

ESTÁ EM NOSSO DNA BUSCAR
NOVOS CAMINHOS PARA A SAÚDE

ENCONTRO DE ROTAS
BIOTECNOLÓGICAS

≡ **TERAPIAS E
DIAGNÓSTICOS
AVANÇADOS**

ANAIS

ESTÁ EM NOSSO DNA BUSCAR
NOVOS CAMINHOS PARA A SAÚDE

ENCONTRO DE ROTAS
BIOTECNOLÓGICAS

TERAPIAS E DIAGNÓSTICOS AVANÇADOS



I Encontro de Rotas Biotecnológicas – Terapias e Diagnósticos Avançados

Realização:



Apoiadores e Parceiros:



Curitiba
2022

ESTÁ EM NOSSO DNA BUSCAR
NOVOS CAMINHOS PARA A SAÚDE

ENCONTRO DE ROTAS
BIOTECNOLÓGICAS

TERAPIAS E DIAGNÓSTICOS AVANÇADOS



As opiniões expressas pelos autores nos artigos não representam necessariamente a opinião institucional dos organizadores. Esta publicação não pode ser comercializada – distribuição eletrônica gratuita. Copyright © 2022. Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução, armazenamento e transmissão de partes deste livro desde que citada a fonte.

Endereço:
Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR
Rua Algacyr Munhoz Mader, 3775 – Bairro CIC
CEP: 81350-010 – Curitiba – Paraná – Brasil. Telefone: 41-3316-3000
e-mail: sac@tecpa.br
Publicado no endereço: <https://www.erbiotec.com.br/>

TERAPIAS E DIAGNÓSTICOS AVANÇADOS



Comissão Organizadora

Responsável

Adriana Kalinowski
Alexandre Rossi Paschoal
Ana Carolina Irioda
Ariane Hinca Schneider
Bassam Felipe Mogharbel
Bruna Lunardi Dias
Camila do Rocio Silva de Lima de Oliveira
Clayton Fernandes de Souza
Fabiana de Medeiros
Fernanda Wolf
Hosana Lopes Francisco
Jaiesa Zych Nadolny
Katherine Athayde Teixeira de Carvalho
Livia Regina Nogueira dos Santos
Lucas de Oliveira Rossetti Nascimento
Luís Affonso De Rosis Santos
Rossana Baggio Simeoni

Instituição

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Cornélio Procópio - UTFPR
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Federação das Indústrias do Estado do Paraná - Fiep
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Federação das Indústrias do Estado do Paraná - Fiep
Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR
Biosintesis
Federação das Indústrias do Estado do Paraná - Fiep
Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar
Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar
Faculdades Pequeno Príncipe & Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP
Federação das Indústrias do Estado do Paraná - Fiep
Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar & Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Comissão Científica

Responsável

Dr. Alexandre Rossi Paschoal
Dra. Ana Carolina Irioda
Dr. Bassam Felipe Mogharbel
Dra. Camila dos Anjos Proença
Ma. Camila Rizzardi Peverari
Dra. Carmem Maria Sales Bonfim
Dr. Clayton Fernandes de Souza
Ma. Euderléia Moreira Rodrigues
Rockenbach Antunes
Dr. Fabricio Klerynton Marchini
Dra. Jaiesa Zych Nadolny
Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho
Dra. Rossana Baggio Simeoni

Instituição

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Cornélio Procópio - UTFPR
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Faculdades Pequeno Príncipe & Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica - Senai Paraná
Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica - Senai Paraná
Faculdades Pequeno Príncipe & Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR
Sebrae - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná - ICC & Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP
Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR
Faculdades Pequeno Príncipe & Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR & Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

ESTÁ EM NOSSO DNA BUSCAR
NOVOS CAMINHOS PARA A SAÚDE

ENCONTRO DE ROTAS
BIOTECNOLÓGICAS

TERAPIAS E DIAGNÓSTICOS AVANÇADOS



ROTA DE BIOTECNOLOGIA

A área de Biotecnologia tem história nos exercícios prospectivos desenhados para o tecido industrial paranaense. No 1º Ciclo de Prospectiva Estratégica do Paraná, a área de Biotecnologia foi identificada como promissora nos Setores Portadores de Futuro 2005-2015 e foi trabalhada nas Rotas Estratégicas 2015. Na sequência, a área foi contemplada no processo de Articulação das Rotas Estratégicas (de 2010 a 2017) e foi explorada no estudo Perfis Profissionais para o Futuro da Indústria Paranaense 2030.

Os estudos prospectivos e os projetos já estabelecidos para a Biotecnologia influenciaram deliberações e empreendimento nas esferas pública e privada, incidindo diretamente no desenvolvimento da área na última década. A avaliação das transformações ocorridas nos últimos anos, endossada pelo ecossistema da Biotecnologia, legitima a relevância dos empreendimentos realizados e reforça a continuidade dos esforços de planejamento e articulação para a área. Sendo assim, foi construída a Rota Estratégica para o Futuro da Indústria Paranaense - Biotecnologia 2031, lançada em 2019.

Por meio dos Conselhos Temáticos Setoriais (Sistema Fiep), deu início em 2021 um novo modelo de governança para o Roadmap de Biotecnologia 2031 – segmento de Saúde. Com apoio do Tecpar e do Observatório Sistema Fiep foram constituídos três Grupos de Trabalho coordenados por um sponsor de instituições distintas, sendo eles:

- Editais, Fomento e Mercado – Sponsor: Doutor Lucas de Oliveira Rosseti Nascimento - Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP);
- Redes em Biotecnologia – Sponsor: Doutor Alexandre Rossi Paschoal – UTFPR Câmpus Cornélio Procópio;
- Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (acadêmico-científica) – Sponsor: Doutora Katherine Athayde Teixeira de Carvalho – Faculdades Pequeno Príncipe & Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe

Dentre as ações conduzidas pelos grupos, percebeu-se a necessidade pela criação de um momento voltado para promoção e disseminação do conhecimento científico e Tecnológico. Surge então o Encontro de Rotas Biotecnológicas: Terapias e Diagnósticos Avançados.

TERAPIAS E DIAGNÓSTICOS AVANÇADOS



Sumário

Células estromais mesenquimais de polpa dentária de diferentes faixas etárias podem interferir no tratamento de doenças neurodegenerativas?	8
Desenvolvimento de implante nanoestruturado de células dopaminérgicas derivadas de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano	9
Análise quantitativa semi-automática da expressão da proteína <i>phosphatase and tensin homologue</i> (PTEN) em câncer de mama	10
Nanopartículas biodegradáveis carregadas com levodopa e curcumina para tratamento da doença de Parkinson	11
Avaliação da tumorigenicidade do produto de terapia avançada derivado das células mesenquimais da medula óssea	12
Caracterização celular e molecular de células-tronco mesenquimais-like derivadas de células pluripotentes	13
Efeito imunomodulador das células-tronco mesenquimais do cordão umbilical em pacientes com síndrome respiratória aguda grave decorrente da COVID-19.....	14
Potencial terapêutico de células precursoras neuronais na retinopatia diabética – modelo pré-clínico	15
O impacto das tecnologias de sequenciamento na identificação computacional de RNAs longos não-codificantes	16
Avaliação <i>in vitro</i> do Potencial Uso de Arcabouços 3D de Alumina Funcionalizados com Vesículas Extracelulares para Regeneração Óssea	17
Membrana amniótica descelularizada como carreador de células e matriz extracelular em engenharia tecidual óssea	18
Interação das DPSC com arcabouços de baixo custo em acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) prototipados em impressora 3D	19
Validação de metodologia POCT para a determinação de perfil lipídico em amostras de sangue total capilar.....	20
Novo analisador hematológico <i>point-of-care</i> com diferenciação celular através do uso de inteligência artificial	21
Avaliação do colágeno nas vias aéreas de camundongos Balb/c submetidos à asma alérgica e tratados com células-tronco mesenquimais humanas	22
Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADMSCs) crescidas em microcarreadores 3D (Cytodex-1) e suas vesículas extracelulares.....	23
Uso de células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente permanente no tratamento da Doença de Parkinson em modelo animal.....	24
Estudo do potencial genotóxico de um produto de terapia avançada composto de membrana amniótica com células-tronco mesenquimais humanas	25
Tratamento da lesão muscular com células-tronco mesenquimais isoladas da polpa dentária associadas ao treinamento de natação – estudo experimental em ratos.....	26
Desenvolvimento de um Pulmão Artificial 3D como Ferramenta para Teste de Candidatos à Medicamentos para o COVID-19.....	27
Correlação molecular e fenotípica dos genes localizados no locus deletado na síndrome de deleção 9P ..	28
Diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano em precursoras neuronais por mecanotransdução	29

ESTÁ EM NOSSO DNA BUSCAR
NOVOS CAMINHOS PARA A SAÚDE

ENCONTRO DE ROTAS
BIOTECNOLÓGICAS

TERAPIAS E DIAGNÓSTICOS AVANÇADOS



Avaliação do potencial condrogênico de diferentes fontes de células estromais mesenquimais para tratamento de lesões articulares.....	30
Células-tronco mesenquimais humanas semeadas na em Membrana natural produzindo Neuroesferas e diferenciadas para Neurônios Colinérgicos.....	31
Caracterização do comportamento de Células-Tronco Mesenquimais cultivadas em MatriXpec™ para o emprego na engenharia de tecidos de cartilagem.	32
Benefício da terapia celular mediada por arcabouço de celulose no infarto do miocárdio: um estudo pré-clínico	33
Nanopartículas anti-inflamatórias associadas a células-tronco mononucleares da medula óssea para reparo cardíaco após infarto.....	34



Células estromais mesenquimais de polpa dentária de diferentes faixas etárias podem interferir no tratamento de doenças neurodegenerativas?

Ana Helena Selenko^{1*}, Mateus Lisboa de Oliveira¹, Alexandra Cristina Senegaglia¹, Paulo Roberto Slud Brofman¹, Leticia Fracaro¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil

*Correspondente: helenaselenko@gmail.com; Tel.: +55-41-991032046

Resumo: As células estromais mesenquimais (CTM) são células indiferenciadas com potencial de diferenciação e autorrenovação. As CTM da polpa dentária (DPSC) são de fácil coleta e apresentam vantagem na indução a diferenciação neuronal em relação às CTM de outros tecidos, pois compartilham da mesma origem embrionária do sistema nervoso, a ectoderme. As terapias convencionais possuem uma eficácia limitada na recuperação funcional em doenças neurodegenerativas, o que incentiva a pesquisa por novos tratamentos, como a terapia com CTM. Avaliar e caracterizar a presença de marcadores neuronais de DPSC de diferentes faixas etárias pode facilitar uma nova estratégia terapêutica para regeneração de células e tecidos neuronais. Esse estudo caracterizou as DPSC e avaliou a expressão de marcadores neuronais de amostras de duas faixas etárias. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (4.746.491). Dentes íntegros de duas faixas etárias foram comparadas: Grupo A: 20 a 25 anos e Grupo B: 50 a 55 anos. DPSC foram isoladas e expandidas *in vitro*. As amostras foram caracterizadas por diferenciação em duas linhagens e por citometria de fluxo (segundo os critérios da *International Society for Cell and Gene Therapy* (ISCT)). As células foram contadas para analisar a porcentagem de DPSC diferenciada para a linhagem adipogênica após coloração com *Oil Red O*. Para avaliar o potencial e a eficiência desses grupos na formação de colônias *in vitro*, as DPSC foram submetidas ao ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblástico (CFU-F). Para a avaliação da estabilidade genética, foi realizada a técnica de citogenética clássica (bandeamento G). A senescência foi realizada pela detecção de β -galactosidase por citometria de fluxo. Os marcadores neuronais foram avaliados por citometria de fluxo (CD56 e CD271) e imunofluorescência (Nestina e β -tubulinIII). Os resultados de ambos os grupos foram comparados e analisados no GraphPad Prism 9.0. As DPSC apresentaram características de CTM corroborando com os critérios da ISCT. Ambos os grupos se diferenciaram para a linhagem osteogênica, porém apresentaram potencial limitado para diferenciação adipogênica. Ao avaliar o potencial de diferenciação adipogênica, o grupo B apresentou maior média de células com vacúolos lipídicos (8,6%) do que o grupo A (1,9%) ($p < 0,0078$). A média da eficiência de formação de colônias foi de 3,9% para o grupo A e 0,1% para o grupo B ($p < 0,0001$). O grupo B apresentou maior média de células senescentes (58%) do que o grupo A (13,6%). Ambos os grupos não apresentaram anormalidades cromossômicas. Ao comparar a expressão dos marcadores neuronais CD56 e CD271, o grupo A apresentou maior expressão (73,35% e 48,7%) que o grupo B (15,8% e 26,8%). No entanto, ambos os grupos expressaram Nestina e β -tubulinIII sem diferença estatística significativa. Os resultados demonstraram que ambos os grupos apresentaram características de CTM. As DPSC do grupo A apresentaram maior eficiência na formação de colônias e expressão de marcadores neuronais e menor taxa de senescência quando comparado ao grupo B. Os resultados demonstram que caso aplicadas em doenças neurodegenerativas a faixa etária pode influenciar no potencial das DPSC e a idade do doador das células pode interferir nos resultados.

Palavra-chave: Polpa de dente; Marcadores neuronais; Nestina; β -tubulinIII; CD56; CD271



Desenvolvimento de implante nanoestruturado de células dopaminérgicas derivadas de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano

Ana Carolina Irioda^{1,2*}, Bassam Felipe Mogharbel^{1,2}, Priscila Elias Ferreira Sticker^{1,2}, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho^{1,2}

¹Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brasil; ²Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: anairioda@gmail.com; Tel.: +55-41-996824455

Resumo: A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa que afeta os neurônios dopaminérgicos responsáveis pela produção e liberação da dopamina, um neurotransmissor de função no controle dos movimentos e dos mecanismos de prazer e recompensa. Atualmente as terapêuticas existentes para a Doença de Parkinson não promovem a cura da doença, apenas amenizam os sintomas e retardam sua progressão. Neste contexto, as células-tronco mesenquimais emergem como importante alternativa para o tratamento da Doença de Parkinson, sendo potencial fonte de reposição de neurônios e/ou seus neurotransmissores. O objetivo deste projeto foi desenvolver um implante utilizando células produtoras de dopamina, a partir de células-tronco derivadas do tecido adiposo, semeadas em uma matriz nanoestruturada. Foram utilizadas dezoito amostras de tecido adiposo retirados em cirurgias plásticas, seguido de isolamento das células-tronco mesenquimais, cultivo, análise de pluripotência e caracterização imunofenotípica. Essas células foram então semeadas sobre a matrix natural funcional de biopolímero (NFBX), uma matrix extracelular capaz de organizar as células produzindo neuroesferas, seguidos de isolamento de precursoras neuronais e diferenciação dopaminérgica. A quantificação de dopamina foi determinada através do método ELISA, e a identificação de marcadores específicos de neurônios foi realizada com a técnica de imunocitoquímica (anticorpos anti: nestina, β -III Tubulina e Tirosinahidroxilase). Os resultados demonstraram que a caracterização imunofenotípica foi condizente com células-tronco mesenquimais (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻ e CD271⁻). Em análise de pluripotência, as células-tronco mesenquimais se diferenciaram em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Tanto as neuroesferas, formadas após a semeadura das células sobre a membrana NFBX, quanto as células derivadas destas esferas, apresentaram positividade para a nestina. Sete amostras apresentaram positividade para a β -III Tubulina e Tirosinahidroxilase, a diferenciação funcional dopaminérgica foi comprovada em apenas cinco amostras, que além da positividade para estes marcadores, também liberaram dopamina no meio de cultivo. A dopamina liberada no meio de cultivo apresentou uma concentração média de 2,33 ng/mL \pm 2,13. Após a produção da neuroesfera, uma das amostras apresentou alterações em seu perfil imunofenotípico; as células desta amostra passaram a ter uma positividade para o CD271, uma negatividade para o CD73 e uma quantificação de dopamina muito superior às demais amostras (74,91 ng/mL), sugerindo que o marcador CD271 pode ter relação com um maior comissionamento das células em relação a sua diferenciação, pois trata-se de marcador neuronal. O implante foi desenvolvido através do cultivo e diferenciação dopaminérgica das células-tronco mesenquimais sobre uma membrana de celulose. Estes resultados demonstram que células-tronco derivadas do tecido adiposo podem se diferenciar em células produtoras de dopamina, que por sua vez, podem ser utilizadas para o desenvolvimento de um implante capaz de liberar dopamina, tendo potencial uso terapêutico na Doença de Parkinson.

Palavra-chave: Células-tronco adultas; tecido adiposo; Doença de Parkinson; Neurônio dopaminérgico; dopamina; neuroesferas; implante nanoestruturado.



Análise quantitativa semi-automática da expressão da proteína *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) em câncer de mama

Claudia Caroline Veloso da Silva-Camargo^{1*}, Arthur Henrique Gomes de Oliveira¹, Julianna Alves Rabello¹, Lucas Padilha Lacerda¹, Seigo Nagashima¹, Marcia Olandosk¹, Jeanine Marie Nardin², Thaís Abreu Almeida², Lúcia de Noronha¹, Vanessa Santos Sotomaio¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Curitiba, Paraná, Brasil; ²Hospital Erasto Gaertner, CEPEP, Curitiba, Paraná, Brasil

*Correspondente: clau_farm07@yahoo.com.br; Tel.: +55-41-98876-9269

Resumo: Os biomarcadores tornaram-se essenciais para o diagnóstico precoce, estratificação do tratamento e como ferramentas de monitoramento de recorrência para vários tipos de câncer. A proteína phosphatase and tensin homologue (PTEN) é um potencial biomarcador, seu nível de expressão mais baixo tem sido associado à resistência a drogas anticancerígenas e pior prognóstico da doença. O escore de Allred é um método de coloração semiquantitativo manual amplamente utilizado por patologistas na prática clínica, e em pesquisas para avaliar a expressão de biomarcadores. Esse escore fornece uma avaliação dos parâmetros de distribuição e intensidade dos biomarcadores. No entanto, os resultados do escore Allred podem ser afetados por variações de coloração e iluminação sob diferentes microscópios e variam entre os observadores, levando a dificuldades na reprodutibilidade e precisão dos resultados. Além disso, esses fatores também podem contribuir para a probabilidade de decisões não confiáveis e propensas a erros com base nas informações obtidas. A automação pode ser usada para padronizar, reduzir o tempo de processamento e aumentar a eficiência da detecção de biomarcador de alto rendimento. Assim, determinamos a viabilidade da análise semiautomática da expressão de PTEN no câncer de mama. Para tanto, 191 amostras de câncer de mama organizadas em um microarranjo de tecidos (TMA) foram examinadas por meio de um protocolo de imuno-histoquímica, seguido de pontuação de Allred e análise do processo de segmentação semi-automática utilizando da técnica de morfometria de cores. Esta técnica foi adaptada para detectar automaticamente a área de distribuição positiva e a intensidade associada. A comparação da especificidade e acurácia dessa abordagem recém-estabelecida com as obtidas com o método escore de Allred demonstrou uma correlação positiva entre os dois métodos. A análise semi-automática detectou e distinguiu com eficiência a distribuição e intensidade da expressão de PTEN. Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que uma máscara morfométrica pode ser efetivamente utilizada para detectar a intensidade e distribuição da expressão de PTEN confirmando o resultado obtido no escore de Allred manual. Além disso, poderia reduzir a variabilidade de resultados causada por diferenças interobservadores e facilitaria a obtenção de prognósticos precisos por meio da padronização dos resultados obtidos.

Palavra-chave: câncer de mama, PTEN, escore de Allred, morfometria, biomarcadores.



Nanopartículas biodegradáveis carregadas com levodopa e curcumina para tratamento da doença de Parkinson

Bassam Felipe Mogharbel ^{1,*}, Marco André Cardoso ^{1,2}, Ana Carolina Irioda ¹, Priscila Elias Ferreira Stricker ¹, Robson Camilotti Slompo ¹, Julia Maurer Appel ¹, Nathalia Barth de Oliveira ¹, Maiara Carolina Perussolo ¹, Claudia Sayuri Saçaki ¹, Nadia Nascimento da Rosa ¹, Dilcele Silva Moreira Dziedzic ¹, Christophe Travelet ², Sami Halila ², Redouane Borsali ², Katherine Athayde Teixeira de Carvalho ¹

¹ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP), Terapia Avançada e Biotecnologia Celular na Medicina Regenerativa, Curitiba, Paraná, Brasil. ² Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Grenoble, França

*Correspondente: bassamfm@gmail.com; Tel.: +55-41-996319832

Resumo: A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionada à idade. A levodopa (L-DOPA) continua sendo a droga padrão-ouro disponível para o tratamento da DP. A curcumina tem muitas atividades farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-amilóides e antitumorais. Copolímeros compostos de Poli (óxido de etileno) (PEO) e poliésteres biodegradáveis como Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) podem se auto-montar em nanopartículas (NPs). Este estudo descreve o desenvolvimento do copolímero dibloco NH₂-PEO-PCL carregado positivamente e modificado pela adição de glutationa (GSH) na superfície externa, resultando em uma entrega sinérgica de L-DOPA e curcumina que seria capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. As suspensões de NPs NH₂-PEO-PCL foram preparadas usando um método de nanoprecipitação e deslocamento de solvente e revestidas com GSH. As NPs foram submetidas a ensaios de caracterização. Para garantir a biodisponibilidade, as células Vero e PC12 foram tratadas com várias concentrações das NPs carregadas e descarregadas para observar a citotoxicidade. As NPs carregaram com sucesso L-DOPA e curcumina e ficaram estáveis após a liofilização, avançando para testes de toxicidade in vitro. As células Vero e PC12 que foram tratadas por até 72 h com várias concentrações de L-DOPA e NP carregadas de curcumina mantiveram alta porcentagem de viabilidade, indicando que as NPs são biocompatíveis. As NPs consistindo de NH₂-PEO-PCL foram caracterizados como formulações potenciais para entrega cerebral de L-DOPA e curcumina. Os resultados também indicam que as nanomicelas biodegradáveis desenvolvidas e compatíveis com o sangue apresentaram baixa citotoxicidade.

Palavra-chave: nanopartículas; glutationa; doença de Parkinson; L-DOPA; curcumina.



Avaliação da tumorigenicidade do produto de terapia avançada derivado das células mesenquimais da medula óssea

Bianca Polak Furman^{1*}, Henrique Trigo de Castro Junior¹, Débora Regina Daga¹, Daniela Boscaro Marsaro¹, Paulo Roberto Slud Brofman¹, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto¹

¹Centro de Tecnologia Celular – Escola de Medicina - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: bianca.furman01@gmail.com; Tel.: +55-41-998912619

Resumo: A utilização das células-tronco mesenquimais (CTM) para fins terapêuticos e aplicação em ensaios clínicos como um produto de terapia avançada (PTA) reforça a necessidade de avaliações que garantam a segurança dos pacientes tratados com o PTA. Em virtude dos diversos estímulos decorrentes do processo de cultivo das CTM, estas podem sofrer alterações como instabilidades genômicas, transformações de células e aumento de potencial tumorigênico. O ensaio de colônia em Soft Agar, que é baseado na habilidade das células com potencial tumorigênico de crescerem independente de ancoragem e formarem colônias, permite avaliar o potencial tumorigênico das CTM. Desta forma esta metodologia permite a comprovação das propriedades do material biológico e particularidades no desenvolvimento de novos PTA para aplicação clínica, sem riscos para o paciente. O objetivo foi estabelecer um protocolo para avaliar o potencial tumorigênico das CTM da medula óssea (MO) para ser utilizado como teste de controle de qualidade do PTA que será disponibilizado para os pacientes nos ensaios clínicos. As CTM-MO foram obtidas de doadores saudáveis e cultivadas até a passagem P2-P4 e as células da linhagem HeLa foram utilizadas como controle positivo. Foram comparados três protocolos diferentes baseados na formação de colônias em Soft Agar, onde as células foram cultivadas em placas de 6 poços, com duas ou três camadas e diferentes concentrações de ágar ou agarose por 21 dias. Em alguns casos, foi feita a coloração com violeta genciana e azul de metileno. O protocolo utilizando uma concentração de ágar de 0,6% na primeira camada e de 1% na segunda camada, apresentou melhores resultados para avaliação do crescimento das células. Após o cultivo de 21 dias, foram observadas poucas CTM-MO isoladas sobre a camada de ágar, pois estas células apresentam o crescimento dependente de ancoragem. Para as células HeLa, que tem o crescimento independente de ancoragem, houve a formação de colônias. Foi possível estabelecer um protocolo para avaliação da tumorigenicidade das CTM que poderá ser utilizado no controle de qualidade do PTA para os ensaios clínicos. Este protocolo também poderá ser utilizado para validação de outros ensaios de transformação celular, que utilizam kits comerciais.

Palavra-chave: Tumorigenicidade; Produto de Terapia Avançada, Controle de qualidade, Crescimento celular.



Caracterização celular e molecular de células-tronco mesenquimais-like derivadas de células pluripotentes

Bruno Moisés de Matos^{1*}, Anny Waloski Robert¹, Marco Augusto Stimamiglio¹, Alejandro Correa^{1, 2}

¹Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-PR; Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco; Curitiba-PR; Brasil;

²Universidade Federal do Paraná; Programa de pós-graduação em Biologia Celular; Curitiba-PR; Brasil;

*Correspondente: brunomoisesdematos@gmail.com; +55-41-98524894;

Resumo: Células-tronco mesenquimais (CTMs) destacam-se por promoverem o aumento da atividade e viabilidade de outras células através de mecanismos diversos, incluindo a comunicação parácrina mediada por vesículas extracelulares. Entretanto, isolados de CTMs apresentam variabilidade *in vitro*, por exemplo, contendo populações heterogêneas e atingindo senescência celular precocemente, dificultando a aplicação tanto das células quanto de seus subprodutos em novas terapias regenerativas. Portanto, faz-se necessário o estabelecimento de protocolos para geração de culturas estáveis e reprodutíveis, contexto no qual o uso de células-tronco pluripotentes (CTPs) em protocolos de derivação de CTMs-like é uma alternativa. Ainda, a exploração de novas fontes de vesículas extracelulares apresenta-se como um campo de grande potencial. Nesse sentido, o presente trabalho buscou estabelecer protocolos de derivação de CTMs-like a partir de CTPs e a posterior caracterização das células geradas quanto a suas propriedades funcionais comparadas a CTMs de cultivo primário. Dentre seis protocolos adaptados a partir da literatura, uma das metodologias de derivação foi escolhida para o prosseguimento dos experimentos. As CTMs-like obtidas foram caracterizadas quanto a seu perfil fenotípico pela avaliação da presença de proteínas de superfície através de citometria de fluxo, em comparação com o padrão definido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular como característico de CTMs. O padrão de proteínas de superfície encontrado nas CTMs-like foi condizente com o de uma célula mesenquimal, e se assemelha ao encontrado em CTMs obtidas a partir de tecido adiposo. A presença de marcadores positivos para CTMs foi enriquecida ao longo das passagens em cultivo gerando células majoritariamente positivas para os marcadores CD90 e CD73. As CTMs-like também foram avaliadas quanto a seu potencial de diferenciação multipotente, em protocolos de indução adipogênica e osteogênica. Os resultados preliminares indicam que as CTMs-like possuem potencial osteogênico comparável com o de CTMs de tecido adiposo. Entretanto, as CTM-like não demonstraram potencial adipogênico nos testes realizados até o momento. Repetições dos protocolos de derivação e dos experimentos de caracterização confirmarão tais observações. Com isso, foi definido um protocolo para obtenção de CTMs-like a partir de CTPs, que representa uma alternativa para a superação das limitações do uso de CTMs na medicina regenerativa. Tais células apresentaram perfil fenotípico semelhante ao de outras CTMs e potencial de diferenciação condizente com o encontrado na literatura para esse tipo de célula. Futuros experimentos confirmarão o potencial funcional dessas células visando aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais derivadas; protocolos de derivação celular; diferenciação celular; caracterização molecular; medicina regenerativa; potencial terapêutico.



Efeito imunomodulador das células-tronco mesenquimais do cordão umbilical em pacientes com síndrome respiratória aguda grave decorrente da COVID-19

Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto^{1,2*}, Alexandra Cristina Senegaglia^{1,2}, Claudio Luciano Franck², Debora Regina Daga¹, Marco Augusto Stimamiglio³, Daniela Boscaro Marsaro¹, Valderéz Ravaglio Jamur¹, Isadora May Vaz¹, Paulo Roberto Slud Brofman¹, Alejandro Correa³

¹Centro de Tecnologia Celular – Escola de Medicina - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil; ²Complexo Hospital de Clínicas- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil; ³Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco – Instituto Carlos Chagas - Fiocruz-Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: carmen.rebelatto@pucpr.br; Tel.: +55-41-98407-5464

Resumo: A COVID-19, causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) é uma doença multissistêmica, onde o paciente muitas vezes apresenta uma resposta imune exacerbada, com a produção de uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, que pode levar a danos nos órgãos seguido de edema, síndrome respiratória aguda grave, dano cardíaco agudo, infecção secundária com sepse, falha de múltiplos órgãos, e a morte. Portanto, evitar a tempestade de citocinas, pode ser de grande importância para o tratamento da COVID-19 em pacientes infectados. As células estromais mesenquimais (CTM) são considerados Produtos de Terapia Avançada (PTA) e apresentam propriedades imunomoduladoras e capacidade de regeneração, portanto, são uma ferramenta promissora para o tratamento de distúrbios que envolvem desregulação imunológica e extenso dano tecidual, como é o caso da COVID-19. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador das CTM do tecido de cordão umbilical (CTM-TCU) após a infusão em pacientes críticos com COVID-19. A caracterização das CTM-TCU foi realizada seguindo os critérios definidos pelas *International Society for Cellular Therapy* (ISCT). Foram incluídos dezessete pacientes diagnosticados com COVID-19, internados na UTI e em ventilação mecânica invasiva. Os pacientes receberam três doses de 5×10^5 CTM-TCU/kg (n=11) com intervalo de 48 horas ou placebo (n=6). O produto final foi avaliado pelo teste de imunomodulação das CTM-TCU *in vitro*. Nos pacientes, foram avaliados os marcadores inflamatórios como a ferritina, a proteína C reativa, e os níveis das citocinas - fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF), interleucinas (IL) -2, IL-6, IL-7, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF) α , proteína quimioatrativa de monócitos (MCP1/CCL2) e *proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa* (MIP1a/CCL3), nos períodos pré-infusão, dias 2, 4, 6 e 14, 2 e 4 meses. Os resultados das avaliações do PTA estavam de acordo com os critérios estabelecidos pelo Centro de Tecnologia Celular/PUCPR. Na avaliação ao longo do tempo, no grupo de pacientes que recebeu as CTM-TCU, observou-se uma redução significativa dos níveis de ferritina e proteína C reativa. Na comparação entre os grupos, houve uma redução dos níveis de ferritina no 14º dia comparativamente ao grupo placebo. Em relação as citocinas, os níveis de IL-6, IL-8 e MCP-1-CCL2 diminuíram ao longo do tempo no grupo que recebeu as CTM-TCU. Também foi observada uma redução significativa dos níveis de IL-6 no quarto mês após a infusão, comparativamente ao grupo placebo. As CTM-TCU mostraram efeitos benéficos com a diminuição de marcadores inflamatórios, confirmando seu efeito imunomodulador após a infusão em pacientes críticos com COVID-19.

Palavra-chave: COVID-19, Células Estromais Mesenquimais, Produto de Terapia Celular Avançada, Imunomodulação



Potencial terapêutico de células precursoras neuronais na retinopatia diabética – modelo pré-clínico

Claudia Sayuri Saçaki¹, Bassam Felipe Mogharbel¹, Priscila Elias Ferreira Stricker¹, Fabiano Montiani-Ferreira², Juan Moreno², Mario Sato³, Naoye Shiokawa³, Lucia Noronha⁴, Mariana Bacellar-Galdino⁵ e Katherine Athayde Teixeira de Carvalho¹

¹ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Departamento de Medicina Regenerativa, Terapia Avançada e Biotecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil, ² Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária, Curitiba, Paraná, Brasil, ³ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Oftalmologia, Curitiba, Paraná, Brasil, ⁴ Pontifícia Universidade Católica, Departamento de Patologia, Curitiba, Paraná, Brasil, ⁵ Ophthy-DS, Michigan, EUA.

*Correspondente: claudiasacaki@gmail.com; Tel.: +55-41-988067606

Resumo: De acordo com a Federação Internacional de Diabetes até 2030 mais de 650 milhões de pessoas serão diagnosticadas com diabetes. Considerando este número expressivo, é relevante encontrar medicamentos e tratamentos, a fim de, diminuir, regredir ou curar esta patologia e suas complicações, como, a retinopatia diabética. Os danos causados ao longo do tempo pelo diabetes, decorre com o declínio de vários órgãos, e os agravos na retina cursam com a perda visual. Desta forma, a presente pesquisa avaliou os efeitos da terapia celular, especificamente, das células precursoras neuronais em ratos Wistar, induzidos à retinopatia diabética. Para isto, as células-tronco mesenquimais da Geleia de Wharton do cordão umbilical humano, foram isoladas, expandidas e semeadas em substrato de biopolímero sem a adição de fatores de crescimento para desenvolver neuroesferas. As células precursoras neuronais obtidas deste cultivo, foram caracterizadas através de imunocitoquímica. Os animais foram divididos em três grupos; não diabéticos n=4; diabéticos sem tratamento n=9 e diabéticos tratados com terapia celular n=9. As células foram transplantadas através de injeção intravitreal (1×10^6 cel/ μ L) nos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Avaliações foram feitas por tomografia de coerência óptica e eletrorretinografia nos tempos; pré-indução; diabético e pós terapia celular. Quatro semanas após o tratamento, os olhos foram enucleados, seguidos de análise histopatológica e imunohistoquímica. Nos resultados, as células precursoras neuronais aumentaram a camada de células ganglionares da retina, melhoraram a camada de fotorreceptores e diminuíram pontos de neovasos, evidenciados pelos achados da eletrorretinografia, tomografia de coerência óptica, histopatologia e imunohistoquímica. O resultado mais relevante foi a diferença morfológica entre ratos tratados *versus* não tratados, no qual exibiu a melhoria de várias camadas, notavelmente do epitélio pigmentar da retina e fotorreceptores. Foi demonstrado neste trabalho que as células precursoras neuronais reduziram a progressão da retinopatia diabética, através do efeito neuroprotetivo, promovendo a regeneração da retina.

Palavras-chave: retinopatia diabética, células-tronco mesenquimais, células precursoras neuronais, terapia celular.



O impacto das tecnologias de sequenciamento na identificação computacional de RNAs longos não-codificantes

Alisson Gaspar Chiquitto¹, Lucas Otávio Leme Silva¹, Liliane Santana Oliveira¹, Douglas Silva Domingues^{1,2}, Alexandre Rossi Paschoal^{1*}

¹Grupo de Bioinformática e Reconhecimento de Padrões, NAPI Bioinformática, Departamento de Computação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Cornélio Procópio-PR, Brasil; ²Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, SP, Brasil

*Correspondente: paschoal@utfpr.edu.br; Tel.: +55 (43) 3133-3868

Resumo: As tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (ou do inglês *high-throughput sequencing* - HTS) inauguraram uma nova era nas análises de dados de ômicas. Porém, a qualidade dos transcritos reconstruídos ainda são questionáveis devido à dificuldade inerente da reconstrução de estruturas de transcritos inteiros via tecnologia de leituras de sequências curtas ou *short-reads*. A este respeito, técnicas de sequenciamento de leituras longas, ou *long-reads*, tais como ISO-Seq e Nanopore tem um grande potencial para aperfeiçoar a qualidade da anotação do transcriptoma. Apesar do avanço nessas tecnologias de transcritos completos ou *full length transcripts*, o processo de anotação de RNAs não-codificadores longos (lncRNAs) ainda carece de esforços dedicados também a estas novas tecnologias. Como podemos perceber na literatura, as ferramentas desenvolvidas para predição de lncRNAs foram treinadas utilizando transcritos reconstruídos a partir de leituras curtas. Deste modo, existe um hiato sobre a contribuição de leituras longas nesses métodos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar se essas ferramentas podem predizer corretamente lncRNAs em dados gerados por tecnologias baseadas em leituras longas, e qual o impacto destas novas tecnologias. Baseado em revisões de ferramentas de predição de lncRNA, foram definidos um conjunto de 14 ferramentas usados para identificação *in silico* de lncRNAs. Dessas ferramentas, nove foram utilizadas especificamente para dados de humanos (CNCI, COME, CPAT, LncADeep, lncRNA.net, lncScore, PLEK, RNAMining e RNAsamba), quatro especificamente para dados de plantas (CREMA, LncMachine, PLncPRO e RNAplonc) e uma ferramenta (CPC2) foi utilizada para ambos, humanos e plantas. Para avaliar as ferramentas selecionadas, escolhemos 17 conjuntos contendo sequências de transcritos, dos quais 12 contém dados de plantas (três são compostos de leituras curtas e nove de leituras longas) e cinco de dados de *Homo sapiens* (um composto de leituras curtas e quatro de leituras longas). Em seguida, as ferramentas foram executadas nos devidos conjuntos de dados selecionados como entrada, e o desempenho de cada ferramenta foram analisadas usando duas métricas: sensibilidade e frequência relativa. A partir dos resultados analisados, foi possível observar uma melhora nos valores de sensibilidade para as ferramentas LncADeep, CPAT, e lncRNA.net com dados de leituras longas, quando comparado com dados de leituras curtas no genoma humano. A respeito dos maiores valores médios de sensibilidade em relação a todos os conjuntos de dados, esses valores foram alcançados pelas ferramentas RNAMining, CNCI, LncADeep e lncRNA.net. Para os conjuntos de dados de plantas, as ferramentas CPC2 e RNAplonc atingiram os melhores resultados, pois conseguiram identificar a maior quantidade de lncRNAs nos conjuntos de leituras longas, apesar do bom desempenho da ferramenta PLncPRO em leituras curtas. Estes resultados contribuirão para compreender a influência das tecnologias de sequenciamento de leituras curtas e longas na identificação de lncRNAs, e assim, aperfeiçoar os métodos de análise de lncRNAs.

Palavra-chave: RNAs não codificantes; tecnologias de sequenciamento de alta performance; codificação; métodos; avaliação comparativa; Ferramentas; NGS; transcritos.



Avaliação *in vitro* do Potencial Uso de Arcabouços 3D de Alumina Funcionalizados com Vesículas Extracelulares para Regeneração Óssea

Daniele de Freitas Garcia^{1*}; Gustavo Xavier Peres²; Marco Augusto Stimamiglio¹; Lucas Freitas Bert²; Bruna Hilzendeger Marcon¹; Alejandro Correa Dominguez¹

¹Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR, Departamento de Ciências Básicas de Células-tronco, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Universidade Tecnológica do Paraná, Departamento Acadêmico de Mecânica, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: daniele.garcia@fiocruz.br; Tel.: (43) 99962-3432

Resumo: As lesões ósseas envolvem desde problemas degenerativos até fraturas ocasionadas por acidentes. Os tratamentos disponíveis atualmente se limitam a devolver a sustentação física ao local lesionado, como no caso do uso de próteses metálicas, ou ao tratamento de pequenas lesões com o uso de enxertos ósseos. Devido a isso, é necessário que haja diferentes técnicas que possibilitem o reestabelecimento da função do tecido lesionado. Nesse contexto, a medicina regenerativa traz novas abordagens, como o uso de biomateriais em arcabouços 3D e o tratamento envolvendo células-tronco e seus derivados. Para lesões ósseas, um biomaterial promissor é a alumina (óxido de alumínio), que é um composto cerâmico, bioinerte, que possui propriedades mecânicas que mimetizam o osso e já é estudada em tratamento odontológicos, podendo ser utilizada em diferentes formatos. As células-tronco mesenquimais (CTM) além da sua aplicação inicial na terapia celular, também apresentam atividade parácrina, como a liberação de vesículas extracelulares (VEs), que funcionam como sinalizadores biológicos com reconhecido potencial regenerativo. Por isso, o objetivo desse trabalho é avaliar *in vitro* o uso dos arcabouços porosos de alumina funcionalizados com as VEs como uma proposta de tratamento para as lesões ósseas. Para isso, os arcabouços de alumina foram produzidos através da técnica de espumação direta, com sua ultraestrutura caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual possibilitou a visualização detalhada da superfície do arcabouço, onde foi observada uma estrutura porosa com uma superfície granulosa. Inicialmente, foi padronizado o modo de esterilização do arcabouço em estufa à 160°C por 2 horas, que foi comprovado através da verificação da ausência de micoplasma por RT-qPCR. Em seguida, sua citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de captação de vermelho neutro, pelo qual os arcabouços não foram citotóxicos para os dois tipos celulares testados, CTM e fibroblastos de camundongos (3T3). A partir disso, foi avaliado a capacidade das CTM de aderirem ao arcabouço, com o plaqueamento tendo uma adesão inicial de 73% e um aumento de 3x da quantidade inicial aderida ao arcabouço ao final de 7 dias. O cultivo foi acompanhado para verificar a presença e a morfologia das células, para isso, os arcabouços foram fixados nos dias 3 e 7, para visualização por MEV e através da marcação com DAPI e Beta-Tubulina em microscópio de fluorescência pelos quais foi possível observar o aumento do número de núcleos das células marcados pelo corante DAPI e a morfologia fibroblastoide, correspondente ao esperado. Como próximos passos do trabalho, serão isoladas as VEs das células-tronco e osteoblastos para a funcionalização dos arcabouços, a partir disso, serão testados ensaios de diferenciação osteogênica a fim de avaliar a influência na diferenciação com o uso das VEs. Os resultados obtidos até o momento sugerem a segurança do uso dos arcabouços de alumina para o cultivo das células e a interação entre elas e a superfície do arcabouço o que representa um potencial para a sua aplicação na medicina regenerativa. Com os experimentos que ainda serão feitos espera-se encontrar indícios positivos da aplicação das VEs para o contexto estudado.

Palavra-chave: Células-tronco Mesenquimais; Terapia Celular; Medicina Regenerativa; Osteogênese.



Membrana amniótica descelularizada como carreador de células e matriz extracelular em engenharia tecidual óssea

Dilcele Silva Moreira Dziedzic¹, Bassam Felipe Mogharbel¹, Ana Carolina Irioda¹, Priscila Elias Ferreira Stricker¹, Célia Regina Cavichiolo Franco², Katherine Athayde Teixeira de Carvalho^{1*}

¹ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe & Faculdades Pequeno Príncipe, Terapias Avançadas e Biotecnologia Celular na Medicina Regenerativa, Curitiba, Paraná, Brasil; ² Universidade Federal do Paraná, Biologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil

*Correspondente: dilceledez@gmail.com; Tel.: +41-99945-0513

Resumo: O potencial de biomateriais facilmente coletados foi investigado para aplicação na engenharia de tecidos ósseos, através do emprego de uma fonte de células possivelmente autóloga associada a uma matriz de colágeno amplamente disponível. Neste estudo foi empregada membrana amniótica humana descelularizada (MAD) como arcabouço para transplante de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTA) e de matriz extracelular (MEC) depositada no período de diferenciação celular em osteoblastos *in vitro*. CTA coletadas de ratos Wistar machos com oito semanas foram cultivadas sobre MAD e transplantadas em defeitos ósseos não cicatrizantes em calvária (n=15) e em defeitos periodontais em animais da mesma espécie (n=25). Defeitos únicos em calvária foram divididos em controle sem tratamento, tratamento com quatro camadas de MAD, ou quatro camadas de MAD + CTA. Defeitos de furca periodontal receberam tratamentos com MAD, MAD + CTA, MAD + MEC, ou MAD + MEC +CTA, comparados a defeitos sem tratamento contralaterais. Durante o período *in vitro* MAD preservou a estrutura de suporte, promoveu adesão e expansão das CTA, além da deposição de matriz extracelular mineralizada semelhante a osso quando as células foram cultivadas em meio osteoindutor por quatro semanas, com depósitos globulares calcificadas associadas às células na superfície da MAD e no interior da matriz de colágeno. A cicatrização óssea na presença de MAD e CTA foi observada por microtomografia computadorizada e histologia após 12 semanas em calvária, e após quatro semanas em defeitos periodontais. Defeitos em calvária demonstraram que MAD promoveu a osteocondução e MAD + CTA estimulou a deposição óssea, comparados ao controle. Em defeitos periodontais de furca MAD e MAD+CTA melhoraram a cicatrização óssea em comparação com controle no nível gengival. Em conclusão, MAD suportou a neovascularização e promoveu a osteocondução em ambos os tipos de defeitos, e a regeneração óssea foi mais estimulada por CTA indiferenciadas.

Palavra-chave: membrana amniótica; células-tronco; tecido adiposo; defeito ósseo.

DOI: 10.1007/s00223-020-00793-1

DOI: 10.3390/membranes11080606



Interação das DPSC com arcabouços de baixo custo em acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) prototipados em impressora 3D

Fabiane Barchiki^{1*}, Lidiane Maria Boldrini Leite¹, Alexandra Cristina Senegaglia¹, Crisciele Kuligovski², Alejandro Correa Dominguez², Sérgio Adriane Bezerra de Moura³, Paulo Roberto Slud Brofman¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil; ²Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-PR, Curitiba, Paraná, Brasil; ³ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

*Correspondente: fabiane_b@yahoo.com.br; Tel.: +55-41-3271-2219

Resumo: A popularização das impressoras 3D extrusoras, em que a modelagem ocorre por fusão e deposição, despertou um grande interesse da área da saúde com o intuito de desenvolver biomodelos, para estudantes ou para planejamento de cirurgias complexas. Logo em seguida a bioengenharia analisou vários polímeros quanto a sua biocompatibilidade, de modo a permitir seu uso clínico, com a finalidade de reparar ou substituir tecidos acometidos por traumas ou alterações patológicas. Polímeros de grau clínico são biomateriais com alto valor comercial e são utilizados principalmente na ortopedia. As custas destes materiais prejudicam a ampla distribuição no atendimento a população. O acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) é um material com valor inferior aos demais polímeros utilizados na clínica médica, já demonstrou seu potencial uso como biomaterial, entretanto os estudos não apresentam análises direcionadas a comprovação de sua biocompatibilidade. Um tipo celular muito descrito nestas avaliações são as células estromais mesenquimais derivadas da polpa dentária (DPSC), devido às características de fácil obtenção, rápida proliferação, potencial de diferenciação e baixa imunogenicidade. O ABS pode ser produzido em filamentos e então prototipado em impressora 3D em inúmeras formas. Podendo atender a necessidade de produção de enxertos personalizados aos pacientes, uma vez que os dados obtidos em ressonância magnética e tomografias podem ser convertidos para prototipagem. O objetivo deste estudo foi analisar a compatibilidade biológica de arcabouços em ABS, produzidos em impressora 3D, associados as DPSC. O polímero ABS foi impresso por extrusão, em formato de disco, camada a camada, com orientação ortogonal de modo a constituir uma trama tridimensional, sendo posteriormente esterilizado por óxido de etileno. DPSC (n=3) foram isolados por digestão enzimática e expandidos *in vitro*. Para verificar a adesão e proliferação celular, utilizamos a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e DPSC bioluminescentes, que expressam luciferase devido a transdução (Dias 0-7). A viabilidade celular e o perfil imunofenotípico das células foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo (Dias 0-14-28). A estabilidade genética foi demonstrada pela técnica de bandejamento G (Dias 0-14). Todas as análises foram realizadas antes e após o cultivo celular nos discos. A mensuração dos fótons emitidos pelas células bioluminescentes confirmou e migração celular em ambos os polímeros testados, o aumento do sinal durante os dias de acompanhamento do cultivo comprovou a proliferação celular, sendo mais evidente no controle, seguido do ABS. Estes resultados foram confirmados na MEV. A viabilidade antes do cultivo de DPSC nos discos foi de 98,4% e após cultivo no ABS de 96,6%. O perfil imunofenotípico foi positivo para CD29, CD73, CD90, CD105, CD166, negativo para CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR em todas as análises. Foi mantida a estabilidade cromossômica em todas as condições de cultivo. Os resultados demonstraram um perfil de biocompatibilidade no polímero ABS associado as DPSC. Esses dados incentivam o desenvolvimento de estudos *in vivo* associando DPSC ao ABS prototipado de acordo com a necessidade, podendo ainda confirmar se as células irão auxiliar no processo de integração do enxerto.

Palavra-chave: polímero; impressora 3D; enxerto; biocompatibilidade.



Validação de metodologia POCT para a determinação de perfil lipídico em amostras de sangue total capilar

Gabriele Luise Neves Alves^{1*}, Halanna de Paula Riedi¹, Rafaela Fortes Correa¹, Vanessa Hintz Albano¹, Lucca Malucelli¹, Matheus Gonçalves Severo¹, Carolina Melchiorretto dos Santos¹, Caio Corsi Klosowski¹

¹ Hilab, Validação de Metodologias Analíticas, Curitiba, Paraná, Brasil, CEP 81270-185.

*Correspondente: gabriele.alves@hilab.com.br; +55 41 98406-5051.

O exame de perfil lipídico é composto por uma série de testes diagnósticos quantitativos de rotina, utilizados para avaliar o risco de doença cardíaca coronariana e outras condições clínicas. Em laboratórios convencionais, o exame revela a concentração de colesterol total (CHOL), colesterol HDL (HDL-c), colesterol LDL (LDL-c) e triglicerídeos em amostras de soro. Um diagnóstico mais completo pode ainda mensurar, de forma complementar, o colesterol VLDL (VLDL-c) e o colesterol não-HDL (não-HDL-c). O objetivo deste estudo foi a validação de um teste laboratorial remoto, ou *point-of-care testing* (POCT), por meio da análise da correlação clínica entre a metodologia alternativa e os resultados de um laboratório convencional credenciado pelo Colégio Americano de Patologistas. O exame avaliado utiliza um analisador portátil (Hilab Flow) para a obtenção dos resultados de testes colorimétricos para CHOL, HDL-c e triglicerídeos, além de calcular indiretamente a concentração de LDL-c (equação de Martin), VLDL-c (equação de Friedewald) e não-HDL-c (diferença entre CHOL e HDL-c). As análises POCT, realizadas por inteligência artificial e verificadas por profissionais habilitados, são feitas a partir de 40 microlitros de sangue capilar, coletado por punção digital, sem a necessidade de coleta venosa. Um sistema embarcado de internet das coisas no leitor permite a análise remota das reações em um único teste e a liberação de laudo digital assinado em 15 minutos. Neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue capilar e de soro de 150 doadores voluntários selecionados randomicamente. As amostras de sangue capilar foram analisadas no leitor imediatamente após a coleta, enquanto as amostras de soro, coletadas no mesmo momento, foram enviadas para o laboratório de referência, para análise enzimática-colorimétrica no equipamento Beckman AU5800, com liberação de resultados em 24 horas. Os parâmetros de desempenho do exame foram avaliados por meio de regressão das curvas (coeficiente de correlação e interceptação y) e por meio da interpretação da correlação de Pearson (r) para CHOL, HDL-c e triglicerídeos. O critério de aceitação foi obter uma inclinação entre 0,85 e 1,15, que é uma regra prática comum para métodos POCT. Os dados referentes aos analitos com concentração estimada indiretamente derivam da relação entre os valores observados para o conjunto testado. Como resultado, a inclinação das curvas foi de 1,08, 0,97 e 1,07 para CHOL, HDL-c e triglicerídeos, respectivamente, enquanto os valores da correlação de Pearson, na mesma ordem, foram 0,92, 0,95 e 0,96. O exame POCT apresentou parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia superiores a 99% para CHOL; 96,3% de sensibilidade e superiores a 99% para especificidade e acurácia para HDL-c; e superior a 99% de sensibilidade, 98,2% de especificidade e superior a 99% de acurácia para triglicerídeos. De acordo com os resultados, conclui-se que o exame de perfil lipídico POCT realizado no equipamento Hilab Flow representa uma alternativa mais rápida e menos invasiva de testagem para a determinação do perfil lipídico, com desempenho comparável ao do laboratório de referência.

Palavra-chave: point-of-care testing; diagnóstico; Hilab; perfil lipídico; colesterol; triglicerídeos.



Novo analisador hematológico *point-of-care* com diferenciação celular através do uso de inteligência artificial

Aléxia Thamara Gasparin¹, Claudiane Isabel Franco Araujo^{1*}, Juliana Beker Godoy¹, Halanna de Paula Riedi², Gabriele Luise Neves Alves²

¹Hilab, Pesquisa e Desenvolvimento Laboratorial, Curitiba, Paraná, Brasil, CEP 81270-185; ²Hilab, Validação de Metodologias Analíticas, Curitiba, Paraná, Brasil, CEP 81270-185.

*Correspondente: claudiane.isabel@hitechnologies.com; Tel.: +55-41-98879-3043

O hemograma é um dos exames mais informativos da atualidade, pois é capaz de orientar sobre o estado de saúde geral do paciente, permitindo o acompanhamento e o diagnóstico de doenças. Os principais parâmetros avaliados neste exame são a contabilização do número de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, além da quantificação dos níveis de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM). Atualmente, os equipamentos que realizam o hemograma são automatizados e realizam a análise dos resultados através de diversas técnicas, entre elas, a de ensaio da condutividade celular por impedância (resistividade-impedância) e a citometria de fluxo. Por se tratar de um exame minucioso, as metodologias utilizadas para a avaliação dos diferentes parâmetros demandam tempo, desde a coleta até a liberação do resultado, exigem instalações laboratoriais complexas e dispendiosas, além de ser imprescindível o treinamento de pessoal nos diferentes equipamentos e técnicas utilizadas para a liberação do resultado final. Dessa forma, a testagem remota por *point-of-care testing* (POCT) vem revolucionando a clínica médica ao oferecer inúmeras vantagens quando comparado aos testes laboratoriais tradicionais. Entre as vantagens apresentadas pela metodologia, estão a portabilidade e facilidade em usar os equipamentos, sem a necessidade de treinamento técnico elaborado, a possibilidade de se obter resultados quantitativos usando pequenas quantidades amostrais e a velocidade no processamento e entrega de resultados, o que possibilita imediatas intervenções terapêuticas, quando necessário. Diante disso, a Hilab desenvolveu a plataforma de hematologia Hilab System que consiste na utilização dos equipamentos POCTs Hilab Lens, para análise microscópica digital, e o Hilab Flow, para avaliação dos parâmetros hematimétricos utilizando a técnica de cromatografia. Esses equipamentos utilizam a inteligência artificial, aprendizado de máquina, e a dupla verificação dos resultados por um profissional qualificado, para possibilitar a realização do hemograma, podendo ainda ser utilizado em diversas aplicações que necessitem gerar e tratar imagens digitais de microscopia óptica. No estudo de validação do Hilab System, 450 amostras de sangue foram avaliadas, sendo que 18% delas possuíam alguma alteração patológica. Para as análises de acurácia, precisão e detecção de anormalidade nos analitos avaliados, o método Hilab foi comparado com os resultados emitidos pelo equipamento Sysmex XE-2100 (Sysmex, Japão). Os resultados das análises foram avaliados através da correlação de Pearson, regressão de Passing Bablok, teste *t* de Student e Bland-Altman para cada um dos analitos investigados. Como resultado, foi observado que o sistema Hilab e Sysmex XE-2100 possuem forte correlação ($r \geq 0,9$) para a maioria dos analitos, enquanto os estudos de acurácia indicaram exatidão dos resultados, dentro dos limites estipulados. Da mesma forma, a capacidade de detecção de alterações celulares apresentou alta sensibilidade, especificidade e acurácia. De acordo com os resultados apresentados, o sistema desenvolvido pela Hilab apresenta uma análise robusta, precisa, rápida e barata, possibilitando uso clínico confiável para análises hematológicas.

Palavra-chave: *point-of-care*; hemograma; inteligência artificial; aprendizado de máquina; contagem de plaquetas; diferencial de leucócitos.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13913-8>



Avaliação do colágeno nas vias aéreas de camundongos Balb/c submetidos à asma alérgica e tratados com células-tronco mesenquimais humanas

Henrique Trigo de Castro Junior ¹, Lidiane Maria Boldrini Leite ^{1*}, Pedro Vicente Michelotto Júnior ², Sérgio Adriane Bezerra de Moura ³, Luiz Guilherme Achcar Capriglione ¹, Paulo Roberto Slud Brofman ¹, Alexandra Cristina Senegaglia ¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil;

²Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Escola de Ciências da Vida, Curitiba, Paraná, Brasil;

³Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Departamento de Morfologia, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

*Correspondente: lidiane.leite@pucpr.br; Tel.:+55-41-32712219

A asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo remodelamento das vias aéreas, decorrente de modificações celulares e teciduais, como o aumento na deposição de colágeno. Os tratamentos convencionais não revertem os danos no tecido pulmonar, tornando importante a busca por estratégias terapêuticas que atuem nesse processo, como as células-tronco mesenquimais (CTMs), que têm demonstrado seu potencial no controle da inflamação e no reparo tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das CTMs derivadas da medula óssea humana na deposição de colágeno nas vias aéreas de camundongos Balb/c submetidos ao modelo experimental de asma alérgica. Camundongos Balb/c machos foram divididos nos grupos: Controle (animais saudáveis e que receberam apenas solução salina em todas as etapas de indução do modelo experimental); asmático (animais induzidos à asma e que não receberam tratamento) e tratamento (animais induzidos à asma e que foram tratados com CTMs de medula óssea humana). Todos os animais foram eutanasiados no sétimo dia após o transplante. Os pulmões foram removidos para avaliações histopatológicas. Os cortes pulmonares foram corados com Tricrômio de Masson para análise do colágeno total e Picrosirius-Hematoxilina para quantificar o colágeno tipo I e III. A distribuição do colágeno total foi analisada conforme a sua presença e intensidade, especialmente na região peribronquiolar. A predominância dos colágenos tipo I e III no tecido pulmonar foi analisada pelo teste qui-quadrado, para evidenciar a associação dos tipos de colágeno entre os grupos. O grupo controle apresentou deposição de colágeno total com aspectos de normalidade (grau leve), o grupo asmático demonstrou quantidade aumentada (grau intenso) e no grupo tratamento houve redução no tecido pulmonar (grau moderado/leve), especialmente na região peribronquiolar dos camundongos. Além disso, verificou-se que nos grupos controle e tratamento houve prevalência do colágeno tipo I. Em contrapartida, no grupo asmático houve predominância do tipo III. Houve diferença significativa na expressão dos colágenos tipo I e III quando comparados os grupos controle vs. asmático ($p < 0,001$) e asmático vs. tratamento ($p < 0,001$). No entanto, esta associação não foi observada entre os grupos tratamento vs. controle ($p = 0,309$). O tratamento com CTMs de medula óssea humana reduziu a deposição de colágeno nas vias aéreas de camundongos Balb/c induzidos à asma alérgica, com predominância o colágeno tipo I, semelhante aos animais saudáveis, demonstrando seu potencial para uso na pesquisa clínica como produto de terapia celular avançada.

Palavra-chave: Asma alérgica; vias aéreas, remodelamento; colágeno; células-tronco mesenquimais.



Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADMSCs) crescidas em microcarreadores 3D (Cytodex-1) e suas vesículas extracelulares.

Ingrid Larissa Melo de Souza^{1*}, Raphaella Josino¹, Bruna H. Marcon¹, Alejandro C. Dominguez¹, Marco Augusto Stimamiglio¹

¹Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR, Departamento de Ciências Básicas de Células-Tronco, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: ingridlms@yahoo.de; Tel.: (41) 9 99349875.

Vesículas extracelulares (VEs) provenientes de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADMSCs) têm sido usadas na medicina regenerativa para reparo tecidual. A fração de VEs com origem endossomal, exossomos, liberados por vários tipos de células para o espaço extracelular, são pequenas vesículas lipídicas (VLs) (30-150 nm) nas quais as tetraspaninas estão enriquecidas, por exemplo, CD81, CD82, CD9 e CD63. Em estudos gerais, o sucesso do isolamento de VEs a partir das ADMSCs é baseado na detecção de marcadores de superfície (CD9, CD63 e CD81) e marcadores internos como TSG101, Alix e Syntenina-1. No local da ferida, as VEs de ADMSCs modulam a resposta imune e inflamação. Elas também promovem angiogênese, aceleram a proliferação e re-epitelização de células da pele e regulam a remodelação de colágeno que inibe a hiperplasia da cicatriz. VEs não são rejeitadas pelo sistema imune, tendo um potencial residente e a sua dosagem pode ser facilmente controlada. VEs de ADMSCs podem induzir o aumento de enxertos de gordura e promover a cicatrização de feridas em pacientes com diabetes mellitus. Elas também podem atuar como carreadores de moléculas e serem combinadas com arcabouços para tratamentos no local da lesão. Em geral, as VEs de ADMSCs são conhecidas pelo potencial clínico de indução do reparo tecidual. Com o objetivo de coletar VEs em larga escala para uso em produtos farmacêuticos, muitos estudos têm expandido o cultivo de ADMSCs em biorreatores utilizando microcarreadores 3D, como Cytodex-1 e Cytodex-3. Este presente trabalho visou caracterizar o crescimento 3D de ADMSCs em microcarreadores Cytodex-1 com relação às proteínas do citoesqueleto, secreção de componentes da matriz extracelular e viabilidade celular e as VEs de ADMSCs com relação ao tamanho, morfologia e perfil de proteínas. ADMSCs crescidas no Cytodex-1 apresentaram fenótipo normal de MSCs (CD105⁺, CD73⁺ e CD90⁺), proteínas do citoesqueleto (β -Actina, F-Actina e β -Tubulina) e secreção de fibronectina (matriz extracelular). Além disso, a morfologia, tamanho e marcadores de VEs (CD63, CD9, TSG101) foram observados como esperado. Este trabalho é o passo inicial para a expansão do cultivo de ADMSCs em biorreatores almejando a coleta em larga-escala de VEs de ADMSCs para estudos clínicos em medicina regenerativa.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADMSCs); vesículas extracelulares (EVs); exossomos; microcarreadores.



Uso de células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente permanente no tratamento da Doença de Parkinson em modelo animal

Letícia Fracaro^{1*}, Evellyn Mayla Azevedo², Agner Henrique Dorigo Hochuli¹, Jessica Ilkiw², Ellen Larissa Bail², Ana Helena Selenko¹, Luiz Guilherme Achcar Capriglione¹, Alexandra Cristina Senegaglia¹, Marcelo de Meira Santos Lima², Paulo Roberto Slud Brofman¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil. ² Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Neurofisiologia, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: leticiafracaro@gmail.com ; Tel.: +55 41 9 9916 2714.

Introdução: A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente pessoas com mais de 65 anos. Esta doença causa a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc). As terapias disponíveis tratam apenas os sintomas. Assim, as células-tronco mesenquimais (CTM) surgem como uma opção de tratamento. A polpa do dente é uma fonte de CTM com coleta não invasiva. Suas células (DPSC) têm um potencial significativo no tratamento de doenças neurodegenerativas, pois compartilham a mesma origem embrionária dos neurônios. **Objetivo:** Este estudo avaliou os efeitos da infusão de DPSC induzida e não induzida na diferenciação neuronal em um modelo animal de DP induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). **Metodologia:** As DPSC foram isoladas de terceiros molares, e as células foram caracterizadas de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (ISCT). As células foram induzidas à diferenciação neuronal durante 21 dias. Após, o potencial de diferenciação das DPSC foi avaliado pela expressão de marcadores por imunofluorescência e imunofenotipagem. A DP foi induzida em ratos Wistar machos por infusão de 6-OHDA (3µg em 1µL de solução fisiológica com ácido ascórbico 0,2%) ou solução fisiológica com ácido ascórbico 0,2% (1µL) no feixe prosencefálico medial, gerando uma lesão retrógrada no SNpc. Foram realizados os seguintes grupos: SHAM, 6-OHDA+solução salina, 6-OHDA+DPSC e 6-OHDA+DPSC induzidas à diferenciação neuronal. Após sete dias de injeção de 6-OHDA, 100.000 células foram transplantadas na SNpc. Um teste de campo aberto foi realizado antes e sete dias após a infusão das células para verificar a atividade locomotora. Após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados. Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase no SNpc foi realizada para avaliar a densidade de neurônios dopaminérgicos. **Resultados:** As DPSC apresentaram características de CTM de acordo com ISCT e expressão de marcadores neuronais. Após a diferenciação, houve aumento na expressão de Nestina ($p=0,0188$) e β -tubulinaIII ($p<0,0001$) quando comparado ao controle. A análise *in vivo* mostrou que os grupos que receberam transplante de DPSC ($p<0,01$) e DPSC induzida à diferenciação neuronal ($p<0,01$) foram capazes de reduzir a morte de neurônios dopaminérgicos do SNpc promovida pela neurotoxina ($p<0,001$) quando comparado ao grupo SHAM. Além disso, a análise comportamental mostrou uma redução significativa ($p<0,05$) na atividade locomotora dos animais após a infusão de 6-OHDA em relação ao grupo SHAM e que foi revertida após a injeção de DPSC. Por fim, ambos os parâmetros apresentam correlação positiva ($r=0,6195$; $p=0,0061$), reforçando o papel dos neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc no controle motor. **Conclusão:** Os resultados obtidos demonstraram que as DPSC induzidas e não induzidas à diferenciação neuronal foram capazes de reverter o comprometimento motor característico da DP relacionado a uma elevação na densidade de neurônios dopaminérgicos. Esses resultados sugerem que as DPSC possuem um potencial neuroprotetor que pode ser explorado como estratégia terapêutica na DP.

Palavra-chave: 6-OHDA, teste comportamental, tirosina hidroxilase, neurônio dopaminérgico



Estudo do potencial genotóxico de um produto de terapia avançada composto de membrana amniótica com células-tronco mesenquimais humanas

Henrique Trigo de Castro Junior^{1*}, Lidiane Maria Boldrini Leite¹, Isadora May Vaz¹, Nathalia Forti Francisco¹, Fabiano Kupczik², Alexandra Cristina Senegaglia¹, Paulo Roberto Slud Brofman¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil; ²Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Hospital Universitário Cajuru, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: henrique.trigocastro@hotmail.com; Tel.:+55-41-32712219

Os produtos de terapia avançada (PTA) têm despertado grande interesse para o tratamento de lesões sem alternativas médicas disponíveis, como as associadas ao tecido cartilaginoso. A membrana amniótica humana (MAH) recelularizada com células-tronco mesenquimais (CTM) representa um biomaterial com alto potencial terapêutico para o reparo tecidual. Para isso, torna-se necessário a realização de testes de biocompatibilidade capazes de avaliar a genotoxicidade do PTA. O objetivo do presente estudo foi avaliar se o PTA composto por MAH recelularizada com CTM derivadas do tecido de cordão umbilical (TCU) humano em co-cultivo com condrócitos apresenta potencial genotóxico. O PTA foi constituído de MAH descelularizada, seccionada e recelularizada com CTM de TCU humano. Para avaliação da biocompatibilidade, os condrócitos foram co-cultivados com: CTM, PTA, membrana comercial (MC) Chondro-Gide® com CTM. Para a comparação dos dados foi realizado o controle positivo com as células HeLa e o controle negativo com os condrócitos (C). O potencial genotóxico foi analisado pelas técnicas de cometa, micronúcleo e bandeamento GTG. Os testes demonstraram baixos índices de alterações nucleares nas amostras co-cultivadas com o PTA em comparação com a MC Chondro-Gide®. No ensaio cometa as amostras co-cultivadas com CTM, PTA e MC apresentaram o índice de dano (ID)=0%. O teste de micronúcleo demonstrou similaridade no índice de divisão nuclear (IDN) nas amostras co-cultivadas com PTA (1,37) e da MC (1,26). A análise cromossômica por bandeamento GTG não identificou alterações nos cariótipos dos condrócitos analisados individualmente e co-cultivados nas condições de estudo. O PTA formado pelas CTM associadas à MAH não produziu efeito genotóxico superior ao produto comercial, sugerindo, a partir dessa avaliação, a biocompatibilidade para uso em tratamento clínico como lesões da cartilagem.

Palavra-chave: Produto de terapia avançada; células-tronco mesenquimais; cordão umbilical; membrana amniótica; condrócitos; genotoxicidade.



Tratamento da lesão muscular com células-tronco mesenquimais isoladas da polpa dentária associadas ao treinamento de natação – estudo experimental em ratos

Luize Kremer Gamba¹, Victoria Stadler Tasca Ribeiro¹, Eduardo Discher Vieira³; João Cesar Zielak^{2,3}; Paulo Ricardo Baggio Simeoni¹; Rossana Baggio. Simeoni¹, Luiz Cesar Guarita-Souza¹, Vinicius Coneglian Santos²; Ricardo Correa Cunha^{1,2} and Julio Cesar. Francisco.^{2,4}

¹Laboratório Experimental do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Caixa 80.215-901, Curitiba, Paraná, Brasil. ²Escola de Ciências da Saúde da Universidade Positivo, – R. Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300 - Campo Comprido, Curitiba – PR, Brasil. ³Curitiba biotech– R. Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300 - Campo Comprido, Curitiba – PR, Brasil. ⁴ Curso de Farmácia - UniCuritiba– R. Chile, 1678 - Rebouças, Curitiba - PR, 80220-181, Brasil.

*Correspondence: Luize Kremer Gamba, luizekremer@hotmail.com. Tel.: +55-48-999-66626

Resumo: As lesões musculares esqueléticas estão aumentando drasticamente em diversos eventos esportivos afetando a qualidade de vida dos atletas. As células-tronco da polpa dentária (DPSC) associadas ao exercício físico podem melhorar esse processo de reparação e regeneração de tecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de reparação das DPSC combinada com o treinamento de natação na regeneração musculoesquelético. Para examinar os efeitos das DPSC e o treinamento de natação, lesionamos músculo vasto lateral de ratos machos adultos. Os animais foram divididos em sedentários (S) com e sem células e treinados (T) com e sem células. O treinamento consistiu de natação a 60 min/dia, cinco dias/semana durante 3 semanas. O protocolo de treinamento foi confirmado pela concentração de lactato sanguíneo, respectivamente. As células-tronco da polpa dentária foram isoladas e expandidas de acordo com boas condições de prática de fabricação e caracterizadas pela citometria de fluxo. Os resultados morfológicos e histopatológicos mostraram que a terapia combinada DPSC + exercício de natação causaram um aumento significativo na quantidade total de fibras de colágeno tipo I na região lesada quando em comparação com a DPSC e o treinamento de natação individualmente.

Palavra-chave: célula-tronco da polpa dentária, músculo esquelético, reparação muscular, terapia regenerativa.



Desenvolvimento de um Pulmão Artificial 3D como Ferramenta para Teste de Candidatos à Medicamentos para o COVID-19

Nádia Nascimento da Rosa ^{1*}, Ana Carolina Irioda ¹, Bassam Felipe Mogharbel ¹, Nathalia Barth de Oliveira ¹, Julia Maurer Appel ¹, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho ¹

¹Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brasil

*Correspondente: nadianr@gmail.com; Tel.: +55-41-992255228

Resumo: Atualmente o mundo se encontra em um estado de Pandemia devido ao surto do COVID-19, uma doença causada pelo SARS-CoV-2, um vírus de RNA envelopado oriundo do morcego. Em dezembro de 2019 iniciou-se os casos de infecção por esse vírus em humanos na China e, em janeiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde declarou estado de emergência internacional. Dentro desse contexto existe uma grande busca por novos fármacos para o combate à doença, surgindo, também, a necessidade de modelos in vitro para os testes pré-clínicos desses fármacos. Considerando essa necessidade, foi proposto o desenvolvimento de um alvéolo pulmonar 3D para estudos in vitro de toxicidade de candidatos a medicamentos para o COVID-19. Com essa finalidade, células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (CTM-GW) foram isoladas pelo método de explant, caracterizadas por citometria de fluxo e por diferenciação trilineage, e diferenciadas em células pulmonares. Para a diferenciação pulmonar, as CTM-GW foram cultivadas em uma membrana de biopolímero natural até a formação de esferóides. Em seguida, esses esferóides foram cultivados em meio suplementado com indutores por 70 dias, para a obtenção de pneumócitos I e II, células ciliadas e células produtoras de mucosa. A confirmação da diferenciação pulmonar foi realizada por imunocitoquímica e por RT-PCR. Para a impressão 3D foi produzido uma biotinta de gelatina e alginato de sódio, as células foram adicionadas à biotinta e a estrutura foi impressa com o auxílio de uma impressora 3D de extrusão. Como resultado, obteve-se que as células isoladas apresentaram perfil de CTM, possuindo expressão de CD73, CD90 e CD105 e a baixa expressão de CD34 e CD45, além de serem viáveis para terapia celular, por apresentarem expressão de HLA-ABC e baixa expressão de HLA-DR. As células também foram diferenciadas em adipócitos, osteócitos e condrócitos, o que foi possível visualizar com as colorações Oil Red, Alizarin Red e Alcian Blue, respectivamente, demonstrando a pluripotência celular. A diferenciação pulmonar também foi bem sucedida, sendo comprovada pela expressão de CD74, CK18, SFTPC e AQP5 que identificam pneumócito I e II, FOXJ1 que é expresso em células ciliadas e SCGB1A1 e MUC5AC que marcam células secretoras, por imunocitoquímica. A expressão desses genes também foi comprovada por RT-PCR, na qual os genes TTF1/NKX.2, CK18, GRAMD2A, AQP5 e SCGB1B1 foram utilizados para caracterização pulmonar e o gene B-ACT como controle. A biotinta foi utilizada para a bioimpressão 3D com CTM-GW para teste de viabilidade celular e foi possível observar que as células permaneceram viáveis após uma semana de cultivo com troca de meio a cada 3 dias. Os resultados mostraram que a diferenciação das CTM-GW em células pulmonares foi bem sucedida, e ela é vantajosa pois não existe uma linhagem de pneumócitos II estabelecida, e atualmente são utilizadas linhagens de tumorais ou células-tronco pluripotentes induzidas/células-tronco embrionárias diferenciadas que possuem potencial teratogênico. Além disso, a cultura celular 3D dessas células é uma alternativa promissora para testes de drogas in vitro, possibilitando reproduzir a complexidade dos tecidos utilizando células humanas.

Palavra-chave: Bioimpressão 3D; Engenharia de Tecidos; Pulmão.



Correlação molecular e fenotípica dos genes localizados no locus deletado na síndrome de deleção 9P

Natália Elena Trentiny Barbosa^{1*}, Isadora May Vaz^{2,3}, Paulo Henrique Utumi², Mayara Madureira de Oliveira², Melissa Midori Aoki Fugimoto⁴, Vivian Naomi Sakai Habe⁴, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto³, Paulo Roberto Slud Brofman³, Roberto Hirochi Herai^{2,4,5}

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina e Ciências da Vida, Curso de Medicina, Curitiba, Paraná, Brasil; ²Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina e Ciências da Vida, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Curitiba, Paraná, Brasil; ³Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina e Ciências da Vida - Centro de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil; ⁴Instituto 9p Brasil, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil; ⁵Instituto Buko Kaesemodel, Divisão de Pesquisa, Curitiba, Paraná, Brasil;

*Correspondente: natalia.trentiny@hotmail.com; Tel.: +55 (43) 99925-2901

Resumo: A Síndrome da Deleção 9p (SD9p) é uma condição de neurodesenvolvimento, onde incluem-se atrasos de desenvolvimento, de interação social e cognitivos. Seu diagnóstico é confirmado por teste citogenético para detectar deleção do braço curto do cromossomo 9 (9p). Embora existam estudos envolvendo famílias com esta síndrome, faltam dados que correlacionem sua sintomatologia com as alterações citogenéticas observadas no cromossomo 9. Este estudo aplicou um protocolo de Revisão Sistemática da Literatura (RSL) para coletar dados genéticos, citogenéticos, epidemiológicos e clínicos de casos reportados com a SD9p. Dentre as alterações citogenéticas envolvendo o 9p, a mais descrita foi a de cromossomos derivativos que correspondeu à 24,7% do total, seguida por deleção da região p22, 17,1%, e inversão do cromossomo 9 totalizando 12,3%. Dentre as deleções, as mais frequentes foram das regiões 9p22 (17,1%) e 9p24 (5,5%). Entre estes indivíduos com 9p, foram identificados diversos sintomas relacionados com o desenvolvimento, sendo os mais frequentes o atraso do desenvolvimento psicomotor (72,1%), seguida de desenvolvimento físico (62,8%) e atraso no desenvolvimento mental (34,9%) (CID R62 e CID F82). Além disso, também observamos que os indivíduos com deleção do 9p22 apresentaram três fenótipos com alta frequência de ocorrência, onde incluem-se orelha com implantação baixa, trigonocefalia e pescoço curto. Apesar da variabilidade citogenética e fenotípica observada em indivíduos com a SD9p, muito progresso foi feito na associação de fenótipos comuns a ela. A presente pesquisa corrobora com o genótipo mais encontrado na SD9p, deleção do braço curto do cromossomo 9 região p22, referenciada como del(9)(p22), e também com dados quanto aos fenótipos da síndrome. A continuidade desta pesquisa possui potencial de identificar novas moléculas relacionadas com os fenótipos observados na SD9p, incluindo aquelas envolvidas com alterações do neurodesenvolvimento e neuroregulação cerebral.

Palavra-chave: Síndrome da Deleção 9p, transtorno mental, neurodesenvolvimento, atraso mental, epidemiologia, revisão sistemática da literatura.



Diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano em precursoras neuronais por mecanotransdução

Nathalia Barth de Oliveira^{1*}, Ana Carolina Irioda¹, Priscila Elias Ferreira Stricker¹, Bassam Felipe Mogharbel¹, Nádia Nascimento da Rosa¹, Dilcele Silva Moreira Dziedzic¹, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho¹

¹Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Departamento de Terapia Avançada e Biotecnologia Celular em Medicina Regenerativa, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: nathybarth03@gmail.com; Tel.: +55-41-988645882

Resumo: As células-tronco mesenquimais (CTM) são uma população de células-tronco adultas que possuem alta plasticidade e secretam citocinas e fatores de crescimento que proporcionam modulação da resposta inflamatória e reparo tecidual, contribuindo para a homeostase do organismo. As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMTAs) apresentam um excelente rendimento no isolamento, taxa de crescimento linear e ampla capacidade de diferenciação, podendo se diferenciar até mesmo em linhagens neuronais por meio de fatores epigenéticos que são regulados pela interação entre a matriz extracelular (MEC) e as células. Por esse motivo, vários biomateriais vêm sendo utilizados como MEC artificial e, *in vitro*, essas matrizes desempenham um papel na regulação da diferenciação de células-tronco sendo, portanto, uma abordagem promissora para terapias regenerativas. Já foi demonstrado que células cultivadas em matrizes artificiais com elasticidade comparável ao cérebro humano podem se diferenciar em linhagens neuronais, sem a adição de fatores de crescimento neurogênicos. Este mecanismo de diferenciação está relacionado à *yes-associated protein* (YAP) e angiomotina (AMOT) que podem mediar as respostas à rigidez do substrato em CTMs durante a diferenciação em linhagens neuronais. Diante disso, se tornam necessários estudos que visem compreender os mecanismos por trás da diferenciação das CTMs mediada pelo substrato e a caracterização das células diferenciadas para garantir uma utilização segura e eficaz na medicina regenerativa. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar precursoras neuronais derivadas de CTMTAs cultivadas em uma matriz de biopolímero natural. Para isso, as CTMs foram isoladas do tecido adiposo por dissociação enzimática, submetidas à diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condroblastos, e caracterizadas por citometria de fluxo com marcadores de superfície celular característicos de CTMs. Para a diferenciação neuronal, as células foram semeadas em placas de poliestireno revestidas com a membrana NFBX (*natural functional biopolymer matrix*) e, após a diferenciação, foram caracterizadas por imunocitoquímica e RT-PCR. Os resultados demonstraram que as células isoladas cumpriram os critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para a caracterização de CTMs. Em 15-25 dias, as células semeadas na membrana NFBX foram capazes de formar neuroesferas (aglomerados de precursoras neuronais). Após a migração das precursoras neuronais foi realizada a sua caracterização e foi possível observar que as células apresentaram expressão positiva de proteínas e genes neuronais. Além disso, as células cultivadas na membrana NFBX apresentaram uma marcação citoplasmática das proteínas YAP e AMOT que estimulam a neurogênese através da atividade da β -catenina. Já as células em placas de poliestireno apresentaram uma marcação nuclear dessas proteínas, que quando estão localizadas no núcleo são responsáveis por regular a expressão gênica para manter a autorrenovação das células e suprimir a neurogênese pela inibição da β -catenina. Este estudo demonstrou então que as CTMTAs foram capazes de se diferenciar em células com características fenotípicas e genotípicas neuronais por meio do cultivo na membrana NFBX, sem a adição de fatores de crescimento neurogênicos ou transfecção gênica. Essa diferenciação neuronal está relacionada a fatores epigenéticos ou, mais especificamente, à capacidade de mecanotransdução das células regulada pelas proteínas YAP e AMOT.

Palavra-chave: células-tronco mesenquimais do tecido adiposo; neuroesferas; precursoras neuronais; mecanotransdução.



Avaliação do potencial condrogênico de diferentes fontes de células estromais mesenquimais para tratamento de lesões articulares

Nathália Forti Francisco^{1*}, Alexandra Cristina Senegaglia¹, Paulo Roberto Slud Brofman¹, Letícia Fracaro¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: nathalia.francisco@pucpr.edu.br; Tel.: +55 41 9 9958 1681.

Resumo: As células estromais mesenquimais (CTM) são células adultas multipotentes que mantêm sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em várias linhagens celulares. São essenciais para a manutenção de tecidos e órgãos e podem ser encontradas em diversas fontes, como tecido do cordão umbilical (CTM-TCU), tecido adiposo (CTDA), polpa dentária (DPSC) e medula óssea (CTM-MO). A capacidade de diferenciação condrogênica *in vitro* dessas fontes de CTM tem sido estudada devido ao seu potencial clínico, assim, identificar qual fonte de CTM é mais adequada para cada tipo de terapia é essencial. A fim de utilizar as CTM no tratamento de lesões articulares como um produto de terapia avançada (PTA), este estudo comparou o potencial condrogênico por deposição de colágeno de quatro fontes de CTM (CTM-TCU, CTDA, DPSC e CTM-MO). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (5.080.289). CTM de quatro fontes foram isoladas e cultivadas em micromassa, tratadas com TGF- β 3 em meio de diferenciação condrogênica (Differentiation Basal Medium-Chondrogenic, Lonza). Após 21 dias, as amostras foram fixadas em formol a 10% e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram corados com Azul de Toluidina (TB) para identificação de proteoglicanos e lacunas; Tricrômico de Masson (MAS) e Tricrômico de Malory (MAL) para identificar a deposição de colágeno total e Picrosirius Hematoxilina (PS) para identificar a deposição e os tipos de colágeno (I e III). As colorações PS e MAS foram quantificadas com ImageProPlus 5.1 e analisadas no GraphPad Prism 9.0. Na coloração de TB, qualitativamente, foi possível observar as lacunas ao redor dos condrócitos jovens, mas a deposição de proteoglicanos não foi observada nas fontes. Na coloração de MAL foi possível observar a deposição colágena, mas a quantificação não pode ser realizada devido a semelhança de tons entre células e fibras colágenas. Após a quantificação da coloração de MAS, quando todos os grupos foram comparados, houve diferença na deposição de colágeno ($p < 0,0001$) entre DPSC x CTDA, CTM-TCU x CTDA, CTM-MO x DPSC, CTM-MO x CTM-TCU e CTM-MO x CTDA. Não houve diferença significativa entre o DPSC x CTM-TCU ($p < 0,289$). Para coloração PSR, ao comparar todos os grupos, houve diferença ($p < 0,0001$) na deposição de colágeno tipo I entre CTDA x CTM-TCU, DPSC x CTM-TCU, CTM-TCU x CTM-MO, CTDA x CTM-MO e DPSC x CTM-MO. Não foi observada diferença significativa entre os grupos DPSC x CTDA ($p < 0,1020$). Sobre o colágeno tipo III, foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o DPSC x CTM-TCU, CTDA x CTM-TCU, CTM-TCU x CTM-MO, CTDA x CTM-MO, DPSC x CTM-MO. Não foi observada diferença significativa entre os grupos DPSC x CTDA ($p < 0,0515$). Neste estudo, protocolos de coloração complementares além do TB foram usados para avaliar a diferenciação condrogênica e comparar as quatro fontes. Quando avaliada a deposição de colágeno, a CTM-TCU e a CTM-MO apresentaram os melhores resultados após a indução da diferenciação condrogênica. Pudemos observar também que a coloração de TB utilizada como padrão para caracterização das CTM não foi a mais informativa quando comparada com as demais (MAS, MAL, PR).

Palavra-chave: Azul de Toluidina, Tricrômico de Masson, Tricrômico de Mallory, Picrosirius Hematoxilina



Células-tronco mesenquimais humanas semeadas na Membrana natural produzindo Neuroesferas e diferenciadas para Neurônios Colinérgicos

Priscila Elias Ferreira Stricker¹, Daiany de Souza Dobuchak¹, Ana Carolina Irioda¹, Bassam Felipe Mogharbel¹, Celia Regina Cavichiolo Franco², José Roberto de Souza Almeida Leite³, Alyne Rodrigues de Araújo⁴, Rondinelli Donizetti Herculano⁵, Carlos Frederico de Oliveira Graeff⁶, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho¹

¹ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Departamento de Terapia Avançada e Biotecnologia Celular em Medicina Regenerativa Curitiba-PR, Brasil; ² Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular Curitiba-PR, Brasil; ³ Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Centro de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicadas Brasília-DF Brasil; ⁴ Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia Parnaíba-PI, Brasil; ⁵ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, Brasil; ⁶ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Física, Bauru-SP, Brasil.

*Correspondente: priscilafstricker@gmail.com; Tel.: +55-41-988064918

Resumo: A Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a Doença de Alzheimer (DA) entre os maiores problemas de saúde da atualidade, o que torna imprescindível o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamentos para que a doença seja combatida. Na DA existe um comprometimento do sistema colinérgico, causando perda de neurônios, comprometimento das habilidades intelectuais como, por exemplo, perda da memória recente, alterações de humor, perda da comunicação coerente, entre outros. Neste contexto, as células-tronco mesenquimais humanas (CTM) e suas aplicações em terapias celulares tornam-se grande alvo da pesquisa, podendo contribuir para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Com o potencial de diferenciação das CTM torna-se possível a prospecção de tecidos necessários para a reparação funcional do tecido lesionado, como por exemplo, a partir de células neuronais colinérgicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de diferenciação de CTMs do cordão umbilical humano em células precursoras neurais positivas para nestina (NPCN+) através do *NFBX* em células colinérgicas "like". O isolamento das CTMs da geleia de Wharton (WJ) foi pela metodologia de *explant* e células mononucleares por gradiente de densidade. As CTM foram plaqueadas em matriz natural de Biopolímero funcional (*NFBX*) para produção de neuroesferas. As células precursoras neurais foram submetidas ao protocolo padrão de diferenciação colinérgica. As neuroesferas dissociadas, células precursoras neurais e células colinérgicas foram caracterizadas por imunocitoquímica. O RT-PCR foi feito para as neuroesferas oriundas das CTM da geleia de Wharton. As CTMs apresentaram-se positivas para CD73+, CD90+, CD105+, e negativas para CD34- e CD45-. As CTM também foram submetidas a diferenciação *trilineage* e foram diferenciadas em adipócitos, condrócitos e osteócitos. As neuroesferas produzidas através da *NFBX* e suas células isoladas foram positivas para nestina, e expressaram os genes NESTIN, MAP2, β III-TUBULIN, GFAP. Células precursoras neurais diferenciadas em células colinérgicas expressaram a proteína β III-TUBULIN e a enzima colina acetiltransferase. As CTMs na matriz natural foram capazes de diferenciar em neuroesferas, obtendo células precursoras neurais sem fatores de crescimento ou transfecção gênica antes da diferenciação colinérgica.

Palavra-chave: Células-Tronco Mesenquimais; Geleia de Wharton; Biopolímero; colinérgico

DOI: <https://doi.org/10.3390/membranes11080598>.



Caracterização do comportamento de Células-Tronco Mesenquimais cultivadas em MatriXpec™ para o emprego na engenharia de tecidos de cartilagem.

Raphaella Josino^{1*}; Marco Augusto Stimamiglio¹

¹Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR, Departamento de Ciências Básicas de Células-Tronco, Curitiba, Paraná, Brasil.

*Correspondente: raphaellajosino3006@gmail.com; Tel.: (47) 9 9675-1037.

Resumo: A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, capaz de tolerar uma grande quantidade de estresse físico intenso e repetitivo, no entanto, sua capacidade de cura espontânea é restrita. Tanto as características funcionais notáveis quanto as limitações de cura refletem a complexidade de sua estrutura e biologia, como a baixa atividade mitótica dos condrócitos e ausência de vascularização. Uma vez lesionado, as injúrias no tecido cartilaginoso tendem a se acumular e podem levar a quadros graves de doenças articulares como a osteoartrite, considerada a doença articular mais comum no mundo, afetando cerca de 600 milhões de pessoas. Diante desse cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias para promover o reparo de tecidos cartilagosos lesionados. O uso de biomateriais e a construção de arcabouços tridimensionais (3D) vem ao encontro dessa demanda clínica, possibilitando que células-tronco mesenquimais (CTM) sejam incorporadas aos processos de biofabricação de tecidos para o uso na medicina regenerativa. O objetivo do presente trabalho é caracterizar a dinâmica de comportamento das CTM cultivadas tridimensionalmente sobre o hidrogel MatriXpec™, um biomaterial comercial obtido a partir de tecido cartilaginoso descelularizado. O hidrogel MatriXpec™ foi avaliado quanto à sua ultraestrutura pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e capacidade de permitir a adesão e cultivo de CTM humanas derivadas do tecido adiposo. Estas avaliações foram feitas por marcações imunofluorescentes e ensaios de viabilidade celular por meio da quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultivo, respectivamente. Após polimerização, o hidrogel apresentou estrutura tridimensional fibrosa, justificada por sua composição colágena, a qual representa ambiente mecânica e biologicamente similar ao encontrado pelas células no tecido cartilaginoso nativo. Foi possível verificar que as CTM aderem ao hidrogel e ocupam todos os planos do mesmo. Por fim, verificou-se que o hidrogel não possui efeito citotóxico e permite a manutenção dos cultivos celulares. O hidrogel MatriXpec™ demonstra ser um candidato promissor para o cultivo de células-tronco para aplicações no reparo de lesões cartilagosas devido às suas possíveis propriedades condro-instrutoras. Como perspectiva, têm-se a avaliação da diferenciação cartilaginosa a partir de CTM cultivadas em MatriXpec™.

Palavra-chave: Arcabouço 3D; Condrogênese; Hidrogel; Medicina Regenerativa; Terapia Celular.



Benefício da terapia celular mediada por arcabouço de celulose no infarto do miocárdio: um estudo pré-clínico

Rossana B. Simeoni^{1*}, Bassam F. Mogharbel², Julio C. Francisco¹, Nelson I. Miyague¹, Ana C. Irioda², Célia R. Cavichiolo Franco⁴, Maria-Rita Sierakowski³, Eltyeb Abdelwaid⁵, Luiz C. Guarita-Souza¹ and Katherine AT Carvalho²

¹ Laboratório Experimental do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, 80215-901 Curitiba, Paraná, Brasil; ² Grupo de Pesquisa Terapia Celular e Biotecnologia em Medicina Regenerativa, Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe e Faculdades Pequeno Príncipe, Av., Silva Jardim, 1632, 80240-020 Curitiba, Paraná, Brasil; ³ Biopol, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Avenida Cel. Francisco Heráclito dos Santos, 200, 81530-900 Curitiba, Paraná, Brasil; ⁴ Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Avenida Cel. Francisco Heráclito dos Santos, 100, 81530-900 Curitiba, Paraná, Brasil; ⁵ Feinberg School of Medicine, Feinberg Cardiovascular Research Institute, Northwestern University, 303 E. Chicago Ave., Tarry 14-725, Chicago, IL 60611, EUA

*Correspondente: rossanabaggio@gmail.com; Tel.: +55 41 988213440

Resumo: Os arcabouços biológicos tornaram-se uma abordagem atraente para reparar o miocárdio infartado e demonstraram facilitar a remodelação construtiva em tecidos lesados. Objetivo: Este estudo teve como objetivo investigar a possível utilização de membrana de celulose bacteriana (BC) contendo células co-cultivadas para limitar a patologia pós-infarto do miocárdio. Método: O infarto do miocárdio (IM) foi induzido pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda em 45 ratos Wistar. As células tronco mononucleares retirada da crista íliaca e o musculo esquelético foram co-cultivadas. A membrana de BC com ou sem células foram aderidos aos corações. Após uma semana, os animais foram submetidos a ecocardiograma para avaliação da fração de ejeção e dos volumes diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo. E análises imunohistológicas foram realizadas. Resultados: Após a formação da membrana de BC com as células co-cultivadas apresentaram viabilidade de > 90% ao longo de 14 dias em cultura. A membrana foi aplicada na superfície miocárdica da área infartada após permanecer 14 dias em cultura. A membrana BC sem tratamento celular apresentou maior preservação das dimensões cardíacas; no entanto, não observamos melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo desse grupo em comparação com as membranas tratadas com co-cultura. Conclusão: Nossos resultados demonstraram um papel importante da membrana de BC no suporte de células, conhecidas por produzir fatores cardioprotetores e podem, assim, fornecer resultados terapêuticos futuros eficazes para pacientes que sofrem de doença cardíaca isquêmica.

Palavras-chave: implante; membrana de celulose bacteriana; infarto do miocárdio; terapia celular

DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10020424>



Nanopartículas anti-inflamatórias associadas a células-tronco mononucleares da medula óssea para reparo cardíaco após infarto

Rossana Baggio Simeoni^{1*}, Paulo André Bispo Machado Júnior¹, Luize Kremer Gamba¹, Murilo Sgarbossa Tonial¹, Paulo Ricardo Baggio Simeoni¹, Victoria Stadler Tasca Ribeiro¹, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho², Marcelo Henrique Napimoga³, Júlio César Francisco¹, Luiz Cesar Guarita-Souza¹

¹ Laboratório Experimental do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1555, Curitiba 80215-901, Brasil; ² Departamento de Terapia Celular e Biotecnologia em Medicina Regenerativa, Instituto Pelé Pequeno Príncipe, Faculdade de Pesquisa em Saúde da Criança e do Adolescente e Faculdades Pequeno Príncipe, Avenida Silva Jardim 1632, Curitiba 80240-020, Brasil; ³ Instituto e Centro de Pesquisa São Leopoldo Mandic, São Leopoldo Mandic, Faculdade–SLMANDIC, Campinas, São Paulo 13045-775, Brasil

*Correspondente: rossanabaggio@gmail.com; Tel.: +55 41 988213440

Resumo: Introdução: O infarto do miocárdio (IM) é caracterizado por diversas etiologias, causando morbidade e mortalidade em todo o mundo. Vários estudos sugerem que as células mononucleares derivadas da medula óssea têm sido capazes de se diferenciar em diversos tecidos em modelos experimentais de IM, e o tratamento está associado ao reparo miocárdico e melhora funcional. As nanopartículas de prostaglandina 15d-PGJ2 têm sido amplamente utilizadas em diversos estudos, por serem estáveis tanto in vivo quanto in vitro e de fácil confecção. Objetivo: Investigar o efeito do transplante de células-tronco mononucleares da medula óssea associadas a nanopartículas carregadas de 15d-PGJ2 em um modelo de MI crônico em ratos. Método: O infarto crônico do miocárdio (IM) foi induzido pela ligadura da artéria descendente anterior em 40 ratos machos Wistar. Após a cirurgia, transplantamos medula óssea associada à nanopartícula carregada de 15d-PGJ2 por injeção intramiocárdica (106 células/por injeção) sete dias pós-MI. O infarto do miocárdio foi confirmado por ecocardiografia e foram obtidas análises histológicas da morfologia do infarto, junções comunicantes e angiogênese. Resultados: Nossos resultados de análises imuno-histoquímicas demonstraram a presença de angiogênese identificada na região transplantada e que houve expressão significativa de junções comunicantes da conexina-43, mostrando uma integração elétrica e mecânica mais efetiva do miocárdio do hospedeiro. Conclusão: Este estudo sugere que a aplicação da tecnologia de nanopartículas na prevenção e tratamento do IM é um campo emergente e pode ser uma estratégia para o reparo cardíaco.

Palavra-chave: células mononucleares da medula óssea ; Infarto do Miocárdio ; 15d-PGJ2 ; anti-inflamatório
DOI: <https://doi.org/10.3390/jfb13020059>