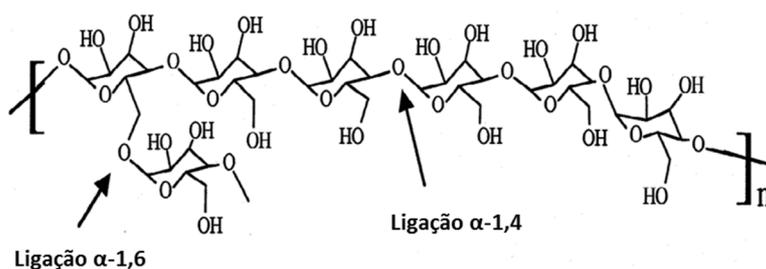


Figura 1.2: Representação esquemática da estrutura molecular do dextrino (adaptado de Hreczuk-Hirst *et al.*, 2001).

1.1.2 Células usadas em engenharia de tecidos e medicina regenerativa

As células mais usadas e estudadas em engenharia de tecidos e medicina regenerativa são as células estaminais e, mais recentemente, as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs).

As células estaminais caracterizam-se pela sua elevada capacidade de auto-renovação e proliferação e pelo seu potencial de diferenciação noutros tipos celulares. Estas células poderão

constituir uma fonte potencialmente ilimitada de células capazes de originar qualquer uma das centenas de células especializadas presentes no organismo humano. As células estaminais podem ser divididas em dois grupos principais: as células estaminais embrionárias (ESCs) e as células estaminais adultas (ASCs) (Salgado *et al.*, 2004). Entretanto, em 2006, foi descrito um terceiro grupo de células estaminais, as iPSCs (Takahashi & Yamanaka, 2006).

As ESCs são as células responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento embrionário e fetal, sendo isoladas a partir do botão embrionário do blastocisto. Estas são classificadas como células pluripotentes, o que significa que têm potencial para se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme), sendo incapazes de se diferenciarem em células dos tecidos extra embrionários. As ESCs podem proliferar inúmeras vezes sem entrarem em senescência. No entanto, estas células estão sob debates éticos quanto à sua origem alogénica (Salgado *et al.*, 2004; Badylak *et al.*, 2011). Esta questão pode ser ultrapassada com a utilização das iPSCs, que apresentam inúmeras semelhanças com as ESCs (Takahashi & Yamanaka, 2006).

As iPSCs são células somáticas convertidas em células estaminais pluripotentes por reprogramação nuclear. As primeiras células foram obtidas por Yamanaka e seus colaboradores, quando produziram células estaminais pluripotentes a partir de fibroblastos da derme de ratinhos, através da introdução de quatro fatores de transcrição, Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, em condições de cultura das ESCs (Takahashi & Yamanaka, 2006). Nos anos seguintes, vários grupos conseguiram produzir iPSCs humanas (Lensch, 2009). As iPSCs humanas podem tornar-se numa fonte ideal para a engenharia de tecidos, uma vez que podem derivar de fontes autólogas, serem expandidas em grande número *in vitro* e darem origem a diferentes tipos de células, necessárias para a formação de tecidos complexos. No entanto, à semelhança das ESCs, ainda não são totalmente controladas *in vitro* ou *in vivo* e podem originar teratomas ou teratocarcinomas quando implantadas no estado indiferenciado. Assim, o desenvolvimento de mecanismos para controlar a proliferação e o fenótipo destes tipos de células estaminais será crucial (Badylak *et al.*, 2011).

No organismo humano, as ASCs são responsáveis pelo crescimento, manutenção da homeostasia dos tecidos, e pela regeneração e reparação dos tecidos danificados onde residem, podendo inclusivamente serem recrutadas para outros tecidos onde são necessárias. Estas células são multipotentes, o que significa que apenas são capazes de se diferenciar em células de tecidos com a mesma origem embrionária. Contudo, já foi demonstrado *in vitro* que o destino final de células multipotentes pode ser alterado para outro folheto germinativo. As ASCs residem em nichos específicos e têm sido isoladas a partir de vários órgãos e tecidos humanos, incluindo a medula óssea, fígado, pulmões, músculo, coração e tecido adiposo, cordão umbilical e podem ser encontradas na circulação sanguínea. Para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa, a medula óssea constitui a fonte primária de ASCs, destacando-se, de entre os vários tipos de ASCs, as células estaminais mesenquimais

1. INTRODUÇÃO

(MSCs) da medula óssea, as células perivasculares do cordão umbilical humano e as células estaminais adultas derivadas do tecido adiposo (Salgado *et al.*, 2004; Badylak *et al.*, 2011; Villanueva *et al.*, 2012).

Tem sido debatido no seio da comunidade científica que tipo de célula será mais útil nas aplicações clínicas. Esta questão ainda não foi totalmente resolvida, mas perspectiva-se que diferentes tipos de células terão papéis diferentes dependendo das condições clínicas (Polak, 2009; Badylak *et al.*, 2011). Parece, contudo, que as MSCs apresentam algumas vantagens. Estas estão presentes em vários órgãos e tecidos, assim como na circulação sanguínea, coexistindo com outras ASCs. Caracterizam-se por aderirem ao plástico e pela capacidade de diferenciação em osteócitos, condrócitos, adipócitos, miócitos, neurónios e cardiomiócitos, desempenhando um papel importante na reparação endógena de tecidos. A medula óssea constitui a fonte mais comum para a extração e isolamento de MSCs, apesar de estas células representarem cerca de 0,01% no total de toda a população celular. Porém a sua capacidade de adesão a placas de cultura facilita a sua rápida expansão e o enriquecimento destas a partir de uma cultura heterogénea (Gnecchi & Melo, 2009; Alvarez *et al.*, 2012). As MSCs também têm limitações, como a capacidade de divisão finita (dependendo da idade do dador), o que limita o seu fornecimento, e podem acumular-se alterações genéticas com o tempo (Guillot *et al.*, 2007).

A utilização de células estaminais requer a sua obtenção, expansão *in vitro* e subsequente transplantação para o local lesado. Contudo, esta estratégia apresenta algumas desvantagens, como a disponibilidade limitada de fontes de células estaminais, a obtenção de células heterogéneas durante a expansão e a dispendiosidade de todo o processo (Polak, 2009; Chen *et al.*, 2011). Uma alternativa a esta estratégia passa pelo *homing* de células estaminais adultas para os locais lesados e consequente regeneração *in situ*.

1.1.3 *Homing* de células estaminais e regeneração *in situ*

Na biologia de células estaminais, o termo *homing* refere-se à capacidade que estas células têm de saírem do seu nicho e encontrarem o caminho para um destino anatómico específico. Um nicho é composto por um subconjunto de células do tecido e por um amplo espectro de substratos extracelulares que regulam a sobrevivência, a auto-renovação e a diferenciação das células estaminais adultas (Chen *et al.*, 2011). Em condições normais, a medula óssea tem um papel fundamental na manutenção do nicho, assegurando o equilíbrio dinâmico em que um pequeno número de células estaminais sai constantemente da medula óssea e segue para os tecidos onde são necessárias (por exemplo, para a organogénese e manutenção de tecidos/órgãos). Estas também podem voltar para a medula óssea ou seguirem para os nichos de tecidos específicos. Quando ocorrem, por exemplo, danos em tecidos/órgãos, as células estaminais saem do seu nicho e dirigem-se para o local lesado onde proliferam e se diferenciam para regenerar a zona ferida (**Figura 1.3**) (Kränkel *et al.*, 2011). Assim, o recrutamento e direcionamento de células estaminais é fulcral para a organogénese durante o desenvolvimento e para a homeostasia e reparação na idade adulta.

Existem dois modos principais de *homing*/recrutamento de células estaminais endógenas. O mais comum é o processo pelo qual as células estaminais entram na corrente sanguínea, disseminando-se pelo corpo todo, e são capazes de reconhecer e de interagir com células endoteliais microvasculares que se encontram próximas do local onde as células estaminais são necessárias. Este reconhecimento e interação resultam na saída das células estaminais da corrente sanguínea e consequente deslocamento para o local alvo. Este modo de *homing* é regulado por uma série de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, ligandos de recetores transmembranares, proteases, moléculas de adesão (selectinas e integrinas) e moléculas da MEC. O segundo modo de tráfico celular, conhecido como migração intersticial ou movimento amebóide ativo, exige que as células estaminais reconheçam e obedeçam a sinais extravasculares para chegar ao local alvo. Em contraste com o modo anterior, este modo de tráfico pode ocorrer de forma independente do fluxo de sangue (**Figura 1.3**) (Chen *et al.*, 2011).

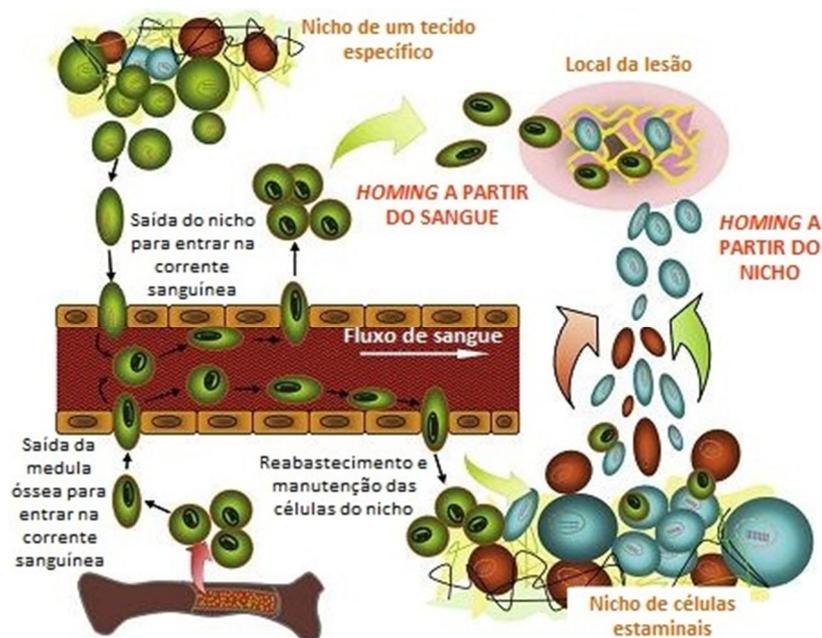


Figura 1.3: Esquema representativo da estratégia de "auto-cura" através do *homing* de células estaminais endógenas em resposta a lesões. Existem dois modos principais de *homing* de células estaminais endógenas: no primeiro, as células estaminais estão presentes na corrente sanguínea e são capazes de reconhecer e interagir com as células endoteliais de um local alvo específico. Este processo é regulado por uma série de sinais bioquímicos. O segundo é conhecido por migração intersticial ou movimento amebóide ativo e dita que as células reconheçam e obedeçam a sinais extravasculares (adaptado de Chen *et al.*, 2011).

Em ambos os modos são necessários sinais bioquímicos. Por exemplo, o recrutamento de MSCs (a partir de qualquer nicho ou da corrente sanguínea) em resposta a lesões e o seu subsequente *homing* para os locais de destino, parece estar correlacionado com o aumento das concentrações de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e de G-CSF (fator estimulador de colónias de granulócitos) no sangue periférico que ocorre após uma lesão (Chen *et al.*, 2011).

O potencial de regeneração do tecido adulto lesado implica, então, a existência de células estaminais/progenitoras em vários tecidos, que podem migrar para o local do ferimento, através da MEC e da corrente sanguínea e depois diferenciar-se no tecido *de novo*. Acontece que o grau de

1. INTRODUÇÃO

regeneração varia entre tecidos, diminui com a idade e perante determinadas situações patológicas. Por isso, no âmbito da medicina regenerativa, a indução do *homing* de células estaminais adultas para a regeneração eficaz de tecidos/órgãos passa pela identificação de moléculas bioativas que medeiam o *homing* das células para um tecido/órgão específico, bem como o seu destino nesses locais e por uma melhor compreensão desses mecanismos (interações células estaminais-agente bioativo e vias de sinalização associadas) (Chen *et al.*, 2011; Kränkel *et al.*, 2011). Este conhecimento é importante para o contínuo desenvolvimento de dispositivos de *homing* celular, no qual se destacam os *scaffolds* biofuncionais e a tecnologia de libertação de fatores bioativos para o recrutamento de células circulantes e/ou vizinhas e direcionamento do seu destino, mas também para a manipulação da resposta de cura do hospedeiro no local da lesão, facilitando a regeneração funcional de tecidos complexos (Chen *et al.*, 2011).

1.2 *Scaffolds* de matriz extracelular

A MEC é secretada pelas células e consiste numa mistura complexa de proteínas (estruturais e funcionais) e de polissacarídeos dispostos numa estrutura tridimensional única e específica de cada tecido. A MEC preenche os espaços entre as células ligando as células e tecidos entre si. A presença de determinadas biomoléculas, bem como a sua proporção e disposição na matriz, dá origem a diversos tipos de MEC, com diferentes funções. Os principais componentes da MEC são o colagénio (componente mais abundante), a elastina, os glicosaminoglicanos (por exemplo, o ácido hialurónico), os proteoglicanos (por exemplo, o perlecano) e as glicoproteínas (por exemplo, a laminina e a fibronectina) (Cooper & Hausman, 1997).

A MEC tem como principais funções: i) conferir aos tecidos resistência às forças compressivas, mantendo a sua integridade estrutural; ii) servir de suporte para as células; iii) servir de reservatório de fatores de crescimento e de outras moléculas de sinalização, que modelam diversos processos fisiológicos e patológicos e iv) transmitir sinais à superfície da célula, através de recetores (Cooper & Hausman, 1997). A matriz não é estática, sendo a composição e estrutura da MEC uma função do tipo de tecido e órgão, da idade do hospedeiro e das necessidades fisiológicas de um dado tecido. Assim, a própria MEC é por natureza um *scaffold* natural para a morfogénese e manutenção de tecidos e órgãos e para a regeneração/reparação de tecidos. Por tudo isto, a MEC tornou-se num material interessante para a produção de *scaffolds* para a engenharia de tecidos/medicina regenerativa (Fernandes *et al.*, 2009; Badylak, 2002a; Badylak, 2004; Badylak, 2007; Badylak *et al.*, 2009; Badylak *et al.*, 2011).

Os *scaffolds* derivados da matriz extracelular descelularizada de tecidos intactos têm sido utilizados com sucesso em diversas aplicações de engenharia de tecidos/medicina regenerativa, tanto em estudos pré-clínicos, como em aplicações clínicas. Várias formas de MEC têm sido usadas como *scaffolds* para promover a remodelação construtiva de tecidos e órgãos lesados (**Figura 1.4**). A MEC usada para a produção desses *scaffolds* provém de vários tecidos, incluindo válvulas cardíacas, vasos

sanguíneos, pele, nervos, músculo esquelético, tendões, ligamentos, submucosa do intestino delgado (SIS), bexiga urinária e fígado (Badylak *et al.*, 2009). Estes tecidos podem ser recolhidos de diferentes mamíferos como porco, bovino, cavalo e Homem (Badylak, 2007). A **Tabela 1.2** apresenta uma lista parcial de *scaffolds* baseados em MEC descclularizada que já se encontram disponíveis para uso clínico, bem como a fonte da matriz e as aplicações terapêuticas em que são usados.



Figura 1.4: Etapas de processamento para a obtenção das várias formas de *scaffolds* de matriz extracelular descclularizada. A folha hidratada pode ser utilizada diretamente como *scaffold*. Várias folhas hidratadas podem originar um *scaffold* multilaminado. As folhas hidratadas também podem ser liofilizadas e estas, por sua vez, podem ser cominuídas para obter uma forma particulada do material. O material triturado pode ser digerido enzimaticamente para liquefazer o material, que pode ser gelificado, misturado com um polímero sintético para fazer um *scaffold* híbrido ou reticulado para retardar a degradação do *scaffold* (adaptado de Badylak *et al.*, 2009 e Kim *et al.*, 2005).

Apesar de se estudar/utilizar *scaffolds* baseados em vários tipos de MECs, as matrizes da SIS e da bexiga urinária (UBM) são as mais amplamente utilizadas nos estudos sobre as propriedades mecânicas e estruturais, a macro e ultra-estrutura e a atividade biológica da MEC. Porém, grande parte do conhecimento pode ser aplicado a todos os materiais constituídos à base de MEC (Badylak *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstraram que a resposta do tecido hospedeiro ao *scaffold* de MEC evidencia uma regeneração no local do implante, dado que o tecido/órgão inicialmente lesado se torna funcional e histologicamente semelhante ao tecido normal. Por outras palavras, no final do processo de reparação/reconstrução, a nova estrutura apresenta células diferenciadas, altamente organizadas e vários tipos de tecidos, tais como artérias e veias funcionais, músculo liso e esquelético e estruturas epiteliais especializadas (Sandusky *et al.*, 1992; Kropp *et al.*, 1996; Probst *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 1998; Robotin-Johnson *et al.*, 1998; Cobb *et al.*, 1999; Badylak *et al.*, 2000; Merguerian *et al.*, 2000; Badylak *et al.*, 2000b; Badylak *et al.*, 2003a). Embora se reconheça que os *scaffolds* de MEC apresentam propriedades regenerativas, os mecanismos pelos quais a regeneração do tecido é conseguida ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, há evidências de que a degradação do *scaffold* é necessária para a realização desse processo.

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1.2: Lista parcial de *scaffolds* de matriz extracelular descelularizada comercialmente disponíveis (adaptado de Badylak, 2007).

Produto	Material	Utilização
Oasis®	Submucosa do intestino delgado (SIS) de porco	Queimaduras superficiais e de segundo grau
CuffPatch™	Submucosa do intestino delgado (SIS) de porco	Reforço de tecidos moles
TissueMend®	Pele de bovinos fetais	Reparação cirúrgica e reforço do tecido mole no manguito rotador
Xenform®	Pele de bovinos fetais	Reparação do prolapso retal, uretral, vaginal e do cólon; reconstrução pélvica
Permacol™	Pele de porco	Reparação de tecidos conjuntivos moles
Graft Jacket®	Pele humana	Úlceras nos pés
Vascu-Guard®	Pericárdio bovino	Reconstrução de vasos sanguíneos no pescoço, pernas e braços

A degradação da MEC é um dos primeiros eventos que ocorre após a lesão de tecidos e alguns estudos mostraram que os *scaffolds* de MEC são completamente degradados *in vivo*, em menos de 90 dias (Badylak *et al.*, 1998; Cobb *et al.*, 1999; Badylak *et al.*, 2000; Badylak *et al.*, 2001; Record *et al.*, 2001). Por outro lado, quando são utilizados *scaffolds* de MEC mais resistentes à degradação, como os *scaffolds* quimicamente reticulados, o processo de remodelação do hospedeiro consiste numa resposta inflamatória mais prolongada e intensa que resulta numa deposição de tecido conjuntivo fibroso (tecido cicatricial) na zona lesada, em vez de uma regeneração do tecido (Valentim *et al.*, 2006). Em suma, os *scaffolds* de MEC são rápida e completamente degradados *in vivo* e induzem uma resposta celular no hospedeiro que suporta a regeneração do tecido, em vez do processo de cicatrização. Estes resultados sugerem ainda que durante a degradação do *scaffold* poderão ser libertadas moléculas com atividade biológica.

Para além da capacidade de indução da regeneração de tecidos lesados, os *scaffolds* de MEC também têm demonstrado mais resistência às infeções microbianas do que os *scaffolds* sintéticos (Badylak *et al.*, 1994; Badylak *et al.*, 2003b; Jernigan *et al.*, 2004; Shell *et al.*, 2005); curiosamente, esta atividade antimicrobiana não é uma propriedade da MEC intacta (Holtom *et al.*, 2004), mas sim dos produtos de degradação do *scaffold* (Sarikaya *et al.*, 2002; Brennan *et al.*, 2006).

1.2.1. Produtos de degradação dos *scaffolds* de matriz extracelular

Os tecidos estão constantemente em remodelação. A MEC pode ser degradada por proteases secretadas pelas células, tais como as metaloproteases da matriz (MMPs) e as proteases de serina (Nagase *et al.*, 1999). Estas, para além de degradarem a MEC, podem ativar ou inibir outras MMPs,

permitir a libertação de fatores de crescimento, de citocinas e a produção de péptidos bioativos, que por sua vez, modulam diversos eventos celulares (adesão, migração e proliferação celular, apoptose, síntese de proteínas, degradação da MEC, angiogénese, vasculogénese, inflamação). Desta forma, a degradação da MEC é essencial para o desenvolvimento embrionário, morfogénese, reprodução, homeostasia, remodelação e manutenção dos tecidos (Nagase *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004).

Os *scaffolds* de MEC contêm fatores de crescimento, como o TGF- β (fator de crescimento de transformação beta), o b-FGF (fator de crescimento básico de fibroblastos) e o VEGF (Voytik-Harbin *et al.*, 1997; Hodde *et al.*, 2001; McDevitt *et al.*, 2003; Hodde *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2007), que podem manter a sua atividade biológica mesmo após o processamento e esterilização terminal do *scaffold* (por exemplo: tratamentos com ácido peracético, óxido de etileno e liofilização) (McDevitt *et al.*, 2003; Hodde *et al.*, 2005). Esses fatores de crescimento, uma vez ativados, promovem a angiogénese, a mitogénese e a diferenciação celular durante o processo de remodelação (McDevitt *et al.*, 2003; Hodde *et al.*, 2005).

Estudos recentes têm demonstrado que os fatores de crescimento intactos não serão os únicos responsáveis pela capacidade regenerativa induzida pelos *scaffolds* de MEC. Tal atividade deverá ser principalmente devida aos fragmentos resultantes da degradação dos componentes da MEC (colagénio, laminina, fibronectina). Os produtos resultantes da degradação da MEC mostraram ser importantes para o recrutamento e mobilização de células progenitoras para o local lesado (Badylak *et al.*, 2001; Zantop *et al.*, 2006; Beattie *et al.*, 2009). Por exemplo, Badylak e seus colaboradores verificaram que os péptidos bioativos são capazes de recrutar células derivadas da medula óssea para o local do implante (Badylak *et al.*, 2001; Zantop *et al.*, 2006). Estas células, por sua vez, participam na remodelação do tecido a longo prazo, diferenciando-se em células específicas do tecido. O envolvimento destas células pode explicar, em parte, a regeneração em oposição à cicatrização de feridas, quando a MEC é utilizada como *scaffold* para a restauração/reparação dos tecidos (Zantop *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, estudos *in vitro* mostraram que os produtos de degradação obtidos por diferentes métodos de hidrólise da MEC (química, enzimática e térmica) possuem ação quimiotática e mitogénica em células progenitoras e estaminais, assim como efeito antimicrobiano (**Tabela 1.3**). Apresentaram ainda atividade anti-quimiotática e anti-mitogénica sobre células endoteliais diferenciadas (Reing *et al.*, 2009; Vorotnikova *et al.*, 2010).

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1.3: Efeitos biológicos dos produtos de degradação da matriz extracelular em células progenitoras/estaminais e em bactérias.

Atividade	Fonte de MEC	Tipo de degradação	Células testadas	Referências
Quimiotática	Células blastemais do rato MRL/MpJ	Enzimática (pepsina)	Blastemais de ratos MRL/MpJ	Vorotnikova <i>et al.</i> , 2010
	SIS de porco	Química (ácido acético) e térmica (120°C)	Endoteliais primárias de coração, fígado e rim de rato	Li <i>et al.</i> , 2004
	UBM de porco	Enzimática (pepsina)	Estaminais perivasculares humanas do músculo esquelético	Agrawal <i>et al.</i> , 2010
	SIS e UBM de porco	Enzimática (pepsina)	Estaminais perivasculares fetais do músculo humano	Totley <i>et al.</i> , 2011a & b
	Pele humana (fetal e adulta) e de porco (adulto)	Enzimática (pepsina)	Progenitoras dos queratinócitos (HEKn)	Brennan <i>et al.</i> , 2008
	UBM de porco	Enzimática (pepsina)	Blastema de rato Progenitoras de multilinhagens (MLPCs)	Reing <i>et al.</i> , 2009
	UBM de porco	Enzimática (papaína)	Blastemais de ratos MRL/MpJ	Reing <i>et al.</i> , 2009
Mitogénica	Células blastemais de ratos MRL/MpJ	Enzimática (pepsina)	Blastemais do rato MRL/MpJ	Vorotnikova <i>et al.</i> , 2010
	SIS e UBM de porco	Enzimática (pepsina)	Estaminais perivasculares fetais do músculo humano	Totley <i>et al.</i> , 2011a & b
	UBM de porco	Enzimática (pepsina)	Blastemais do rato MRL/MpJ	Reing <i>et al.</i> , 2009
Antimicrobiana	UBM e SIS de porco	Química (ácido acético) e térmica (120°C)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Sarikaya <i>et al.</i> , 2002
	UBM e fígado de porco	Química (ácido acético) e térmica (120°C)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Brennan <i>et al.</i> , 2006

A aplicação *in vivo* dos produtos de degradação da MEC confirmou que estes desempenham um papel importante no recrutamento de células estaminais progenitoras endógenas e na regeneração do tecido/órgão danificado. Por exemplo, Vorotnikova *et al.* aplicou os produtos de degradação enzimática de MEC produzida pelas células do blastema de ratos MRL/MpJ (ratos com capacidade de regeneração

de alguns tecidos) em feridas cutâneas de ratos adultos que não possuem capacidade de regeneração (ratos C57BL/6). OS resultados demonstraram que os produtos da MEC induziram o crescimento de derme, epiderme e pêlo no local da ferida, enquanto que nos animais que não receberam tratamento houve a formação de cicatriz (Vorotnikova *et al.*, 2010). Já Agrawal *et al.*, ao estudar os produtos de degradação da UBM de porco em ratos C57/BL6 adultos com um dedo amputado, verificou que tais produtos promovem a acumulação de células multipotentes capazes de se diferenciarem em células das linhagens mesodérmica e neuroectodérmica. Este resultado veio demonstrar mais uma vez, a capacidade dos produtos de degradação da MEC para recrutarem células estaminais endógenas para o local de lesão (Agrawal *et al.*, 2010). Por fim, Li e seus colegas mostraram que os produtos de degradação de MEC de baixo peso molecular (5 a 16 kDa) estimulam o recrutamento de células endoteliais e a angiogénese *in vivo* (Li *et al.*, 2004).

Neste sentido, o estudo dos produtos de degradação da MEC no contexto da engenharia de tecidos e medicina regenerativa tem vindo a aumentar. O próximo passo consiste na separação e identificação dos péptidos ou conjunto de péptidos responsáveis pelas variadas atividades biológicas, bem como a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos.

1.3 Regiões bioativas da matriz extracelular

Nas últimas décadas, vários estudos têm mostrado que os componentes da MEC contêm regiões/domínios funcionais capazes de gerar novos sinais às células que irão influenciar importantes eventos celulares, tais como a migração, a proliferação e a diferenciação. Essas regiões são conhecidas por sítios metacrípticos, uma vez que não se encontram expostas quando a molécula da MEC se encontra na forma nativa/intacta, sendo apenas exibidas após alterações estruturais e conformacionais da molécula. Este termo é limitado às regiões bioativas que derivam diretamente das moléculas da MEC (incluindo as proteínas e os polissacarídeos, como os glicosaminoglicanos) e não às que derivam das moléculas associadas à MEC, tais como proteases, inibidores de proteases ou fatores de crescimento (Davis *et al.*, 2000).

O número crescente de atividades reconhecidas nos componentes da MEC sugere que os sítios metacrípticos podem constituir uma estratégia geral adotada durante a evolução, para o controlo dos diversos eventos celulares e extracelulares. Esta estratégia tem a vantagem de manter estas regiões escondidas na MEC intacta/nativa quando não são necessárias, ficando expostas devido a alterações do microambiente. Uma vez exibidos, os sítios metacrípticos fornecerão as instruções a serem usadas pelas células durante os processos de organização, reparação e remodelação dos tecidos (Schenk & Quaranta *et al.*, 2003).

A exposição destas regiões bioativas pode ocorrer por i) degradação enzimática, ii) ligação de moléculas diferentes (adsorção de moléculas), iii) multimerização, iv) força mecânica exercida sobre as moléculas e v) desnaturação. Todos estes mecanismos resultam na alteração estrutural ou

1. INTRODUÇÃO

conformacional das moléculas da MEC (Davis *et al.*, 2000). Neste trabalho será apenas abordada a exposição de sítios metacrípticos resultantes da degradação enzimática da matriz extracelular, as matricinas.

1.3.1 Matricinas: conceito, bioatividade e aplicações

No início da década passada, Davis *et al.* propuseram o termo matricriptinas para designar os fragmentos bioativos resultantes da degradação enzimática da MEC, que expõe os sítios metacrípticos e cuja atividade biológica é diferente da molécula que lhes deu origem (Davis *et al.*, 2000). Outros autores têm utilizado o termo matricinas para designar os mesmos fragmentos (Duca *et al.*, 2004; Maquart *et al.*, 2004; Adair-Kirk *et al.*, 2008).

Embora a maior parte dos sítios metacrípticos obtidos pela degradação enzimática da MEC sejam péptidos, também foram identificadas matricinas provenientes do ácido hialurônico (Liu *et al.*, 1996; Horton *et al.*, 1999). Apesar de o conceito de matricinas ter surgido durante a última década no contexto dos *scaffolds* de MEC, foram já identificadas inúmeras matricinas resultantes da degradação enzimática dos diversos componentes da MEC.

As matricinas, uma vez libertadas, podem interagir com recetores da superfície celular da família das integrinas, desencadeando múltiplas atividades biológicas, como a quimiotaxia, a mitogénese, a diferenciação, a adesão celular e a apoptose em diversos tipos de células (inflamatórias, endoteliais, musculares, tumorais, fibroblastos, entre outras) ou a degradação ou síntese de MEC. Consequentemente, as matricinas interferem/modelam diretamente vários processos fisiológicos ou patológicos, como a angiogénese (Li *et al.*, 2003; Schenk & Quaranta, 2003; Bellon *et al.*, 2004; Sottile, 2004; Burgess & Weckmann, 2012), a resposta inflamatória/imunológica (Adair-Kirk *et al.*, 2008), cura de feridas (Davis *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Maquart *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2003) e o processo carcinogénico (Schenk S & Quaranta, 2003; Bellon *et al.*, 2004; Duca *et al.*, 2004; Maquart *et al.*, 2004; Maquart *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2005). Na **Tabela 1.4** estão apresentados apenas alguns exemplos de matricinas e sítios metacrípticos frequentemente encontradas nos fragmentos da MEC, bem como as suas principais funções.

Um dos sítios metacrípticos mais importantes é a sequência tripeptídica RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), um motivo adesivo que se encontra presente em várias moléculas da MEC, como a fibronectina, a laminina, a entactina/nidogénio, o fibrinogénio, o colagénio, a vitronectina e a tenascina. Esta sequência parece participar na proliferação, migração, sobrevivência celular, fagocitose, morfogénese e no processo de reparação de tecidos lesados, bem como na regulação da vasoatividade arteriolar e da resposta angiogénica (Davis *et al.*, 2000). Dada a sua ampla distribuição na MEC e capacidade para se ligar a diversas integrinas, o RGD é o péptido adesivo mais utilizado para a biofuncionalização de *scaffolds*, com o intuito de melhorar a adesão das células ao *scaffold* e subsequente desencadeamento de eventos celulares que levam à regeneração do local lesado. Este

também é usado em combinação com outros motivos metacripticos, como o PHSRN (Prolina-Histidina-Serina-Arginina-Asparagina), para criar efeito sinérgico (Causa *et al.*, 2007; Shekaran & Garcia, 2011).

Tabela 1.4: Matricinas e sítios metacripticos de alguns componentes da matriz extracelular e respetivas funções conhecidas.

Molécula da MEC	Matricina/ sítio metacriptico	Função
Colagéneo I	Região GHK	Pró-angiogénica, Indução da produção de MMPs Efeito quimiotático em células inflamatórias
Colagéneo IV	Arrestena (26 kDa)	Anti-angiogénica Inibição do crescimento tumoral
	Canstatina (24 kDa)	Anti-angiogénica e pró-apoptótica Inibição do crescimento tumoral
	Tumstatina (28 -30 kDa)	Anti-angiogénica Inibição do crescimento tumoral Inibição da síntese proteica
Colagéneo XV	Restina ou Endostatina XV (22 kDa)	Inibição da migração de células endoteliais Anti-angiogénica Inibição do crescimento tumoral
Colagéneo XVIII	Endostatina XVIII (20 kDa)	Anti-angiogénica e pró-apoptótica Inibição do crescimento tumoral
Perlecano	Endorepelina (81 kDa)	Anti-angiogénica
Ácido hialurónico	Fragmentos com 3 a 16 unidades de dissacarídeos	Pró-angiogénicos Indução da produção de MMPs
Elastina	Região VGVAPG	Efeito quimiotático e mitogénico em vários tipos de células (células inflamatórias, fibroblastos, células musculares) Indução da produção de MMPs
Fibronectina	Anastelina (9 kDa)	Anti-angiogénica Inibição da metástese e do crescimento tumoral
Laminina	Região (S)IKVAV	Efeito quimiotático em células inflamatórias Indução da produção de MMPs

Tabela baseada nos artigos de revisão Davis *et al.*, 2000; Schenk & Quaranta, 2003; Bellon *et al.*, 2004; Duca *et al.*, 2004; Sottile, 2004; Maquart *et al.*, 2005 e Adair-Kirk *et al.*, 2008.

1. INTRODUÇÃO

Quando os tecidos e os órgãos sofrem lesões ocorre a degradação da MEC. Neste sentido, torna-se cada vez mais evidente que a importância deste evento poderá estar associada à libertação de matricinas, que fornecerão importantes sinais para a regulação do processo de reparação. Por outro lado, o facto de os *scaffolds* de MEC induzirem uma regeneração dos tecidos lesados e desta estar a ser associada aos produtos de degradação do *scaffold*, evidencia, mais uma vez, o enorme potencial das matricinas na área da engenharia/regeneração de tecidos. Assim, para além do potencial das matricinas no tratamento do cancro e de doenças inflamatórias, estas podem ser utilizadas para biofuncionalizar os *scaffolds*, direccionar fármacos e até atuarem como moléculas terapêuticas no contexto da medicina regenerativa.

1.4 Objetivos do trabalho

Dado a importância dos produtos de degradação dos *scaffolds* de MEC descelularizada para o recrutamento de células estaminais/progenitoras e a regeneração *in situ* de tecidos lesados, tem aumentado o interesse no estudo das propriedades bioativas desses produtos e na identificação das moléculas ou conjunto de moléculas responsáveis por esses efeitos. Neste sentido, este trabalho teve como principais objetivos i) obter produtos de degradação da matriz extracelular da bexiga de porco através de um método fisiologicamente mais relevante, digestão enzimática; ii) fracionar o hidrolisado obtido no final da digestão com base na solubilidade dos componentes da UBM degradados e no peso molecular das matricinas, iii) avaliar a propriedade quimiotática e mitogénica das frações obtidas em MSCs de rato e fibroblastos e iv) biofuncionalizar hidrogéis de dextrino com os produtos de degradação da UBM e avaliar a sua biocompatibilidade e potencial osteogénico *in vivo*, usando coelhos adultos.



2. MATERIAIS E MÉTODOS



2.1 Reagentes

Neste trabalho todos os reagentes utilizados foram adquiridos à *Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)*, salvo indicação em contrário.

2.2 Preparação dos produtos da degradação da matriz extracelular

2.2.1 Extração da matriz extracelular da bexiga de porco

O procedimento para a obtenção da matriz extracelular do urotélio e da lâmina própria da bexiga de porco foi baseado no que está descrito nos artigos de Freytes *et al.*, 2004 e 2008. Sucintamente, após a recolha das bexigas, os resíduos de urina foram eliminados usando água destilada. As bexigas lavadas foram armazenadas numa solução de NaCl (cloreto de sódio) 0,9%, a 4°C, até ao procedimento de extração da lâmina própria e do urotélio. Para tal, começou-se por remover o tecido adiposo e o excesso de colagénio do tecido conjuntivo que se encontram à volta da bexiga com o auxílio da tesoura. Posteriormente foram removidos a adventia, o músculo detrusor e a submucosa da bexiga com a ajuda do bisturi (**Figura 2.1 (A) e (B)**). As células uroteliais foram removidas imergindo o tecido em 1,0 M de NaCl, sob agitação, obtendo-se a UBM, composta pela membrana basal das células uroteliais e pela lâmina própria subjacente. As amostras de UBM foram incubadas durante 2 h, com agitação, numa solução aquosa contendo 0,1% (v/v) de ácido peracético e 4% (v/v) de etanol para desinfeção. Os resíduos de ácido peracético foram eliminados através de duas lavagens, de 15 min cada, com PBS (*phosphate-buffered saline* - pH 7,4), seguindo-se mais duas lavagens com água destilada (dH₂O), também durante 15 min sob agitação. Por fim, as amostras de UBM descelularizadas (**Figura 2.1 (C)**) foram liofilizadas (*LaboGeneTM, Lyngø, Denmark*).

2.2.2 Hidrólise enzimática da matriz extracelular

A UBM, cortada em pequenos pedaços, foi hidrolisada com pepsina. A pepsina é uma protease digestiva presente no estômago que hidrolisa apenas ligações peptídicas (esta enzima não hidrolisa as ligações éster e amida não-peptídicas). A pepsina cliva preferencialmente a ligação junto ao grupo carboxílico dos resíduos de fenilalanina, leucina e ácido glutâmico, não clivando as ligações de valina, alanina ou glicina (Sweeney & Walker, 1993).

A digestão foi realizada de acordo com o procedimento descrito em Freytes *et al.*, 2008, com algumas alterações. Resumidamente, misturou-se 1 g de UBM liofilizada com 100 mg de pepsina em 100 mL de HCl (ácido clorídrico) 0,01 M. A hidrólise decorreu durante 48 h, a 37°C, com agitação constante. No final da hidrólise, a pepsina foi inativada irreversivelmente através do ajuste do pH a 8,0 com NaOH (hidróxido de sódio).

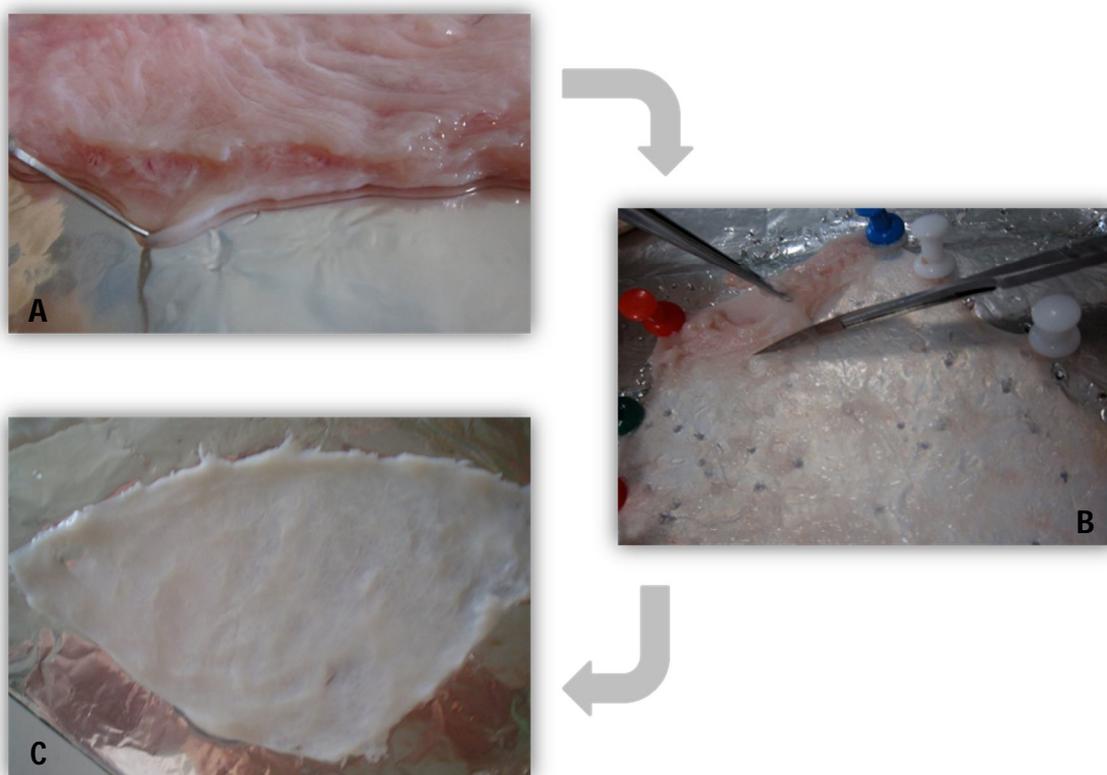


Figura 2.1: Esquema representativo do processo de obtenção da matriz extracelular descelularizada da lâmina própria e do urotélio da bexiga de porco: **(A)** e **(B)** Extração mecânica da lâmina própria e do urotélio da bexiga de porco, **(C)** UBM descelularizada antes de ser liofilizada.

2.3 Fracionamento do hidrolisado

Neste trabalho, as frações solúveis e insolúveis resultantes da hidrólise da UBM foram separadas por centrifugação (*Centrifuge Sigma 4k15, DLB Labcare Ltd., Buckinghamshire, UK*) a 18 000 g, durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante resultante (fração solúvel) foi ultrafiltrado (*Amicon Ultrafiltration cell, Millipore, Billerica, USA*), utilizando uma membrana de nitrocelulose com *Molecular Weight Cut-off (MWCO)* de 30 kDa (*Millipore, Billerica, USA*). Posteriormente, todas as frações foram liofilizadas.

A fração total de UBM foi esterilizada com óxido de etileno, enquanto que as restantes frações (fração solúvel e fração resultante da ultrafiltração com peso molecular inferior a 30 KDa) foram esterilizadas por filtração com uma membrana de 0,2 µm de acetato de celulose (*PALL, North Hempstead, USA*).

2.4 Caracterização das frações de UBM obtidas na hidrólise com pepsina

2.4.1 Quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados

A quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG-S) em cada fração de UBM foi determinada usando o Kit de *Blyscan sGAG assay (Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK)*. Neste ensaio o corante azul de 1,9-dimetilmetileno (reagente *Blyscan dye*) liga-se ao polissacárido sulfatado formando

um complexo insolúvel. O corante azul, uma vez solubilizado, apresenta um pico máximo de absorvância a 656 nm.

Foram realizados dois ensaios independentes, cada um com duplicados, de acordo com as instruções do *kit*, com pequenas alterações. Sumariamente, os GAG-S de cada fração de UBM foram extraídos com papaína; para a digestão, foram usados 25 a 40 mg de UBM liofilizada por cada mL de tampão de extração (0,1 M de acetato de sódio, 0,01 M de Na₂EDTA (*disodium ethylenediaminetetraacetic acid*), 0,005 M de cisteína-HCl monohidratada e 0,2 mg de papaína/mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,4). A extração decorreu a 65°C, durante 3 h. No final, as amostras foram centrifugadas a 10 000 g, durante 10 min. A 100 µL de sobrenadante de cada amostra adicionou-se 1 mL de reagente *Blyscan dye*, deixando as amostras sob agitação mecânica suave, durante 30 min. Ao fim desse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12 000 rpm, durante 20 min. O sobrenadante foi manualmente descartado e o *pellet* dissolvido com 0,5 mL de reagente de dissociação. No final, determinou-se a absorvância das amostras no leitor de microplacas (*Synergy™ HT, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA*). O 4-sulfato de condroitina foi utilizado como padrão.

2.4.2 Análise proteica das frações de UBM por eletroforese em condições desnaturantes

A análise de proteínas foi efetuada por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) segundo o sistema *Laemmli* (1970), onde se utiliza um gel com pH e poro descontínuos. Nesta técnica, as proteínas são tratadas com β-mercaptoetanol, um agente redutor que dissocia as proteínas nas suas subunidades proteicas, e estas ligam-se ao SDS que é um detergente desnaturante que confere uma carga negativa às proteínas proporcional à sua massa. Assim, obtém-se uma razão carga/massa idêntica, pelo que as proteínas são separadas somente pelo seu tamanho quando aplicadas num gel de poliacrilamida. O gel resulta da co-polimerização da acrilamida e da bisacrilamida na presença de APS (persulfato de amónio) e TEMED (N, N, N',N'-tetrametiletlenodiamina). Quando as proteínas/péptidos são submetidas a um campo elétrico, migram no sentido do ânodo, sendo separadas no gel de acordo com o seu tamanho: as proteínas de menores dimensões são as que migram mais no gel. O tamanho dos poros do gel depende da concentração de poliacrilamida utilizada na sua preparação, sendo a concentração inversamente proporcional ao tamanho dos poros do gel (Plummer, 1987).

Neste trabalho foram usados géis SDS-PAGE com 10% (p/v) de poliacrilamida e de Tricina-SDS-PAGE com 16,5% (p/v) de poliacrilamida. A eletroforese de Tricina-SDS-PAGE baseia-se na técnica que foi descrita por *Laemmli* e é preferencialmente usada para a resolução de proteínas/péptidos com tamanho inferior 30 kDa (Schägger, 2006).

2.4.2.1 Análise das amostras por SDS-PAGE

O gel resolvente com 10% (p/v) de poliacrilamida, bem como o gel concentrador com 4% (p/v) de poliacrilamida foram preparados segundo o descrito na **Tabela 2.1**. O tampão usado na eletroforese era constituído por Tris-HCl (17,7 mM), SDS (0,2 p/v) e glicina (0,2 M).

As amostras, antes de serem aplicadas no gel, foram desnaturadas por adição do tampão de amostra 5x concentrado (10% (p/v) de SDS, 25% (p/v) de β -mercaptoetanol, 50% (v/v) de glicerol, 0,01% (v/v) de azul de bromofenol e 3,125 M de Tris-HCl, pH 6,8) e depois foram aquecidas a 95°C, durante 5 min. Após a corrida eletroforética, os géis foram revelados utilizando o método da coloração de *Comassie Blue*.

Tabela 2.1: Volumes a adicionar para a preparação de géis.

Reagente	Gel resolvente 10%	Gel concentrador 4%
	Volume (mL)	Volume (mL)
40% Acrilamida (<i>Bio-Rad</i>)	2,43	0,48
2% Bisacrilamida (<i>Bio-Rad</i>)	1,34	0,26
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,26
SDS 10% (p/v)	0,1	0,05
dH ₂ O	3,58	2,92
APS 10% (p/v)	0,05	0,025
TEMED	0,005	0,005
Volume (mL)	10	5

2.4.2.2 Análise das amostras por Tricina-SDS-PAGE

O gel resolvente com 16,5% (p/v) de poliacrilamida foi preparado segundo o descrito na **Tabela 2.2**. A composição do gel concentrador com 4% (p/v) de poliacrilamida encontra-se na **Tabela 2.1**. Esta técnica utiliza dois tampões durante a corrida: i) o tampão do ânodo, composto por 2,42% (p/v) de Tris-base dissolvido em água e com pH final de 8,9 e ii) o tampão do cátodo, constituído por 1,22% (p/v) de Tris-base, 1,79% (p/v) de Tricina e 0,1% (p/v) de SDS, dissolvidos em água e com pH 8,2.

Para a análise eletroforética, misturaram-se 15 μ L de amostra com 15 μ L de tampão da amostra Tris-Tricina 2x concentrado (0,4% (p/v) de SDS, 12% (v/v) de glicerol, 2% (v/v) de β -mercaptoetanol, 0,01% (p/v) de azul brilhante de *Comassie G-250* e 5% (v/v) de Tris-base 1 M, pH 6,8). As amostras foram aquecidas a 40°C, durante 30 min. Após a corrida eletroforética, os géis foram revelados utilizando o método da coloração de *Comassie Blue* ou nitrato de prata.

Tabela 2.2: Volumes a adicionar para a preparação de géis.

Reagente	Gel resolvente 16,5%
	Volume (mL)
40% Acrilamida/Bis 37,5:1 (2,6%) (<i>BioRad</i>)	4,12
3 M Tris-HCl + SDS 0,3% (p/v), pH 8,45	3,34
Glicerol	1,06
dH ₂ O	1,49
APS 10% (p/v)	0,05
TEMED	0,005
Volume (mL)	10

2.4.2.3 Coloração pelo método de azul de *Comassie*

Terminada a eletroforese, os géis foram colocados na solução de coloração de *Comassie* (solução aquosa contendo 50% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético glacial e 0,05% (p/v) de Azul brilhante de *Comassie G-250*), durante 30-40 min. Em seguida, os géis foram colocados na solução descorante (solução aquosa contendo 30% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial), até se visualizarem as bandas no gel. Por fim, os géis foram guardados em água destilada até serem fotografados.

2.4.2.4 Coloração pelo método de nitrato de prata

Os géis foram colocados na solução de fixação de proteínas (solução aquosa contendo 30% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético), durante 30 min, com agitação. Este passo é repetido três vezes. Em seguida, foram lavados em solução de etanol (20% v/v), durante 10 min. A sensibilização foi feita mergulhando os géis, durante 1 min, numa solução de tiosulfato de sódio 0,2 g/L, lavando-se em seguida os géis com água (2 vezes, durante 20 s). Os géis foram corados com uma solução de nitrato de prata 2,0 g/L, durante 30 min. No final, os géis foram lavados durante 10 s com água e revelados com uma solução composta por 0,7 mL/L de formaldeído, 30 g/L de carbonato de potássio anidro e 10 mg/mL de tiosulfato de sódio. A revelação dos géis foi parada com uma solução contendo 50 g/L de Tris-base e 2,5% (v/v) de ácido acético e os géis foram guardados em água até serem fotografados.

Este método de coloração foi usado sempre que a coloração com azul de *Comassie* não permitia a visualização das bandas proteicas. Assim, os géis corados com *Comassie* e descorados foram incubados em água antes de se proceder à coloração com prata. Como as proteínas já se encontravam fixadas no gel, este protocolo de coloração foi iniciado no passo referente à sensibilização dos géis.

2.5 Avaliação *in vitro* da bioatividade das frações de UBM hidrolisada

A fração total de UBM, a fração solúvel e a fração ultrafiltrada contendo péptidos com peso molecular inferior a 30 kDa foram usadas nos ensaios *in vitro*, para avaliar a sua atividade quimiotática e

mitogénica. Para tal, foram utilizadas células estaminais mesenquimais de *Rattus norvegicus* (*Wistar*) e fibroblastos 3T3 de embrião de rato (ATCC CCL-164). As células endoteliais microvasculares humanas (HMVECs) foram usadas na otimização do ensaio de migração.

2.5.1 Extração de células mesenquimais de medula óssea de rato

As células mesenquimais de rato (MSCr) foram extraídas assepticamente das tíbias e fêmures de *Rattus norvegicus* (*Wistar*) adultos como descrito por Gneccchi e Melo (Gneccchi & Melo, 2009) com algumas alterações. Os ossos foram extraídos dos animais, os músculos envolventes foram removidos e as extremidades dos ossos cortadas. As células foram extraídas da medula óssea usando PBS, suplementado com 20% de FBS (*fetal bovine serum* - *Biochrom AG, Berlin, Germany*) e 2% de PE (penicilina e estreptomicina - *Biochrom AG, Berlin, Germany*), com o auxílio de uma seringa com agulha 23 Gx1^{1/4}. Depois, a suspensão celular foi centrifugada a 400 g, durante 15 min, para concentrar as células que foram então ressuspensas em 10 mL de PBS, contendo 20% de FBS e 2% de PE. As células mononucleadas (incluindo as MSCr) foram isoladas utilizando o reagente Histopaque[®], seguindo as recomendações do fabricante. Após a obtenção das células mononucleadas, estas foram lavadas com PBS suplementado com 20% de FBS e 2% de PE, ressuspensas em DMEM-LG (*Dulbecco's modified Eagle's media low glucose*, *Biochrom AG, Berlin, Germany*), contendo 20% de FBS e 2% de PE, e plaqueadas em placas de poliestireno de 6-poços.

2.5.2 Cultura de células

Os fibroblastos cresceram em meio DMEM suplementado com 10% de CALF (*newborn calf serum* - *Biochrom AG, Berlin, Germany*) e as MSCr em meio DMEM LG suplementado com 10% de FBS. As HMVECs foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, 1 mL/L de EGF (fator de crescimento epidermal) e 1 mg/mL de hidrocortisona. Todos os meios de cultura foram suplementados com 1% de PE. As células foram incubadas a 37°C, numa atmosfera humidificada e contendo 5% de CO₂. Depois de atingirem cerca de 70-80% de confluência, as células foram tratadas com uma solução de 0,05% (p/v) tripsina-EDTA (*Biochrom AG, Berlin, Germany*) e subcultivadas nos respetivos meios. As MSCr foram usadas nos ensaios entre as passagens 4 e 7.

2.5.3 Ensaio de proliferação celular

O efeito de cada fração de UBM sobre a proliferação das células foi avaliado pelo ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide), que mede a atividade metabólica mitocondrial. O MTT é um sal *tetrazolium* de cor amarela, que é reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial das células viáveis, resultando o formazano, que apresenta uma cor roxa. O MTT reduzido pode ser quantificado pela medição da absorvância a 570 nm (Berridge *et al.*, 2005).

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 3000 fibroblastos e 7500 MSCr, num volume final de 100 μ L do respetivo meio com 10% de soro. As células ficaram a aderir cerca de 16 h e, ao fim desse tempo, as células não aderidas foram removidas. Adicionou-se então o meio contendo diferentes concentrações de cada fração de UBM (0, 1, 10, 50, 100, e 200 μ L/mL para os Fibroblastos e 125, 250, 500 e 750 μ L/mL para as MSCr). No caso dos ensaios com os Fibroblastos, a atividade mitogénica dos produtos de degradação da fração solúvel de UBM foi testada em meio com diferentes concentrações de CALF (2% e 10%). O ensaio de MTT foi efetuado ao fim de 0, 24, 48 e 72 h de incubação com os produtos de degradação da UBM. Para tal, foram adicionados 10 μ L/poço de MTT (5 mg/mL) e ao fim de 3 h de incubação foi acrescentado, em cada poço, 110 μ L de solução de solubilização (0,1 M de HCl, 10% (v/v) de Triton X-100 e 89% (v/v) de Isopropanol). Seguidamente, os cristais foram ressuspensos e a absorvância medida a 570 nm (absorvância máxima celular) e 690 nm (absorvância residual das células), no leitor de microplacas. Para cada amostra, foi subtraído o valor da absorvância a 690 nm.

Foram realizadas pelo menos três ensaios independentes, feitos com triplicados. Os resultados que se apresentam correspondem a uma experiência e são representativos dos vários ensaios executados. A análise estatística dos resultados obtidos foi efetuada recorrendo ao *software GraphPad Prism 5.00*. Foi aplicado o teste ANOVA (*one-way analysis of variance*) acoplado ao *Dunnett's post-test* para comparar cada concentração usada com o respetivo controlo. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.5.4 Ensaio de migração celular

A atividade quimiotática dos péptidos resultantes da hidrólise enzimática sobre as células foi avaliada numa câmara Neuro Probe AP48 – **Figura 2.2** (*Neuro Probe, Gaithersburg, USA*), tal como descrito em Brennan *et al.*, 2008 e Agrawal *et al.*, 2010, com algumas variações. Antes de proceder a este ensaio, as MSCr foram colocadas em meio com 1% de soro, durante 20-24 h, enquanto que as HMVECs permaneceram 14-17 h em meio contendo 2% de soro. Depois, as células foram tratadas com tripsina, centrifugadas (180 g, 10 min), ressuspensas em meio DMEM sem soro (6×10^5 células/mL) e incubadas durante 1 h, a 37°C. Diferentes concentrações de fração solúvel (250, 500 e 750 μ L/mL), bem como o controlo negativo (DMEM LG sem soro) e o controlo positivo (DMEM LG com 20% de FBS) foram colocados nos poços da câmara inferior (32 μ L) e a suspensão celular na câmara superior (55 μ L). No caso das HMVECs, não foram testados produtos de degradação de UBM, o controlo positivo foi o meio das respetivas células com 10% de FBS e o controlo negativo foi meio com 2% de FBS. A câmara de migração foi montada de acordo com as instruções do fabricante e o filtro de policarbonato com poros de 8 μ m (*Neuro Probe, Gaithersburg, USA*) foi revestido com 0,05 mg/mL de colagénio tipo I de cauda de rato (*BD, Biosciences, San Jose, USA*). As células na câmara de migração permaneceram na incubadora durante 14-17h no caso das MSCr e 3 h nos ensaios com HMVECs. As células que não migraram foram

removidas do filtro através de lavagens com PBS, enquanto que as células migradas foram fixadas com metanol, coradas com 500 nM de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e visualizadas e quantificadas no microscópio de fluorescência *Olympus BX51*.

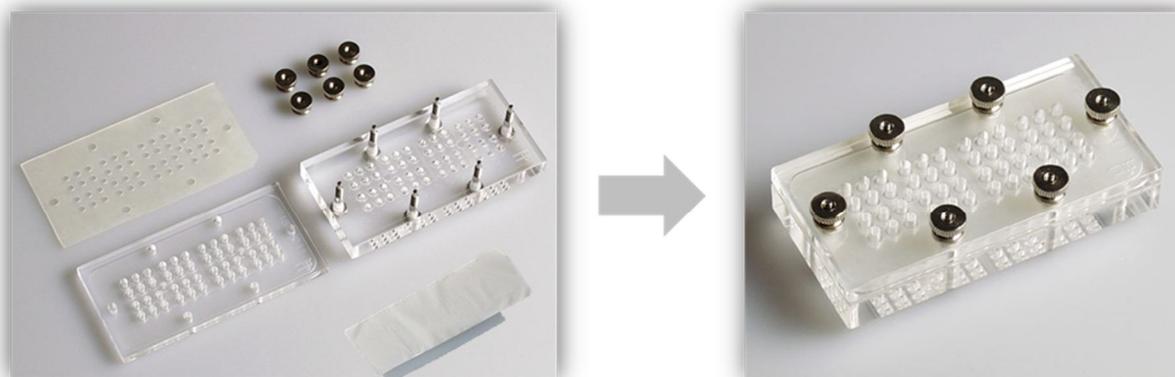


Figura 2.2: Componentes e montagem da câmara de Neuro Probe AP48, usada nos ensaios de migração celular.

2.6 Avaliação da capacidade de regeneração óssea dos produtos de degradação de UBM incorporados num hidrogel de dextrino

O hidrolisado total de UBM foi utilizado em ensaios *in vivo*, para avaliar o potencial das matricinas de UBM na regeneração de pequenos defeitos ósseos. Para tal, a fração total de UBM foi incorporada num hidrogel de dextrino, recentemente desenvolvido e caracterizado pelo grupo de trabalho (Molinos *et al.*, 2012). Os ensaios *in vivo* foram efetuados em coelhos machos *New Zealand*, com peso médio de 3,5 kg.

2.6.1 Preparação do hidrogel de dextrino com produtos de degradação de UBM incorporados

O dextrino (amido Koldex 60, oferecido por Tate & Lyle) foi primeiramente oxidado (oDex) com periodato de sódio e, em seguida, reticulado com dihidrazida de ácido adípico (ADH) de acordo com o procedimento descrito por Molinos *et al.*, 2012. Sumariamente, soluções aquosas de dextrino (2% p/v) foram oxidadas com 2 mL de solução m-periodato de sódio, à temperatura ambiente, sob agitação, no escuro. A reação de oxidação foi parada, ao fim de 20 h, com a adição de uma quantidade equimolar de dietilenoglicol, para reduzir o periodato que não reagiu. A solução resultante foi dialisada, utilizando uma membrana de diálise com MWCO de 1 kDa, e por fim liofilizada. O oDex liofilizado foi dissolvido em PBS (30% p/v), à temperatura ambiente, e adicionado uma solução de ADH (5% em base molar, tendo em conta o número de resíduos de glicose no dextrino original). Na preparação de oDex contendo o hidrolisado total de UBM (oDex-UBM), a UBM Total foi dissolvida na solução de ADH, de forma a obter hidrogéis com 4 mg/mL de UBM. A reação de reticulação decorreu durante 2 h.

2.6.2 Ensaios *in vivo*

Todos os procedimentos experimentais em animais foram aprovados pelo Comité de Cuidados e Utilização de Animais da Universidade Complutense e do Hospital Clínico de *San Carlos* (Madrid, Espanha), de acordo com as diretrizes para o cuidado ético de experimentação animal da Comunidade Europeia.

Os coelhos foram anestesiados por injeção intramuscular de *Rompun 2%* (*Xylacine* 1 mL/10 kg, *Bayer*) e *Imalgene 1000* (cetamina 20 mg/kg, *Meria*). Depois, a área cirúrgica foi raspada e lavada com uma solução anti-sética (Betadine, 10% de povidona de iodo, *Meda Manufacturing, France*). Foi feita uma incisão no perióstio da meseta tibial e, seguidamente, o osso foi perfurado (diâmetro de 4 mm) e uma amostra de hidrogel (oDex e oDex-UBM) foi inserida no defeito. Passadas três semanas, os coelhos foram sacrificados e as amostras foram dissecadas e fixadas em solução de formalina para os estudos histológicos.

2.6.3 Análise histológica

As amostras foram descalcificadas com 10% de ácido nítrico durante 7 dias. Após a desidratação, as amostras descalcificadas foram embebidas em parafina e seccionadas longitudinalmente para o estudo histológico. Foi realizada a coloração de *Masson's trichrome* e as lâminas coradas foram visualizadas no microscópio *Olympus BX51*.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Alguns estudos têm demonstrado que a regeneração de tecidos no local de implante dos *scaffolds* de MEC descelularizada se deve aos produtos resultantes da degradação do *scaffold*. Desde então, têm sido publicados vários artigos, onde foram estudadas as propriedades bioativas desses produtos obtidos por métodos de degradação *in vitro*. Tais produtos de degradação têm mostrado capacidade para recrutar células estaminais/progenitoras para o local do implante e de modular o destino celular (migração, proliferação e diferenciação). Neste sentido, é importante obter diferentes frações desses produtos de degradação e analisar a bioatividade dessas frações, de forma a melhor compreender o mecanismo de regeneração quando a MEC é usada como *scaffold* e alcançar os objetivos a longo prazo de identificação de matricinas com potenciais implicações terapêuticas no âmbito da medicina regenerativa/engenharia de tecidos.

A degradação *in vitro* da MEC tem sido efetuada por diferentes métodos: desde o uso de ácido e de temperaturas extremas (Sarikaya *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2006) até à utilização de diferentes enzimas. O método químico e térmico não é fisiologicamente relevante, enquanto a degradação enzimática mimetiza melhor a degradação *in vivo* dos *scaffolds* de MEC. As enzimas descritas na literatura para a digestão da MEC são a pepsina (Brennan *et al.*, 2008; Reing *et al.*, 2009; Agrawal *et al.*, 2010; Vorotnikova *et al.*, 2010; Tottey *et al.*, 2011a; Tottey *et al.*, 2011b), a colagenase (Demidova-Rice *et al.*, 2011; Tottey *et al.*, 2011a) e a papaína (Reing *et al.*, 2009). De entre estas enzimas, a pepsina é quem apresenta o processo de inativação enzimática mais simples e económico.

Com base na literatura, constata-se que independentemente da origem da MEC e da enzima usada na hidrólise conseguem-se obter inúmeros péptidos com uma enorme variabilidade de pesos moleculares, que apresentam, no entanto, perfis de bandas diferentes (Brennan *et al.*, 2008; Freytes *et al.*, 2008; Demidova-Rice *et al.*, 2011; Tottey *et al.*, 2011a).

3.1 Caracterização das frações dos produtos de degradação da matriz extracelular

Neste estudo, pretendeu-se obter diferentes frações do hidrolisado inicial de UBM digerida com pepsina para avaliar e comparar a bioatividade mitogénica e quimiotática dessas frações. Para tal, começou-se por centrifugar o hidrolisado inicial (UBM Total), tendo-se obtido as frações solúvel e insolúvel. Segundo Freytes e seus colaboradores, no final da digestão, a UBM deveria estar solubilizada (Freytes *et al.*, 2008), contudo isso não foi verificado nas digestões realizadas neste trabalho, sendo visíveis partículas de UBM no final da digestão enzimática. Isto poderá ser devido ao facto de não se ter pulverizado convenientemente a UBM antes da hidrólise (**Figura 3.1**), como descrito na literatura (Li *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2006; Brennan *et al.*, 2008; Freytes *et al.*, 2008; Reing *et al.*, 2009; Agrawal *et al.*, 2010; Tottey *et al.*, 2011a). Assim, a UBM tal como foi usada poderia ter dificultado a acessibilidade da enzima aos locais de clivagem e a subsequente solubilização dos componentes da MEC. Ainda assim, a fração solúvel representa cerca de $80 \pm 7\%$ da UBM total.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

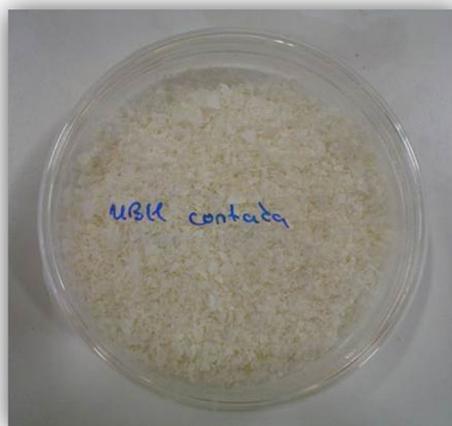


Figura 3.1: Aspeto final da UBM após o corte em pequenos pedaços.

A fração solúvel foi fracionada por ultrafiltração, utilizando uma membrana com MWCO de 30 kDa. Daqui resultou uma fração de péptidos com peso molecular superior a 30 KDa e outra de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa. Na **Tabela 3.1** apresentam-se os resultados obtidos numa digestão, cuja fração solúvel foi sujeita à ultrafiltração. Durante este processo houve perdas significativas, tendo-se obtido no final 34,2 mg da fração de péptidos com peso molecular superior a 30 KDa, partindo de cerca de 133 mg de material inicial. Esta fração foi analisada por eletroforese, tendo-se observado inúmeras bandas correspondentes a proteínas com peso molecular inferior a 30 KDa (**Figura 3.2 (A)**). Este resultado sugeriu que a fração não se encontrava devidamente lavada, tendo-se procedido então a uma nova lavagem do retentado. No final dessa lavagem, obteve-se 4 mg de fração de péptidos com peso molecular superior a 30 KDa, todavia continuava-se a visualizar no gel bandas proteicas abaixo de 30 KDa (**Figura 3.2 (C)**). Assim, devido às perdas de material associadas ao processo de ultrafiltração, à morosidade desse processo e dificuldade em obter uma fração de péptidos de peso superior a 30 KDa pura, esta fração acabou por não ser testada *in vitro*.

Tabela 3.1: Massas obtidas em cada fração, após o fracionamento do hidrolisado inicial.

UBM (mg)	Pepsina (mg)	Massa Total (mg)	Fração	Massa Liofilizada (mg)	Massa Total Liofilizada (mg)
			Insolúvel	36,3	
153,6	16,0	169,6	>30 KDa	34,2	117
			<30 KDa	46,5	

Durante a digestão da UBM com pepsina, foi feito um controlo em que não foi adicionada pepsina. A análise eletroforética por SDS-PAGE deste controlo mostrou que a UBM em solução liberta proteínas/péptidos com uma enorme gama de pesos moleculares (**Figura 3.2 (B)**). Por observação do gel (**A**) da **Figura 3.2**, verifica-se que no final da digestão, o hidrolisado resultante (fração de UBM Total) apresenta bandas fortemente coradas acima dos 100 KDa, tal como observado por Freytes *et al.*, 2008;

já a fração solúvel contém péptidos essencialmente abaixo dos 75 KDa. No gel de Tricina-SDS-PAGE (**Figura 3.2 (B)**), está evidenciada uma forte presença de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa, demonstrando que a utilização da pepsina permite obter péptidos de baixo peso molecular, tal como o método químico e térmico (Li *et al.*, 2004), com a vantagem de se usar um método mais apropriado do ponto de vista fisiológico. Esta evidência é particularmente importante, na medida em que as matricinas já conhecidas apresentam essencialmente baixos pesos moleculares, como já foi referido anteriormente.

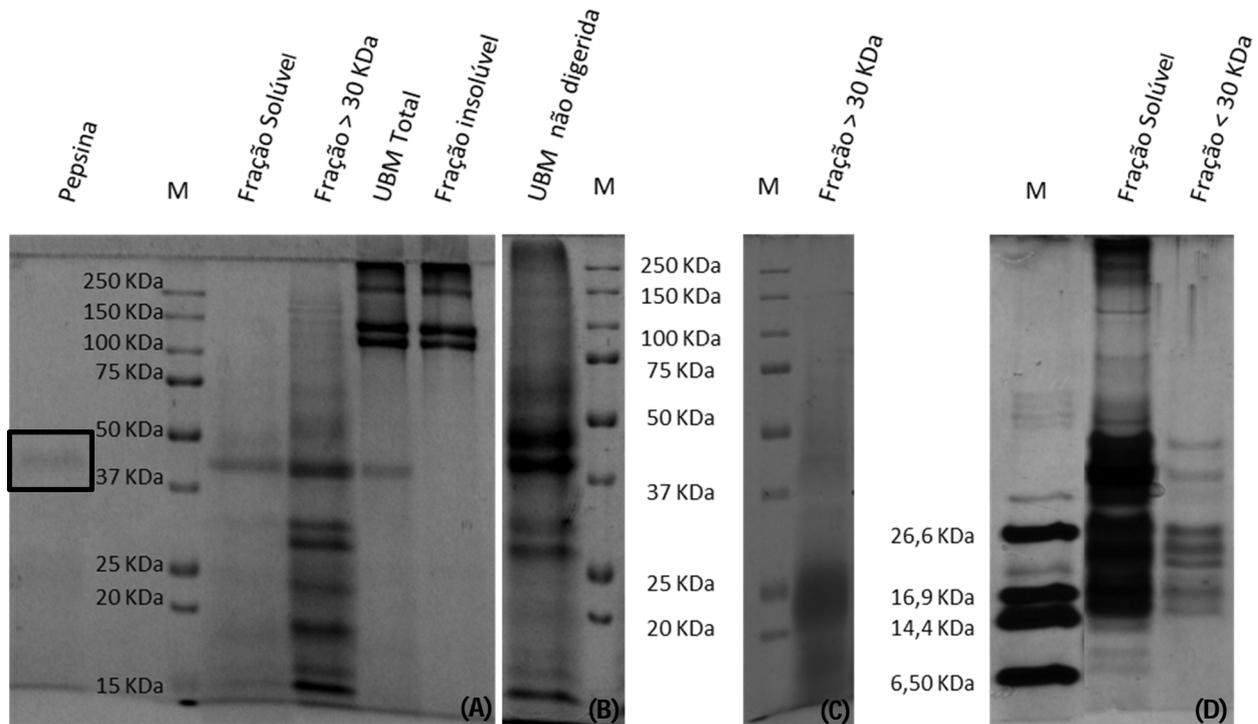


Figura 3.2: Análise, por eletroforese em condições desnaturantes, dos produtos de degradação da matriz extracelular da bexiga de porco (UBM) com pepsina, bem como das frações obtidas por centrifugação e ultrafiltração do hidrolisado inicial. **M** representa o marcador de pesos moleculares (*Bio-Rad*). Géis de SDS-PAGE 10% (p/v) de poliacrilamida corados com azul de *Coomassie*: **(A)** O retângulo indica a banda correspondente à pepsina; **(B)** Representa o perfil proteico da UBM no final da digestão, na ausência de pepsina (controlo negativo) e **(C)** Representa o perfil proteico da fração de péptidos superior a 30 KDa, após a segunda lavagem do retentado. **(D)** Gel de Tricina-SDS-PAGE 16,5% (p/v) de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.

O urotélio da bexiga de porco consiste essencialmente em glicosaminoglicanos sulfatados, que podem modular a elasticidade, as interações celulares, a migração e a diferenciação celular e ajudam a prevenir infeções bacterianas na bexiga (Aitken & Bagli, 2009). Além disso, já foram identificadas matricinas provenientes de glicosaminoglicanos, (Horton *et al.*, 1999; Sottile, 2004). Neste trabalho, os GAG-S foram quantificados em cada fração de UBM obtida, apresentando-se os resultados na **Tabela 3.2**.

Analisando os resultados da **Tabela 3.2**, verifica-se que o conteúdo de GAG-S diminui bastante à medida que o peso molecular das frações diminui, sendo inclusive quase inexistentes na fração

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ultrafiltrada com peso molecular inferior a 30 KDa. Os GAG-S encontram-se covalentemente ligados a determinadas proteínas via resíduos de serina, formando proteoglicanos sulfatados (Schaefer & Schaefer, 2010). Na membrana basal, os proteoglicanos maioritários apresentam proteínas de peso molecular compreendido entre 100-500 KDa (Iozzo, 1998), pelo que a presença de GAG-S poderá ter afetado a exposição dos locais de hidrólise da pepsina, verificando-se, por isso, uma baixa quantidade de GAG-S na fração de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa e um enriquecimento de GAG-S na fração insolúvel.

Tabela 3.2: Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados nas diversas frações de UBM obtidas. Os resultados encontram-se expressos em média \pm desvio padrão.

Fração	$\mu\text{g GAG-S/ mg Fração Liofilizada}$
UBM Total	$4,01 \pm 0,03$
Fração Insolúvel	$14,8 \pm 0,90$
Fração Solúvel	$6,35 \pm 0,03$
Fração < 30 KDa	$1,10 \pm 0,08$

3.2 Avaliação *in vitro* da bioatividade das frações de UBM hidrolisada

Estudos anteriores têm mostrado que os péptidos bioativos obtidos por diferentes métodos de degradação da MEC (química, enzimática e térmica) possuem atividade quimiotática (Li et al., 2004; Brennan et al., 2008; Reing et al., 2009; Agrawal et al., 2010; Vorotnikova et al., 2010; Tottey et al., 2011a & b), mitogénica (Reing et al., 2009; Vorotnikova et al., 2010; Tottey et al., 2011a & b) e antimicrobiana (Sarikaya et al., 2002; Brennan et al., 2008). Neste trabalho foram apenas analisados os efeitos mitogénico, pelo método de MTT, e quimiotático, através da câmara da Neuro Probe AP48, das diferentes frações de UBM sobre os fibroblastos e as MSCr.

3.2.2 Avaliação da atividade mitogénica das frações de UBM

O efeito mitogénico dos produtos de degradação da fração de UBM Total, da fração solúvel e da fração de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa foi avaliado nos fibroblastos, utilizando concentrações na gama de 1 a 200 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos demonstraram que somente a fração de UBM Total afeta de modo significativo o crescimento dos fibroblastos. Pela observação da **Figura 3.3 (A)**, verifica-se que a presença dos produtos de degradação da UBM Total reduz a proliferação das células relativamente ao controlo, nomeadamente a partir das 48 h. Todavia, de acordo com a análise estatística feita, a inibição da proliferação apenas foi significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Os produtos de degradação da fração solúvel e de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa induzem a proliferação celular às 48 h, sendo este efeito maior na fração com péptidos de peso molecular inferior a

30 KDa (**Figura 3.3 (B)**) e inibem a proliferação às 72 h, sendo este efeito mais acentuado na fração solúvel (**Figura 3.4 (B)**). Contudo, a análise estatística feita ao crescimento celular apenas em função da concentração revela que tais frações, nas concentrações analisadas, não afetam a capacidade proliferativa dos fibroblastos ($p>0,05$).

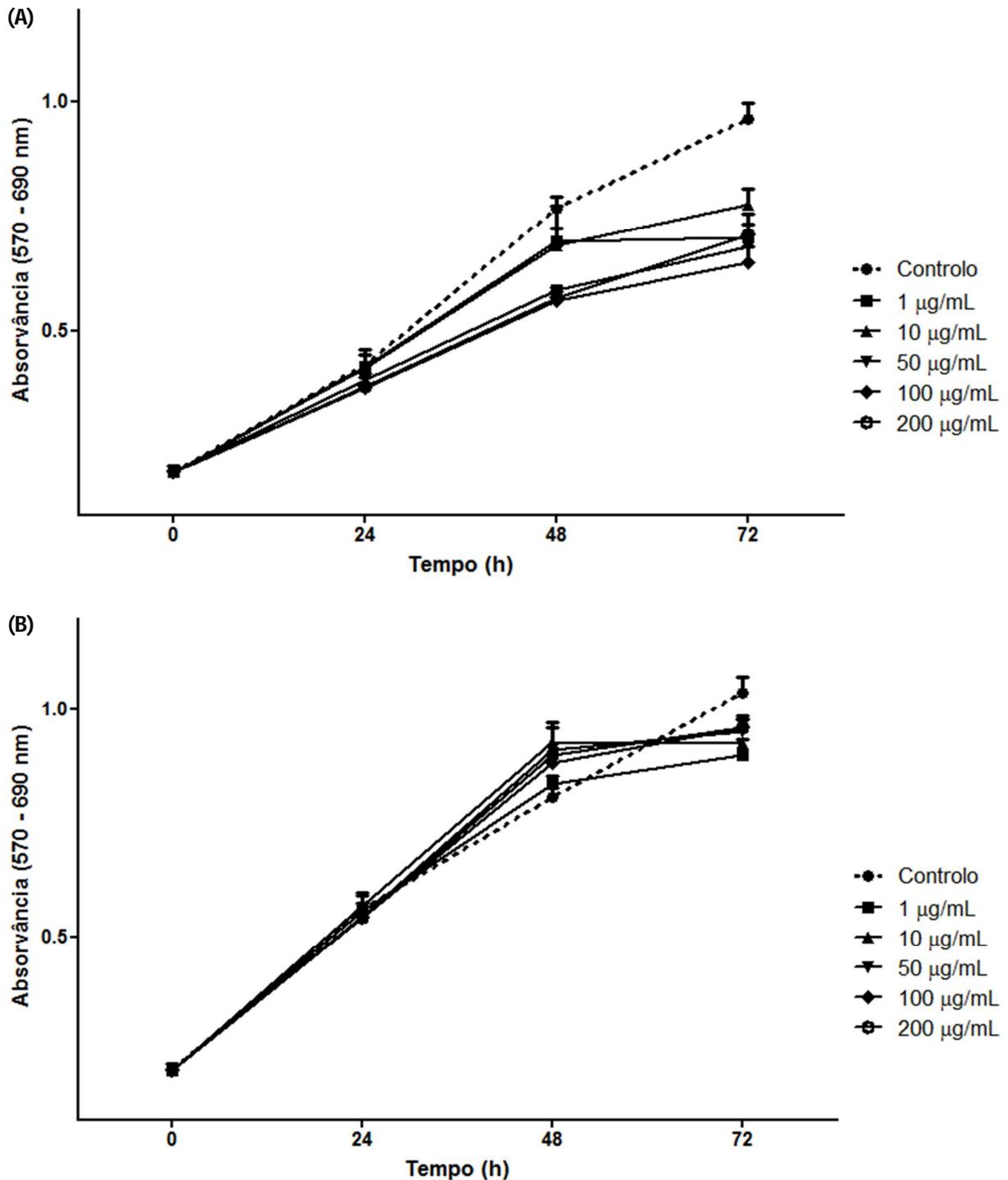


Figura 3.3: Efeito de diferentes concentrações de fração de UBM Total **(A)** e da fração contendo péptidos com pesos moleculares inferior a 30 KDa **(B)** na proliferação dos Fibroblastos 3T3, em meio contendo 10% de CALF. A proliferação foi medida pelo ensaio de MTT, ao longo de 72 h. Os valores encontram-se expressos em média \pm desvio padrão e a linha tracejada corresponde ao controlo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios efetuados com a fração solúvel foram usados meios com diferentes percentagens de soro: 2 e 10%. A utilização de meio contendo 2% de CALF serviu para averiguar se os componentes do soro interferiam com a atividade dos produtos de degradação da UBM. Os resultados mostraram que, apesar de o comportamento de crescimento dos fibroblastos diferir, em ambos os casos as concentrações de fração solúvel testadas não possuem efeito nem indutor, nem inibidor sobre proliferação ($p>0,05$), pelo que o soro não parece interferir no efeito mitogénico dos produtos de degradação da UBM (**Figura 3.4**).

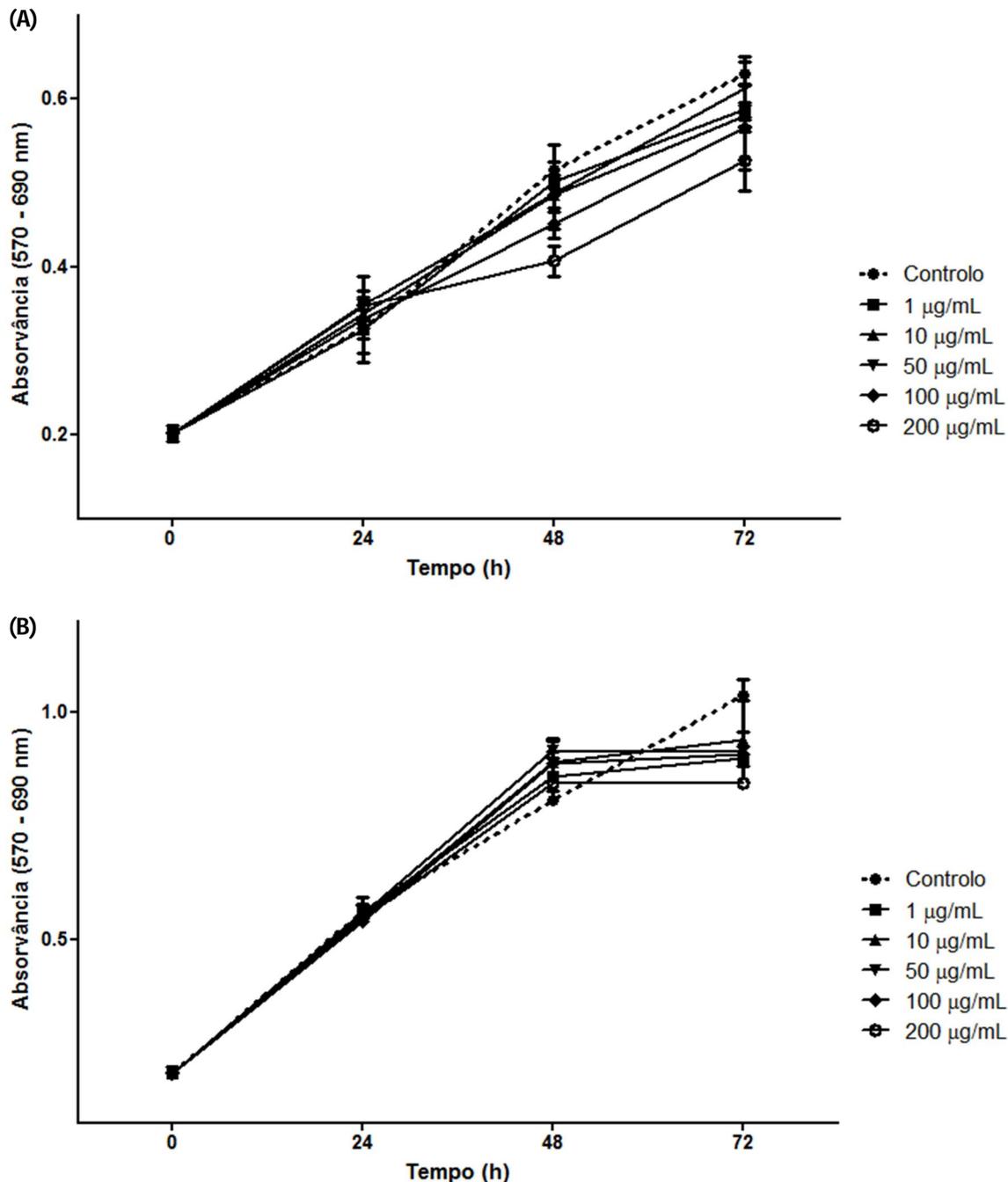


Figura 3.4: Efeito das diferentes concentrações da fração solúvel na proliferação dos Fibroblastos 3T3, em meio contendo 2% de CALF **(A)** e 10% de CALF **(B)**. A proliferação foi medida pelo ensaio de MTT, ao longo de 72 h. Os valores encontram-se expressos em média \pm desvio padrão e a linha tracejada corresponde ao controlo.

Os resultados obtidos com os fibroblastos sugerem que a fração insolúvel da UBM total (que não está presente nas duas outras frações analisadas) afeta negativamente o crescimento destas células.

Badylak e seus colaboradores digeriram a UBM de porco e a MEC produzida por células blastemais de MRL com pepsina e analisaram a atividade mitogénica do hidrolisado total em células endoteliais diferenciadas. Os resultados revelaram que, ao fim de três dias do ensaio de proliferação, os produtos de degradação de UBM (78,9 µg/mL) diminuíram a proliferação das células endoteliais em cerca de 46% (Reing *et al.*, 2009) e o hidrolisado da MEC de células blastemais em concentrações entre 39-115 µg/mL inibiu igualmente a proliferação destas células em 20% (Vorotnikova *et al.*, 2010). Neste estudo, os produtos de degradação da fração de UBM total nas concentrações analisadas induziram uma redução na proliferação de fibroblastos em cerca de 20 a 33%, ao fim de 72 h de incubação. Um traço comum entre as células endoteliais e os fibroblastos é o facto de serem células diferenciadas, sugerindo, assim, que os produtos de degradação da MEC poderão não exercer um efeito pró-mitogénico sobre células diferenciadas.

Os *scaffolds* de MEC têm mostrado capacidade para recrutar células derivadas da medula óssea, que por sua vez participam na remodelação *in vivo* do tecido a longo prazo (Badylak *et al.*, 2001; Zantop *et al.*, 2006). A demonstração de que as células estaminais participam ativamente na remodelação de tecidos, podendo ser as responsáveis pela prevenção da formação de tecido cicatricial em lesões nos mamíferos sem capacidade regenerativa, levou a analisar o efeito mitogénico e quimiotático dos produtos de degradação da UBM sobre as MSCr. A proliferação das MSCr na presença dos produtos das frações solúvel e de peso molecular inferior a 30 KDa foi avaliada com concentrações na gama de 125 a 750 µg/mL. De referir que os resultados seguidamente apresentados e discutidos resultam de um ensaio preliminar.

Os produtos de degradação da UBM da fração solúvel influenciaram negativamente a capacidade proliferativa das MSCr, enquanto os da fração de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa não afetaram de modo estatisticamente significativo o crescimento destas células (**Figura 3.5**). Em relação à fração solúvel, a concentração de 125 µg/mL não reduziu significativamente a proliferação das MSCr ($p>0,05$), a concentração de 250 µg/mL causou uma diminuição significativa ($p<0,05$) e as concentrações de 500 e 750 µg/mL inibiram a proliferação celular muito significativamente ($p<0,01$). Estes resultados sugerem que a fração solúvel poderá conter péptidos, que não estão presentes na fração de produtos de degradação com peso molecular inferior a 30 KDa, que afetam mais o crescimento das MSCr.

Resultados contrários foram verificados para as células blastemais de MRL, em que os produtos de degradação da UBM aumentaram a proliferação em 67%, em resposta a 78,9 µg proteína/mL do hidrolisado (Reing *et al.*, 2009). Também *Totley et al.* verificaram que os produtos de degradação da SIS-

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

MEC aumentam a proliferação de células estaminais perivasculares (Tottey *et al.*, 2011a), que evidenciam ser as células precursoras das MSCs (Crisan *et al.*, 2008).

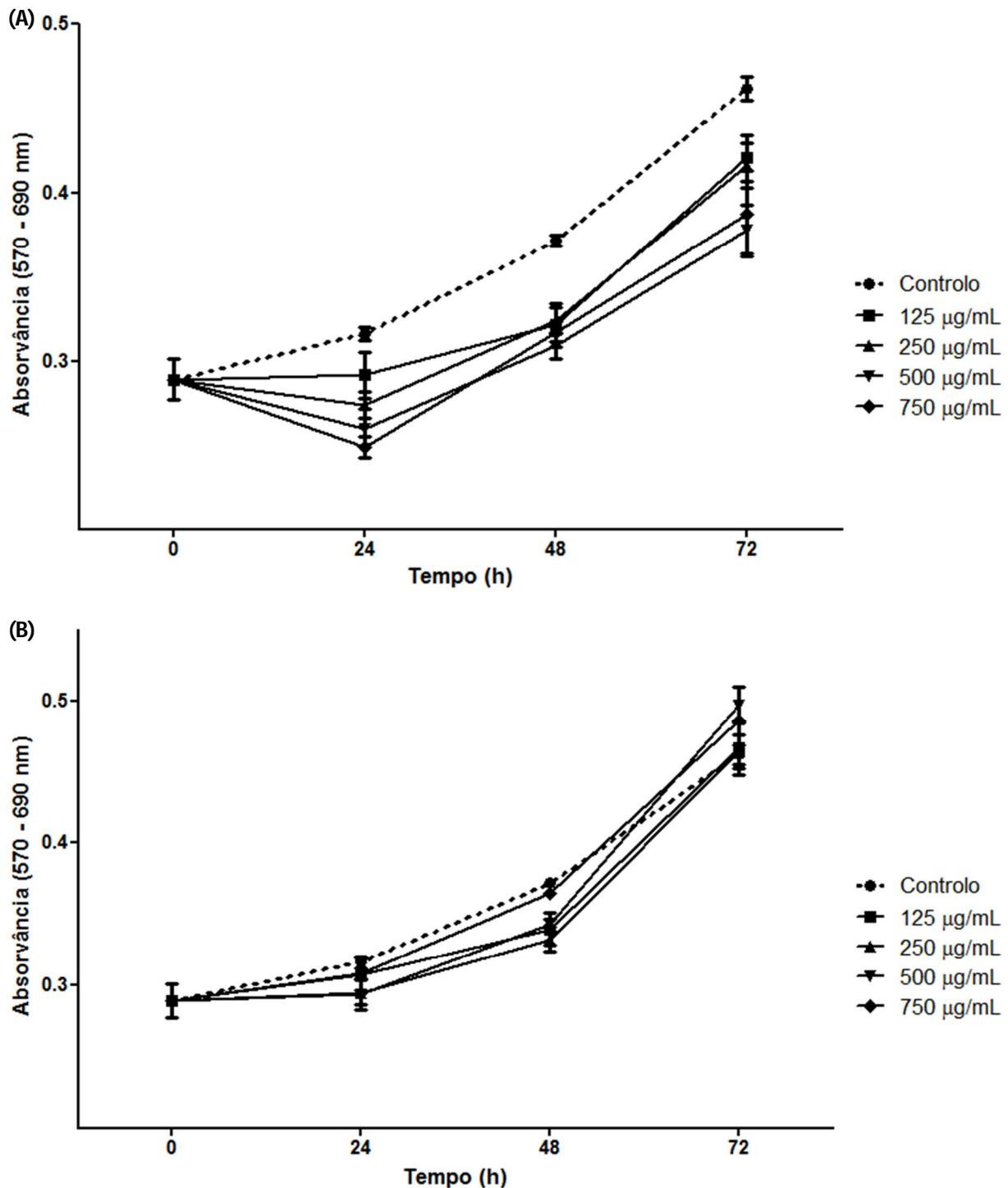


Figura 3.5: Efeito de diferentes concentrações de fração solúvel **(A)** e de fração inferior a 30 kDa **(B)** na proliferação das MSCr, em meio contendo 10% de FBS. A proliferação foi medida pelo ensaio de MTT, ao longo de 72 h. Os valores encontram-se expressos em média \pm desvio padrão e a linha tracejada corresponde ao controlo.

Os resultados obtidos com as MSCr podem dever-se ao facto de os produtos de degradação estarem a induzir a diferenciação celular, o que conduz a uma redução na taxa de proliferação (Teo &

Kahn, 2010). As MSCr podem diferenciar-se em diversos tipos celulares, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, miócitos, cardiomiócitos hepatócitos e neurónios (Gnecchi & Melo, 2009). Estudos levados a cabo por Penolazzi e seu colaboradores, mostraram que os *scaffolds* de UBM afetam positivamente a expressão de marcadores osteoblásticos em MSCs da geleia de *Worton* do cordão umbilical humano (hWJMSC) (Penolazzi *et al.*, 2012). Assim, estudos de diferenciação osteogénica utilizando os produtos de degradação da UBM no meio de cultura, deverão ser realizados para se avaliar este efeito. Inclusive, foi recentemente identificada uma matricina de doze aminoácidos derivada do telopéptido C-terminal do colagénio III α (obtida pela degradação enzimática da UBM com pepsina) (Agrawal *et al.*, 2011a) que acelerou a diferenciação osteogénica de células perivasculares humanas. Além disso, estudos *in vivo* mostraram que o mesmo péptido promove a formação óssea (Agrawal *et al.*, 2011b).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que durante a degradação da MEC poderão ser libertadas várias matricinas com ação pró- e anti-mitogénica e neutra, cujo efeito final é o resultado global das interações entre essas moléculas. Assim, as frações que exibiram efeito inibitório sobre a proliferação celular podem estar mais enriquecidas com matricinas anti-mitogénicas, ou então, a sobreposição da ação anti-mitogénica pode dever-se não à quantidade de matricinas que exibam essa propriedade, mas sim à potência do efeito dessas matricinas e eventuais efeitos sinérgicos. Já a ausência de resposta mitogénica por parte de algumas frações de UBM sobre os fibroblastos e as MSCr sugere que tais frações poderão não conter matricinas que modelem a proliferação nestas células e/ou a coexistência de matricinas com ação pró- e anti-mitogénica poderá levar a uma anulação mútua desse efeito. Também Agrawal e seus colegas fracionaram os produtos da degradação enzimática da UBM com pepsina, utilizando outros métodos de separação e purificação (precipitação com sulfato de amónia e diversas técnicas cromatográficas), e verificaram que diferentes frações exibiram diferentes efeitos quimiotáticos, sugerindo que os produtos da MEC também poderão conter péptidos pró- e anti-quimiotáticos e até péptidos neutros (Agrawal *et al.*, 2011a).

Embora neste trabalho o objetivo fosse avaliar o efeito de matricinas resultantes da degradação da UBM, os fatores de crescimento também podem ter tido um papel relevante nos resultados obtidos, já que foram identificados noutros estudos onde se realizaram ensaios de proliferação. Na UBM de porco foram identificados diversos fatores de crescimento, sendo os mais predominantes o VEGF, o KGF (fator de crescimento de queratinócitos) e o PDGF-BB (fator de crescimento derivado de plaquetas-BB). Os fatores de crescimento identificados apresentaram bioatividade após a descelularização e estão associados à proliferação, migração e diferenciação celulares, à angiogénese e à regeneração de tecidos (Chun *et al.*, 2007). Entretanto, Tottey e seus colaboradores consideram que é improvável que algum fator de crescimento permaneça ativo, após a digestão com pepsina (Tottey *et al.*, 2011a). Porém, Onda *et al.*, mostrou que a heparina presente na MEC liga-se e protege os fatores de crescimento da degradação/desnaturação causada pelo calor (60, 90°C), da digestão enzimática (tripsina e

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

quimiotripsina) e de pH extremos (pH 2 ou 9) (Onda *et al.*, 1990). Neste sentido, estudos que pretendem estudar *in vitro* os produtos que se libertam durante a degradação dos *scaffolds* de MEC, ou seja, as matricinas e os fatores de crescimento, adicionam heparina na solução de digestão da MEC, para proteger os fatores de crescimento da inativação pela pepsina (Vorotnikova *et al.*, 2010). No estudo de Vorotnikova *et al.*, os produtos de degradação do hidrolisado da MEC de células blastemais (incluindo os fatores de crescimento presentes, que apresentaram bioatividade), em concentrações entre 39-115 µg/mL induziram a proliferação de células blastemais em mais de 60%. Assim, a falta de alguns fatores de crescimento nas frações de UBM analisadas, pode estar na origem da falta de atividade proliferativa verificada neste trabalho.

Outro ponto que poderá ser importante é a adesão das células plaqueadas. Num estudo de Chun e seus colaboradores, verificou-se que há aumento da proliferação celular quando a lâmina própria da bexiga de porco descelularizada, sem ser previamente digerida, é misturada com as células aquando o plaqueamento destas. Estes resultados poderão ser devido às moléculas de adesão como o colagénio, laminina, elastina, entre outras, presentes na lâmina própria. A coexistência de fatores de crescimento e moléculas de adesão podem acelerar a proliferação celular (Chun *et al.*, 2007). Pode-se especular que os derivados destas proteínas de adesão, mantenham as mesmas propriedades na mistura hidrolisada e facilitem a proliferação. Assim, estudos de proliferação, adicionando os produtos de degradação da UBM às células quando estas estão a ser plaqueadas poderão ser realizados para se comprovar ou não estas suposições.

3.2.3 Avaliação da atividade quimiotática das frações de UBM

Os ensaios de migração foram efetuados na câmara da Neuro Probe AP48. No entanto, não se apresentam os resultados obtidos, uma vez que as condições do ensaio terão que ser otimizadas. De referir ainda que as HMVECs também foram usadas na otimização deste ensaio.

A câmara da Neuro Probe AP48 apresentou algumas limitações. As membranas não apresentam marcação visível dos poços, dificultando a contagem das células ao microscópio em cada poço. Para contornar este problema, os poços foram manualmente marcados, enquanto era visível a delimitação do poço, causada pela pressão que as câmaras superior e inferior exercem sobre a membrana. Outro grande problema é a formação de bolhas aquando a colocação da membrana. A presença destas impede o contacto do meio com a membrana, afetando a migração celular. O aumento do volume de meio colocado nos poços inferiores de 25 µL (referido nas instruções do kit) para 32 µL reduziu o número de poços com bolhas.

Ultrapassadas as principais barreiras, foram efetuados ensaios com a fração solúvel e controlos positivo e negativo. No final, não se observavam células migradas, nem no controlo positivo. Este resultado pode ser devido às MSCr, que poderiam não estar nas melhores condições (bioquímicas e

fisiológicas), ou então as células podem não se conseguirem aderir à membrana, ou ainda, as condições do ensaio não foram as mais adequadas.

Resultados obtidos em estudos *in vitro* têm suportado a ideia de que o mecanismo de remodelação do *scaffold* de MEC envolve o recrutamento de células estaminais/progenitoras endógenas por parte dos produtos de degradação do *scaffold* (Li *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2008; Reing *et al.*, 2009; Tottey *et al.*, 2011a). No entanto, ainda não está esclarecido se na degradação *in vivo* dos *scaffolds* de MEC resultam os mesmos péptidos obtidos no processo de degradação artificial da mesma (por exemplo, digestão com pepsina). Neste sentido, ensaios de migração *in vitro* com as MSCs seriam importantes para averiguar se se pode estabelecer uma ligação entre os estudos da atividade quimiotática *in vitro* e *in vivo*, dado que estudos *in vivo* já demonstraram que os *scaffolds* de MEC são capazes de recrutar células derivadas da medula óssea para o local do implante (Badylak *et al.*, 2001; Zantop *et al.*, 2006).

3.3 Avaliação da capacidade de regeneração óssea dos produtos de degradação da UBM incorporados num hidrogel de dextrino em mamíferos adultos

Algumas publicações demonstraram que os produtos de degradação da MEC promovem a angiogénese *in vivo* (Li *et al.*, 2004) e que desempenham um papel importante no recrutamento de células estaminais progenitoras endógenas e na regeneração do tecido/órgão danificado (Agrawal *et al.*, 2010; Vorotnikova *et al.*, 2010). Neste trabalho, o hidrolisado total de UBM foi testado em pequenos defeitos ósseos criados na tibia de coelhos machos *New Zealand*, para verificar quer a sua biocompatibilidade, bem como, a sua capacidade para promover a regeneração óssea. Para tal, a fração de UBM Total foi incorporada num hidrogel de dextrino oxidado com periodato de sódio e reticulado com ADH, numa concentração final de 4 mg/mL. Os coelhos adultos foram sacrificados três semanas depois de implantados com o hidrogel e foram realizadas análises histológicas nas zonas do defeito.

Uma das estratégias usadas para a regeneração do tecido ósseo passa pela utilização de hidrogéis. Estes, para além de serem porosos e poderem ser injetáveis, o que resulta num preenchimento mais eficiente do defeito ósseo, promovem a adesão, proliferação e diferenciação celulares (Drury & Mooney, 2003; Salgado *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Nesta estratégia, os hidrogéis apresentam normalmente moléculas ativas incorporadas, nomeadamente proteínas morfogénicas do osso (BMPs), de modo a aumentar a osteocondutividade e a osteoindutividade dos *scaffolds* (Drury & Mooney, 2003; Salgado *et al.*, 2004). Eles são particularmente interessantes neste âmbito devido à facilidade com que as moléculas ativas são dispersas na matriz, além de que podem igualmente ser incorporadas de um modo mais preciso e libertadas de forma controlada temporal e espacialmente (Salgado *et al.*, 2004; Hoare & Kohane, 2008; Geckil *et al.*, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de tratamento, nem o oDex nem o oDex-UBM desencadearam reacção inflamatória. Estes resultados eram expectáveis, dado que o dextrino tem demonstrado ser um polímero biocompatível e biodegradável (α -amilases) e é facilmente excretado graças ao seu baixo peso molecular, evitando a acumulação nos tecidos (Hreczuk-Hirst *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2010a; Carvalho *et al.*, 2010b; Gonçalves *et al.*, 2010; Hardwicke *et al.*, 2009). Particularmente, o oDex foi obtido sem a utilização de iniciadores químicos e o ADH é um agente de reticulação não tóxico. Este hidrogel apresentou boas propriedades mecânicas, mostrou-se degradável e quando em contacto directo com fibroblastos 3T3, não induziu a morte celular, nem inibiu a proliferação celular (Molinos *et al.*, 2012). No caso do oDex-UBM, os *scaffolds* de MEC xenogénica têm sido utilizados em inúmeros estudos pré-clínicos e clínicos sem evidências de reacções adversas ou de rejeição do *scaffold*. A sequência de aminoácidos e a estrutura quaternária de muitos componentes de MEC, como o colagénio, encontram-se altamente conservadas entre as espécies. Este elevado grau de homologia de sequência aminoacídica é uma das razões pelas quais a MEC xenogénica pode funcionar como um *scaffold* construtivo em humanos sem incitar uma reacção inflamatória destrutiva (Badylak *et al.*, 2004). Verificou-se ainda que a MEC derivada de tecidos de porco contém pequenas quantidades do epítipo galactose α 1,3-galactose (epítipo gal) (McPherson *et al.*, 2000). Este epítipo é expresso nas membranas celulares de mamíferos, excepto nas dos humanos, pelo que o contacto deste epítipo com as células humanas pode levar à rejeição do implante. Todavia, a presença do epítipo gal não induz uma resposta associada à rejeição do *scaffold* de MEC derivada de tecidos de porco (McPherson *et al.*, 2000; Raeder *et al.*, 2006). Outro aspeto interessante é o facto de o hospedeiro reconhecer a MEC derivada de tecidos de porco como um material não-endógeno e produzir anticorpos, porém esses anticorpos atuam sobre a via Th2, que está associada à aceitação de transplantes (Allman *et al.*, 2002). Além disso, as publicações de estudos *in vivo* onde os produtos de degradação da MEC foram diretamente aplicados no local lesado (sem recorrer a qualquer biomaterial transportador), não reportaram a ocorrência de reacções inflamatórias desencadeadas pelo hidrolisado de MEC (Agrawal *et al.*, 2010; Vorotnikova *et al.*, 2010).

Na avaliação histológica, três semanas depois da colocação do hidrogel (**Figura 3.6**), verificou-se que, no caso do oDex sem UBM, a região do defeito apresentava uma elevada densidade celular, apresentando uma estrutura mais semelhante à estrutura de osso esponjoso do que de osso compacto. Em relação ao oDex-UBM, os produtos de degradação da UBM também promoveram uma elevada celularização da zona lesada e aparentemente afetaram o comportamento das células no hidrogel, dado que se observa uma organização celular semelhante a células de cartilagem. A observação de uma estrutura semelhante à cartilagem poderá ser indicativo da formação de osso via processo endocondral. Neste processo, o osso é formado a partir de um molde cartilaginio, que sofrerá um processo de ossificação, obtendo-se no final um osso maduro (Seeley *et al.*, 2001). No entanto, estes resultados são preliminares e ensaios com maior duração deverão ser realizados para confirmar se há formação de tecido ósseo. Ainda assim, neste trabalho constatou-se que os hidrogéis podem ser facilmente

biofuncionalizados com os produtos de degradação da UBM, e que estes produtos promovem uma melhor organização das células no local do defeito.

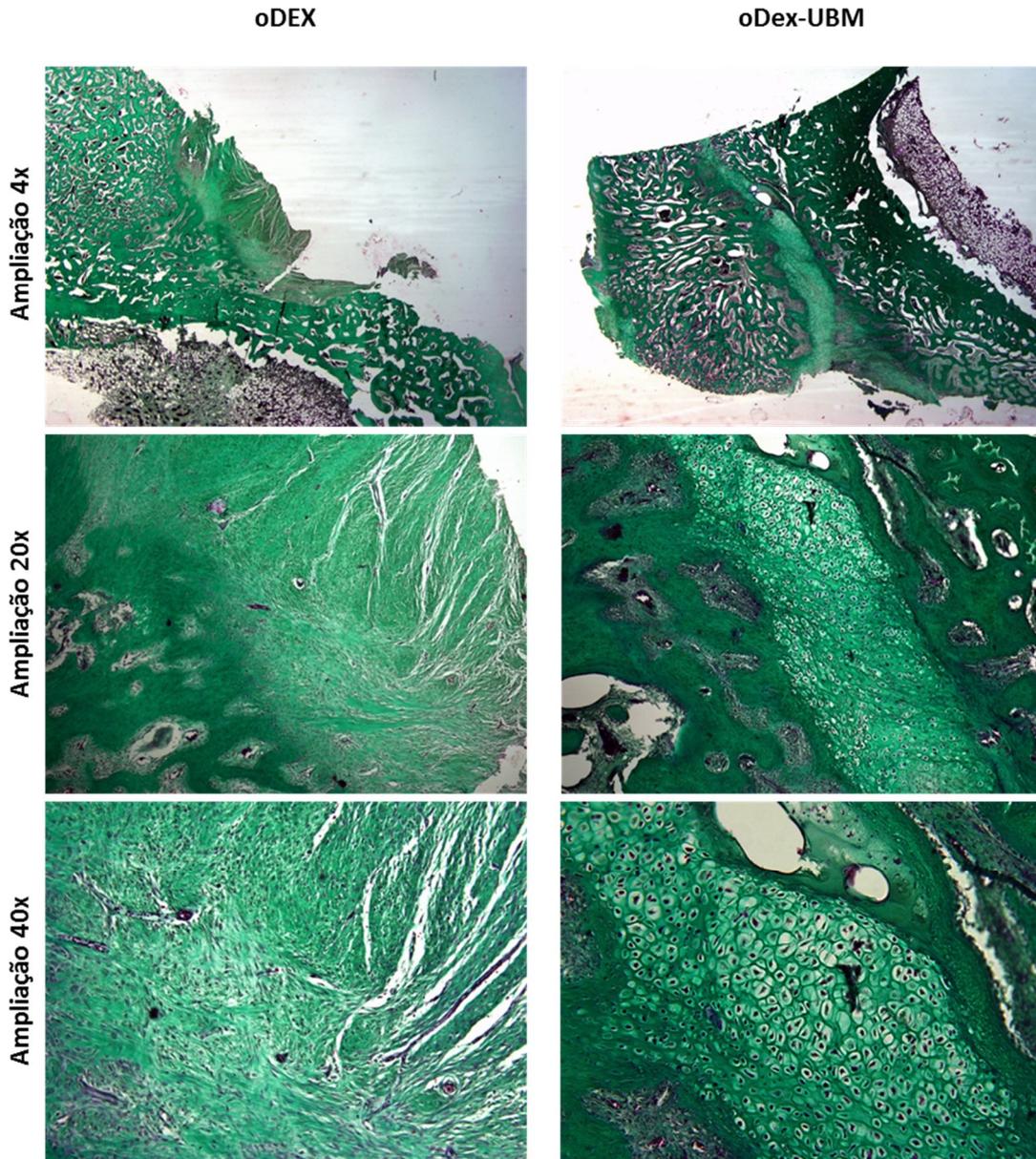


Figura 3.6: Imagens histológicas do local de implante do hidrogel coradas com *Masson's tricrome*. Foram criados pequenos defeitos ósseos na tíbia de coelhos machos *New Zealand*, e o local do defeito foi preenchido com oDex ou oDex-UBM. Os animais foram sacrificados três semanas depois do implante. Na ampliação de 40x é possível distinguir uma melhor organização celular do tecido, na presença do Odex-UBM, cujas células parecem-se com as células de cartilagem.

Recentemente foi identificada uma matricina resultante da degradação enzimática de UBM com atividade pró-osteogênica. Agrawal *et al.* aplicaram essa matricina em ratinhos C57/BL6 com metade do terceiro dedo amputado. Ao fim de 14 dias, as análises histológicas revelaram a presença de um nódulo ósseo no local de amputação, apenas nos animais tratados com a matricina, e que esta aumentou a deposição de cálcio nesse local. Verificaram ainda que a osteogênese *in vivo* se deu via processo de ossificação endocondral (Agrawal *et al.*, 2011b).



4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS



Os *scaffolds* de MEC descelularizada têm sido utilizados em inúmeras aplicações da medicina regenerativa para facilitar a remodelação construtiva de tecidos e órgãos. O mecanismo pelo qual a resposta de remodelação ocorre ainda não está totalmente compreendida, mas estudos recentes sugerem que as matricinas ativadas durante a degradação do *scaffold* terão um papel crucial. Em estudos *in vitro*, o conjunto total de matricinas resultantes da degradação da MEC parece afetar a migração, a proliferação e a diferenciação de células estaminais/progenitoras e de células diferenciadas, enquanto os estudos *in vivo* demonstram a capacidade destes produtos para promover a angiogénese e o recrutamento de células estaminais/progenitoras para o local lesado e a indução da cura regenerativa.

O presente estudo apresenta-se como um dos primeiros trabalhos sobre a avaliação da bioatividade de diferentes frações de produtos de degradação da MEC descelularizada. Até agora, apenas dois trabalhos foram publicados: *Li et al.* analisaram a atividade quimiotática *in vivo* e *in vitro* de uma fração de péptidos bioativos com pesos moleculares entre 5 a 16 KDa resultantes da hidrólise ácida e térmica da SIS-MEC (*Li et al.*, 2004) e mais recentemente Agrawal e seus colegas testaram a atividade quimiotática *in vitro* de diversas frações de UBM, obtidas através de várias técnicas de separação, como a precipitação proteica com sulfato de amónio e cromatografias de exclusão molecular, de troca iónica e de fase reversa (*Agrawal et al.*, 2011a). Todos os restantes estudos utilizaram o hidrolisado total. No que se refere aos ensaios *in vivo*, até então, não foi publicado nenhum trabalho que estude as propriedades osteogénicas de hidrolisados de MEC, nem o seu potencial para a biofuncionalização de *scaffolds*.

Neste trabalho, conseguiu-se obter produtos de degradação da UBM com pesos moleculares entre 6 e 250 KDa, utilizando para tal um método mais relevante do ponto de vista fisiológico, a hidrólise enzimática. O hidrolisado total de UBM foi fracionado por forma a obter frações de péptidos com pesos moleculares sucessivamente mais pequenos (fração de UBM Total, fração solúvel e fração de péptidos solúveis com peso molecular inferior a 30 KDa).

Os resultados obtidos com as diferentes frações de UBM foram diferentes dependendo das células utilizadas. Em relação aos fibroblastos, a fração de UBM Total inibiu a proliferação celular, enquanto a fração solúvel e a fração de péptidos com peso molecular inferior a 30 KDa não revelaram efeito mitogénico sobre estas células. No caso das MSCr, a fração solúvel de UBM inibiu a proliferação celular, enquanto a fração de peso molecular inferior a 30 KDa mais uma vez não apresentou efeito mitogénico. No que se refere às MSCr, ensaios de proliferação deverão ser repetidos para confirmar estes resultados e testadas concentrações mais baixas de cada fração. O efeito da fração de UBM Total sobre as MSCr também deverá ser analisado.

As diferenças no efeito mitogénico verificadas entre as distintas frações de UBM sugerem que, no final da digestão, o hidrolisado poderá conter matricinas pró- e anti-mitogénico e até matricinas neutras. Assim, após o fracionamento do hidrolisado podem resultar frações mais enriquecidas com um determinado tipo de matricinas (por exemplo, matricinas anti-mitogénicas) ou então, a sobreposição de um dos efeitos pode dever-se não à quantidade de matricinas que exibam esse efeito, mas sim à

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

potência do efeito dessas matricinas e eventuais efeitos sinérgicos. Nas frações em que não se verificou qualquer propriedade mitogénica, a coexistência de matricinas com ação pró- e anti-mitogénica pode levar a uma anulação mútua desse efeito e/ou haver matricinas que não modulam a mitogénese nas células testadas. Desta forma, sugere-se a obtenção de frações com intervalos de pesos moleculares mais pequenos, reduzindo assim a variabilidade de matricinas nestas frações, e comparação do efeito dessas frações com a “fração-mãe” e também o fracionamento do hidrolisado com outras técnicas de separação e de purificação de proteínas que explorem outras propriedades das proteínas, para além do peso molecular (por exemplo: precipitação proteica e técnicas cromatográficas).

Relativamente aos ensaios de quimiotaxia, apesar de se ter alcançado avanços consideráveis na utilização da câmara de migração, a otimização deste ensaio deverá continuar.

Atendendo aos resultados conseguidos neste estudo, seria interessante, analisar o efeito dos produtos de degradação da UBM em diversas células estaminais/progenitoras e células diferenciadas implicadas no processo de reparação e de regeneração de tecidos nos mamíferos, por forma a avaliar a bioatividade destes em função do grau de diferenciação das células e conhecer/compreender melhor a sequência de eventos do processo que leva à regeneração de zonas lesadas após o implante de *scaffolds* de MEC. Por exemplo, a inibição *in vitro* da migração e proliferação de células endoteliais diferenciadas na presença dos produtos de degradação da UBM pode ser um reflexo duma possível inibição *in vivo* da formação de vasos sanguíneos por parte dos produtos da MEC durante fases específicas (muito precoces) da remodelação do tecido (Reing *et al.*, 2009). Estudos que avaliem o impacto dos produtos de degradação da UBM durante o processo de diferenciação de células estaminais, nomeadamente na diferenciação osteogénica das MSCr, também deverão ser realizados.

Nos ensaios *in vivo*, o oDex e os produtos de degradação não desencadearam nenhuma resposta inflamatória durante as três semanas de ensaio. Ao fim desse tempo, os hidrogéis encontravam-se altamente repopularizados com células e na presença dos produtos de degradação da UBM observou-se uma organização celular semelhante a células de cartilagem, sugerindo que a formação do osso poderá ocorrer via endocondral. Todavia, estes ensaios são preliminares e futuramente deverão ser efetuados ensaios idênticos mais prolongados no tempo, de modo a verificar se a o hidrolisado de UBM Total pode ser utilizado para biofuncionalizar o oDex, por forma a conferir-lhe propriedades osteoindutoras e, conseqüentemente promover a formação de um tecido ósseo idêntico ao tecido nativo. Seria igualmente interessante avaliar e comparar a capacidade osteogénica *in vivo* das diferentes frações de UBM.

Não se sabe se na degradação *in vivo* dos *scaffolds* de MEC resultam os mesmos péptidos obtidos no processo de degradação artificial usado neste presente estudo, mas este método serve de ponto de partida para a descoberta de matricinas ou conjunto de matricinas com funções essenciais durante o processo de regeneração de tecidos. Assim, futuros estudos deverão utilizar abordagens

proteómicas para analisar em detalhe os péptidos presentes em cada fração e identificar potenciais moléculas com aplicações em engenharia de tecidos/medicina regenerativa.



5. Bibliografia



Adair-Kirk TL & Senior RM. 2008. *Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology.: 40(6-7), 1101–1110.

Agrawal V, Johnson SA, Reing J, Zhang L, Tottey S, Wang G, Hirschi KK, Braunhut S, Gudas LJ, Badylak SF. 2010. *Epimorphic regeneration approach to tissue replacement in adult mammals*. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A: 107 (8), 3351-3355.

Agrawal V, Tottey S, Johnson SA, Freund JM, Siu BF, Badylak SF. 2011a. *Recruitment of progenitor cells by an extracellular matrix cryptic peptide in a mouse model of digit amputation*. Tissue Engineering Part A: 17, 2435-2443.

Agrawal V, Kelly J, Tottey S, Daly KA, Johnson SA, Siu BF, Reing J, Badylak SF. 2011b. *An isolated cryptic peptide influences osteogenesis and bone remodeling in an adult mammalian model of digit amputation*. Tissue Engineering Part A: 17, 3033-3044.

Aitken KJ & Bagli DJ. 2009. *The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease*. Nature Reviews Urology: **6**, 596-611.

Allman AJ, McPherson TB, Badylak SF, Merril LC, Kallakury B, Sheehan C, Reader RH, Metzger DW. 2001. *Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a Th2-restricted immune response*. Transplantation: 17, 1631 –1640.

Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles MER, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, Vila TV, Rodrigues JS, Lear PV, Bravo SB. 2012. *Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells*. Journal of Molecular Endocrinology: 49, 89–111.

Atala A. 2007. *Engineering tissues, organs and cells*. Journal Tissue Engineering and Regenerative Medicine: 1, 83–96.

Badylak SF, Coffey AC, Lantz GC, Tacker WA, Geddes LA. 1994. *Comparison of the resistance to infection of intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial prostheses in a dog model*. Journal of Vascular Surgery: 19, 465-472.

Badylak SF, Kropp B, McPhearson T, Liang H, Snyder PW. 1998. *Small intestinal submucosa: a rapidly resorbed bioscaffold for augmentation cystoplasty in a dog model*. Tissue Engineering: 4 (4), 379-387.

Badylak SF, Meurling S, Chen M, Spievack A, Simmons-Byrd A. 2000. *Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model*. Journal of Pediatric Surgery: 35 (7), 1097-1103.

Badylak SF, Park K, McCabe G, Yoder M. 2001. *Marrow-deprived cells populate scaffolds composed of xenogeneic extracellular matrix*. Experimental Hematology: 29, 1310–1318.

5. BIBLIOGRAFIA

Badylak SF. 2002a. *The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. Cell & Developmental Biology: 13, 377–383.

Badylak SF, Kokini K, Tullius B, Simmons-Byrd A, Morff R. 2002b. *Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device*. Journal of Surgical Research: 103, 190–202.

Badylak SF, Obermiller J, Geddes L, Matheny R. 2003a. *Extracellular matrix for myocardial repair*. The Heart Surgery Forum: 6 (2), E20-E26.

Badylak SF, Wu CC, Bible M, McPherson E. 2003b. *Host protection against deliberate bacterial contamination of an extracellular matrix bioscaffold versus Dacron™ mesh in a dog model of orthopedic soft tissue repair*. Journal of Biomedical Materials Research, Part B, Applied Biomaterials: 67, 648-654.

Badylak SF. 2004. *Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. Transplant Immunology: 12, 367–377.

Badylak SF. 2007. *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*. Biomaterials: 28, 3587–3593.

Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. 2009. *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. Acta Biomaterialia: 5, 1–13.

Badylak SF, Taylor D, Uygun K. 2011. *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. Annual Review of Biomedical Engineering: 13, 27–53.

Beattie AJ, Gilbert TW, Guyton JP, Yates AJ, Badylak SF. 2009. *Chemoattraction of progenitor cells by remodeling extracellular matrix scaffolds*. Tissue Engineering, Part A: 15 (5), 1119-1125.

Bellon G, Martiny L, Robinet A. 2004. *Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis*. Oncology/Hematology: 49, 203–220.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. 2005. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction*. Biotechnology Annual Review: 127-152.

Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. 2011. *Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering: 2, 403–430.

Brennan EP, Reing J, Chew D, Myers-Irvin JM, Young EJ, Badylak SF. 2006. *Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix*. Tissue Engineering: 12 (10), 2949-2955.

Brennan EP, Tang XH, Stewart-Akers AM, Gudas LJ, Badylak SF. 2008. *Chemoattractant activity of degradation products of fetal and adult skin extracellular matrix for keratinocyte progenitor cells*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine: 2, 491–498.

- Brockes P & Kumar A. 2008. *Comparative aspects of animal regeneration*. Annual Review of Cell and Developmental Biology: 24, 525–549.
- Burgess JK & Weckmann M. 2012. *Matrikines and the lungs*. Pharmacology and Therapeutics: 134(3), 317-337.
- Causa F, Netti PA, Ambrosio L. 2007. *A multi-functional scaffold for tissue regeneration: the need to engineer a tissue analogue*. Biomaterials: 28, 5093–5099.
- Carvalho V, Castanheira P, Faria TQ, Gonçalves C, Madureira P, Faro C, Domingues L, Brito RMM, Vilanova M, Gama M. 2010a. *Biological activity of heterologous murine interleukin-10 and preliminar studies on the use of a dextrin nanogel as a delivery system*. International Journal of Pharmaceutics: 400, 234–242.
- Carvalho J, Moreira S, Maia J, Gama FM. 2010b. *Characterization of dextrin-based hydrogels: rheology, biocompatibility, and degradation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: 93(1), 389-399.
- Chen F, Wu L, Zhang M, Zhang R, Sun H. 2011. *Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: promises, strategies, and translational perspectives*. Biomaterials: 32, 3189-3209.
- Chun SY, Lim GJ, Kwon TG, Kwak EK, Kim BW, Atala A, Yoo JJ. 2007. *Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix*. Biomaterials: 28, 4251–4256.
- Cobb MA, Badylak SF, Janas W, Simmons-Byrd A, Boop FA. 1999. *Porcine small intestinal submucosa as a dural substitute*. Surgical Neurology: 51, 99–104.
- Cooper GM, Hausman RE. 1997. *The cell: a molecular approach*. ASM Press, Washington D.C., USA: 2ª edição, 504-510.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. 2008. *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell: 3 (3), 301-313.
- Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meiningner GA. 2000. *Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules*. American Journal of Pathology: 156 (5), 1489-1498.
- Davis GE. 2010. *Matricryptic sites control tissue injury responses in the cardiovascular system: relationships to pattern recognition receptor regulated events*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology: 48, 454–460.

5. BIBLIOGRAFIA

Demidova-Rice TN, Geevarghese A, Herman IM. 2011. *Bioactive peptides derived from vascular endothelial cell extracellular matrices promote microvascular morphogenesis and wound healing in vitro*. *Wound Repair and Regeneration*: 19, 59-70.

Drury JL, Mooney DJ. 2003. *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. *Biomaterials*: 24, 4337-4351.

Duca L, Floquet N, Alix AJP, Haye B, Debelle L. 2004. *Elastin as a matrikine*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*: 49, 235-244.

Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A. 2009. *Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*: 20, 517-527.

Fernandes H, Moroni L, Blitterswijk C, Boer J. 2009. *Extracellular matrix and tissue engineering applications*. *Journal of Materials Chemistry*: 19, 5474-5484.

Frampton JE, Plosker GL. 2003. *Icodextrin: a review of its use in peritoneal dialysis*. *Drugs*: 63 (19), 2079-2105.

Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1998. *Culture of organized cell communities*. *Advanced Drug Delivery Reviews*: 33, 15-30.

Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. 2004. *Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds*. *Biomaterials*: 25, 2353-2361.

Freytes DO, Martin J, Velankar SS, Lee AS, Badylak SF. 2008. *Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix*. *Biomaterials*: 29, 1630-1637.

Geckil H, Xu F, Zhang X, Moon S, Demirci U. 2010. *Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics*. *Nanomedicine*: 5 (3), 469-484.

Gnecchi M & Melo LG. 2009. *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium*. *Stem Cells in Regenerative Medicine*: 482, 281-294.

Gonçalves C, Torrado E, Martins T, Pereira P, Pedrosa J, Gama M. 2010. *Dextrin nanoparticles: Studies on the interaction with murine macrophages and blood clearance*. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*: 75, 483-489.

Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ. 2007. *Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*: 11 (5), 935-944.

Hardwicke J, Moseley R, Stephens P, Harding K, Duncan R, Thomas DW. 2010. *Bioresponsive dextrin rhEGF conjugates: in vitro evaluation in models relevant to its proposed use as a treatment for chronic wounds*. *Molecular Pharmaceutics*: 7 (3), 699-707.

Hoare TR, Kohane DS. 2008. *Hydrogels in drug delivery: progress and challenges*. Polymer: 49, 1993-2007.

Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF. 2001. *Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix*. Endothelium: 8 (1), 11-24.

Hodde JP, Ernst DM, Hiles MC. 2005. *An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix*. Journal of Wound Care: 14 (1), 23-25.

Holtom PD, Shinar Z, Benna J, Patzakis MJ. 2004: *Porcine small intestine submucosa does not show antimicrobial properties*. Clinical Orthopaedics and Related Research: 427, 18-21.

Horton MR, Shapiro S, Bao C, Lowenstein CJ, Noble PW. 1999. *Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages*. Journal of Immunology: 162, 4171–4176.

Hreczuk-Hirst D, Chicco D, German L, Duncan R. 2001. *Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups*. International Journal of Pharmaceutics: 230, 57–66.

lozzo RV. 1998. *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. Annual Reviews of Biochemistry: 67, 609-652.

Jernigan TW, Croce MA, Cagiannos C, Shell DH, Handorf CR, Fabian TC. 2004. *Small intestinal submucosa for vascular reconstruction in the presence of gastrointestinal contamination*. Annals of Surgery: 239, 733-740.

Kim MS, Hong KD, Shin HW, Kima SH, Kima SH, Lee MS, Jang WY, Khang G, Lee HB. 2005. *Preparation of porcine small intestinal submucosa sponge and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat*. International Journal of Biological Macromolecules: 36, 54–60.

Kim MS, Kim JH, Min BH, Chun HJ, Han DK, Lee HB. 2011. *Polymeric scaffolds for regenerative medicine*. Polymer Reviews: 51(1), 23-52.

Kränkel N, Spinetti G, Amadesi S, Madeddu P. 2011. *Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy*. Pharmacology & Therapeutics: 129, 62–81.

Kropp BP, Rippy MK, Keating MA, Rink RC, Thor KB. 1996. *Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations*. The Journal of Urology: 155, 2098-2104.

Lensch MW. 2009. *Cellular reprogramming and pluripotency induction*. British Medical Bulletin: 90, 19–35.

5. BIBLIOGRAFIA

Leong KF, Cheah CM, Chua CK. 2003. *Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs*. *Biomaterials*: 24, 2363–2378.

Li J, Zhang YP, Kirsner RS. 2003. *Angiogenesis in Wound Repair: Angiogenic Growth Factors and the Extracellular Matrix*. *Microscopy Research and Technique*: 60, 107-114.

Li F, Li W, Johnson SA, Ingram DA, Yoder MC, Badylak SF. 2004. *Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells*. *Endothelium*: 11, 199–206.

Liu D, Pearlman E, Diaconu E, Guo K, Mori H, Haqqi T, Markowitz S, Willson J, Sy MS. 1996. *Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*: 93, 7832-7837.

Liu X, Holzwarth JM, Ma PX. 2012. *Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering*. *Macromolecular Bioscience*: 12, 911–919.

Maienschein J. 2011. *Regenerative medicine's historical roots in regeneration, transplantation, and translation*. *Developmental Biology*: 358, 278–284.

Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NH, Reis RL. 2007. *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends*. *Journal of the Royal Society Interface*: 4, 999-1030.

Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC. 2004. *An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity implication in tumor invasion*. *Oncology/Hematology*: 49, 199–202.

Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC. 2005. *Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation*. *Biochimie*: 87, 353–360.

McDevitt CA, Wildey GM, Cutrone RM. 2003. *Transforming growth factor- β 1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa*. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*: 67 (2), 637-640.

McPherson TB, Liang AH, Record RD, Badylak SF. 2000. *Gala(1,3)Gal epitope in porcine small intestinal submucosa (SIS)*. *Tissue Engineering*: 6 (3), 233 –239.

Merguerian PA, Reddy PP, Barreiras DJ, Wilson GJ, Woodhouse K, Bagli DJ, Mclorie GA, Khoury AE. 2000. *Acellular bladder matrix allografts in the regeneration of functional bladders: evaluation of large-segment (>24 cm²) substitution in a porcine model*. *BJU International*: 85, 894-898.

Metcalf AD & Ferguson MWJ. 2007. *Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration*. Journal of the Royal Society Interface: 4, 413–437.

Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. 2004. *Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology: 36, 1031–1037.

Mitragotri S, Lahann J. 2009. Physical approaches to biomaterial design. Nature Materials: 8 (1), 15-23.

Molinos J, Carvalho V, Silva DM, Gama FM. 2012. Development of a hybrid dextrin hydrogel encapsulating dextrin nanogel as protein delivery system. Biomacromolecules: 13, 517–527.

Nagase H, Frederick J, Woessner F. 1999. *Matrix Metalloproteinases*. The Journal of Biological Chemistry: 274 (31), 21491-21494.

Palatinus JA, Rhett JM, Gourdie RG. 2010. *Translational lessons from scarless healing of cutaneous wounds and regenerative repair of the myocardium*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology: 48, 550–557.

Penolazzi L, Mazzitelli S, Vecchiatini R, Torreggiani E, Lambertini E, Johnson S, Badylak SF, Nastruzzi C. 2012. *Human mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix-scaffold: viability and osteogenic potencial*. Journal of Cellular Physiology: 227, 857-866.

Plummer DT. 1987. *An introduction to practical biochemistry*. McGraw-Hill Book Company, London, UK: 3rd edition, 91-107.

Polak DJM. 2009. *Regenerative medicine: a primer for paediatricians*. Early Human Development: 85, 685–689.

Probst M, Dahiya R, Carrier S, Tanagho EA. 1997. *Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement*. British Journal of Urology: 79, 505-515.

Raeder RH, Badylak SF, Sheehan C, Kallakury B, Metzger DW. 2002. Natural anti-galactose antibodies delay, but do not prevent, acceptance of extracellular matrix xenografts. Transplant Immunology:10, 17 –26.

Record RD, Hillegonds D, Simmons C, Tullius R, Rickey FA, Elmore D, Badylak SF. 2001. *In vivo degradation of 14C-labeled small intestinal submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair*. Biomaterials: 22, 2653-2659.

Reing JE, Zhang L, Myers-Irvin J, Cordero KE, Freytes DO, Heber-Katz E, Bedelbaeva K, McIntosh D, Dewilde A, Braunhut SJ, Badylak SF. 2009. *Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation*. Tissue Engineering, Part A: 15, 605–614.

5. BIBLIOGRAFIA

Robotin-Johnson MC, Swanson PE, Johnson DC, Schuessler RB, Cox JL. 1998. *An experimental model of small intestinal submucosa as a growing vascular graft*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery: 116 (5), 805-811.

Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. 2004. *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*. Macromolecular Bioscience: 4 (8), 743-765.

Sandusky GE, Badylak SF, Morff RJ, Johnson WD, Lantz G. 1992. *Histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs*. American Journal of Pathology: 140 (2), 317-324.

Sarikaya A, Record R, Wu C, Tullius B, Badylak S, Ladisch M. 2002. *Antimicrobial activity associated with extracellular matrices*. Tissue Engineering: 8, 63-71.

Schägger H. 2006. *Tricine-SDS-PAGE*. Nature Protocols: 1 (1), 16-22.

Schenk S & Quaranta V. 2003. *Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix*. TRENDS in Cell Biology: 13 (7), 366-375.

Seeley RR, Stephens TD, Tate P. 2001. *Anatomia & fisiologia*. Lusodidacta, Lisboa, Portugal: 3^a Edição, 176-200.

Shekaran A & Garcia AJ. 2011. *Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering*. Biochimica et Biophysica Acta: 1810, 350-360.

Shell DH, Croce MA, Cagiannos C, Jernigan TW, Edwards N, Fabian TC. 2005. *Comparison of small-intestinal submucosa and expanded polytetrafluoroethylene as a vascular conduit in the presence of gram-positive contamination*. Annals of Surgery: 241, 995-1004.

Sottile J. 2004. *Regulation of angiogenesis by extracellular matrix*. Biochimica et Biophysica Acta: 1654, 13-22.

Sweeney PJ & Walker JM. 1993. *Enzymes of Molecular Biology*. Burrell MM, ed., Humana Press (Totowa, NJ): 290-291.

Takahashi k & Yamanaka S. 2006. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell: 126, 663-676.

Teo J & Kahn M. 2010. *The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators*. Advanced Drug Delivery Reviews: 62, 1149-1155.

Tottey S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, Chang L, Jiang H, Medberry CJ, Reines B, Badylak SF. 2011a. *The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties*. Biomaterials: 32, 128-136.

Tottey S, Corselli M, Jeffries EM, Londono R, Peault B, Badylak SF. 2011b. *Extracellular matrix degradation products and low-oxygen conditions enhance the regenerative potential of perivascular stem cells*. Tissue Engineering Part A: 17, 37–44.

Tran KT, Lamb P, Deng JS. 2005. *Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair*. Journal of Dermatological Science: 40, 11–20.

Treetharnmathurot B, Dieudonné L, Ferguson EL, Schmaljohannb D, Duncan R, Wiwattanapatapee R. 2009. *Dextrin–trypsin and ST-HPMA–trypsin conjugates: Enzyme activity, autolysis and thermal stability*. International Journal of Pharmaceutics: 373, 68–76.

Valentim JE, Badylak JS, McCabe GP, Badylak SF. 2006. *Extracellular matrix bioscaffolds for orthopaedic applications: a comparative histologic study*. Journal of Bone and Joint Surgery: 88 (12), 2673-2686.

Villanueva PD, Sanz-Ruiz R, García AN, Santos MEF, Sánchez PL, Fernández-Avilés F. *Functional multipotency of stem cells: what do we need from them in the heart?* Stem Cells International: 2012, 817364.

Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, Cordero K, Bedelbaeva K, Gourevitch D, Heber-Katz E. 2010. *Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo*. Matrix Biology: 29, 690–700.

Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. 1997. *Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa*. Journal of Cellular Biochemistry: 67, 478–491.

Williams DF. 2008. *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials: 29 (20), 2941-2953.

Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. 1998. *Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells*. Urology: 51 (2), 221-225.

Zantop T, Gilbert TW, Yoder MC, Badylak SF. 2006. *Extracellular matrix scaffolds attract bone marrow derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction*. Journal of Orthopedic Research: 24 (6), 1299–1309.