

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR TEMPORÁRIA PARA
GÊNESE DE MUCOSA UROTELIAL**

Joelson Tomedi

Orientadora: Profª Drª. Nádyá Pesce da Silveira

Porto Alegre, Outubro de 2011.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR TEMPORÁRIA PARA
GÊNESE DE MUCOSA UROTELIAL**

Joelson Tomedi

Dissertação realizada sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Nádyá Pesce da Silveira, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre

2011

AGRADECIMENTOS:

À Prof^a. Nádyá Pesce da Silveira, por ter acreditado neste projeto. Obrigado por seus ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, seus professores e funcionários.

Aos colegas do Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular, em especial à Gisele Louro Peres, Yasmine Miguel Serafini Micheletto e Andresa da Costa Ribeiro.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-Tronco, especialmente à Prof^a. Patricia Helena Lucas Pranke e Annelise Ribeiro da Rosa, pelo auxílio inestimável em várias etapas do trabalho. À Cristiane Scher, pela ajuda na imunofenotipagem das células-tronco.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por disponibilizar a sua estrutura e subsidiar parte do projeto. Ao Serviço de Urologia, principalmente aos professores Milton Berger e Brasil Silva Neto por viabilizarem a coleta de células. Ao Laboratório de Patologia Experimental e à Prof^a Maria Isabel Edelweiss, pelo auxílio na análise histológica.

À Prof^a. Ilma Simoni Brum e a todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral e do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular por tornarem possível a cultura do urotélio e a análise por Western blotting. Em especial à Patricia Borba Martiny e Vanderlei Biolchi pelo grande auxílio prestado nesta etapa.

Ao Prof. Daniel Eduardo Weibel e a Felipe Kessler, pela ajuda na caracterização do ângulo de contato. Ao Prof. Flávio Horowitz e a Cesar Henrique Wanke, por permitirem a realização do teste de perfilometria. À Prof^a. Silvia Stanisçuaski Guterres e à Karina Paese por disponibilizarem a estrutura necessária para o experimento do potencial zeta.

Aos amigos Johnny de Nardi Martins, Otávio Bianchi e André Luis dos Santos da Silva, pela ajuda nas disciplinas da pós-graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	6	
ABSTRACT	7	
LISTA DE FIGURAS	8	
ABREVIATURAS	9	
INTRODUÇÃO	11	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13	
Interações entre Células e Matrizes		13
Mecanismos de Transporte		18
Seleção dos Materiais		22
Seleção das Células		27
OBJETIVOS	30	
Objetivo Geral		30
Objetivos Específicos		30
PARTE EXPERIMENTAL	31	
Produção da Matriz Extracelular		31
Microscopia Eletrônica de Varredura		33
Propriedades Relacionadas com a Interação Matriz-Células		33
Propriedades Relacionadas com os Mecanismos de Transporte		35
Isolamento e Cultura Celulares		37
Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais		39
Semeadura das Células nas Matrizes		40
Análise de Proteínas		40
Análise Estatística		42
Considerações Éticas		42
Locais de Realização do Projeto		43
Fontes de Financiamento		43

RESULTADOS	44	
Microscopia Eletrônica de Varredura		44
Propriedades Relacionadas com a Interação Matriz-Células		46
Propriedades Relacionadas com os Mecanismos de Transporte		50
Cultura Celular		54
Cultura das Células nas Matrizes		56
DISCUSSÃO	58	
Propriedades Relacionadas com a Interação Matriz-Células		61
Propriedades Relacionadas com os Mecanismos de Transporte		63
Cultura Celular		66
CONCLUSÕES	69	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70	
ANEXO 1	78	
ANEXO 2	79	
ANEXO 3	80	
ANEXO 4	81	
ANEXO 5	82	
ANEXO 6	83	
ANEXO 7	84	
ANEXO 8	85	
ANEXO 9	87	

1. RESUMO

Propósito: Os avanços obtidos pela engenharia de tecidos propiciaram o desenvolvimento de substitutos biológicos para tecidos urinários permanentemente danificados. O objetivo deste estudo é gerar um modelo para investigar as etapas fundamentais da formação de uma mucosa urotelial in vitro.

Materiais e Métodos: Quatro tipos de matrizes foram produzidos com uma mistura de gelatina e diferentes combinações de ácido hialurônico e gelatina. Elas foram caracterizadas com o objetivo de verificar o efeito da modificação na composição sobre propriedades físico-químicas relacionadas com a interação celular. As células utilizadas no estudo foram extraídas de segmentos do sistema urinário descartados após cirurgias. Após o período de cultura, tanto as células uroteliais quanto células-tronco derivadas de tecido adiposo foram semeadas nas matrizes manufaturadas. Cotes histológicos avaliaram a integração das células às matrizes. O multipotencial de diferenciação das células-tronco e a expressão de citoqueratina 7 pelo urotélio também foram investigados.

Resultados: A maior interação da heparina com as moléculas da gelatina provocou uma redução na densidade de cargas eletrostáticas das matrizes. Este efeito também se refletiu na hidrofiliabilidade da superfície e na capacidade de absorção das matrizes em que a heparina estava presente. As células-tronco e o urotélio expandidos em culturas primárias demonstraram capacidade de proliferar em todas as matrizes. As células-tronco confirmaram seu multipotencial de diferenciação in vitro. As células uroteliais mantiveram a expressão de citoqueratina 7 ao serem cultivadas nas matrizes.

Conclusão: Todas as matrizes produzidas suportaram a adesão e proliferação celulares.

2. ABSTRACT

Purpose: Advances in culture techniques and production of temporary matrices have allowed the development of biological substitutes to injured urinary tissues. The aim of this work is to generate a model to study the fundamental steps required to produce a urothelial mucosa in vitro.

Materials and Methods: Four types of matrices were manufactured based on a mixture of gelatin and different combinations of heparin and hyaluronic acid. They were characterized in order to evaluate the effect of composition on physicochemical properties related to cellular integration. Adipocyte-derived stem cells and urothelium were isolated from urinary tissues and expanded in culture. Mesenchymal stem cells were investigated so as to verify their multilineage potential. Each cellular type was seeded in matrices and after two weeks of culture the specimens were histologically analyzed. Additionally, urothelial cells expression of cytokeratin 7 was tested.

Results: The addition of heparin to scaffolds decreased their electrostatic charges density, surface hydrophilicity and absorption capacity. Both cellular types were expanded in primary cultures and grew in all matrix types. Adipocyte-derived stem cells confirmed their multilineage potential. Urothelial cells maintained the cytokeratin 7 expression when cultured in matrices.

Conclusion: Despite differences in composition and physicochemical properties, all matrices were able to support cellular attachment and proliferation.

3. LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação de uma sequência da molécula de heparina.	24
Figura 2.	Representação de uma sequência da molécula de ácido hialurônico.	26
Figura 3.	Fotomicrografias da superfície das matrizes. Coluna à esquerda demonstra a análise por EDS.	44
Figura 4.	Comparações entre matrizes para o potencial zeta. O Gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.	46
Figura 5.	Teste do ângulo de contato das matrizes A0 e H0.	47
Figura 6.	Comparações entre matrizes para o ângulo de contato. O Gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.	47
Figura 7.	Representação do perfil de rugosidade das matrizes H0 e HA.	48
Figura 8.	Comparações entre matrizes para a rugosidade. O Gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.	49
Figura 9.	Cinética de absorção de PBS das matrizes A0 e H0.	50
Figura 10.	Cinética de absorção de heptano das matrizes A0 e H0.	51
Figura 11.	Comparações entre matrizes para a absorção de PBS. O gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.	52
Figura 12.	Fotomicrografia da cultura de células uroteliais (magnificação 200x).	53
Figura 13.	Fotomicrografia da cultura de ADSCs (magnificação 40x).	54
Figura 14.	Fotomicrografias do ensaio de diferenciação das ADSCs (magnificação 100x). (A) Controle. (B) Gotículas de lipídios (laranja) indicando a diferenciação adipogênica. (C) Matriz calcificada (vermelho) confirmando a diferenciação osteogênica.	56
Figura 15.	Registro fotográfico da matriz H0 após a cultura com ADSCs.	57
Figura 16.	Interações entre células e matrizes. (A) Corte histológico demonstrando células uroteliais aderidas a uma matriz (magnificação 1000x). (B) Bandas indicando a presença de citoqueratina 7. (C) Corte histológico demonstrando a formação de camadas de células mesenquimais (400x).	57
Figura 17.	Fotomicrografia de um corte transversal de uma matriz H0 (microscopia óptica, coloração hematoxilina-eosina, barra: 20 µm).	60

4. ABREVIATURAS

ADSCs	<i>Adipocyte-derived stem cells</i>
ANOVA	Análise de variância
°C	Grau célsius
CD44	Receptor para ácido hialurônico
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminescência realçada
EDC	1-etil(3,3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDS	Espectrometria por energia dispersiva
g	Força da gravidade
GAG	Glicosaminoglicano
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinil]-etanosulfônico
kDa	kiloDalton
LYVE-1	<i>Lymph vessel receptor-1</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
\bar{M}_w	Média ponderal da massa molar
Na ₄ P ₂ O ₇	Pirofosfato de sódio
PBS	Solução tampão de fosfato salino
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronic acid-mediated motility</i>
SDS	Sódio dodecilsulfato
SDS-PAGE	Gel de sódio dodecil sulfato-poliacrilamida
TBS	Solução salina de Tris

TTBS	Solução salina de Tris e Tween
V	volt

4.1. ABREVIATURAS GREGAS

ϵ_0	Permissividade elétrica no vácuo
ϵ_s	Coefficiente dielétrico do solvente
ζ	Potencial zeta
κ^{-1}	Comprimento de Debye
μ_e	Mobilidade eletroforética
λ	Tamanho relativo do soluto

5. INTRODUÇÃO

A lesão de órgãos do sistema urinário é um problema médico de grande relevância. Mesmo excluindo as doenças do parênquima renal, os danos aos órgãos revestidos pela mucosa urotelial (i.e. pelve e cálices renais, ureteres, bexiga e parte da uretra) têm o potencial de gerar uma significativa morbimortalidade ao indivíduo e enormes custos ao sistema de saúde. Em todo o mundo, aproximadamente 400 milhões de pessoas sofrem de enfermidades da bexiga e patologias dos ureteres e uretra não são infrequentes¹. Apesar das terapias atuais oferecerem opções de tratamento para essas perdas teciduais, elas ainda são soluções imperfeitas².

Os órgãos que conduzem e armazenam a urina são revestidos por uma mucosa (constituída pelo urotélio, um epitélio transicional, e sua lâmina própria), a qual impede a difusão de moléculas entre o lúmen e o organismo¹. Essa estrutura é suscetível a danos irreversíveis decorrentes de malformações congênitas, isquemia, câncer, traumatismos, infecções, inflamações ou mesmo lesões iatrogênicas³⁻⁵. Procedimentos de reconstrução são mandatórios nos casos graves, sob pena das lesões originarem complicações potencialmente letais (e.g. insuficiência renal e infecções).

Reconstruções com o uso de enxertos ou derivações urinárias são as únicas terapias disponíveis para os casos em que partes do sistema urinário estão permanentemente danificadas^{3,4,6}. Ainda hoje, tecidos autólogos não-urinários (e.g. partes do sistema digestivo, fâscias e pele) são interpostos nos órgãos uroteliais quando o reparo primário não é possível. Embora a sua utilização ofereça uma solução paliativa para muitas situações, ela também está associada a uma série de complicações de difícil tratamento: infecções, distúrbios metabólicos, litíase, perfuração, fibrose, obstrução e neoplasias³⁻⁷.

Nos últimos anos, o advento da engenharia de tecidos propiciou o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos

humanos^{2,3}. Ela se fundamenta no conceito que os tecidos originais danificados podem ser restaurados por neotecidos gerados *in vitro*. Uma vez implantado, esse produto seria assimilado pelo organismo, resultando em um tecido maduro, com morfologia e função similares as do original².

As abordagens utilizadas para a regeneração tecidual são baseadas no facto que as células podem, sob determinadas circunstâncias, criar tecidos funcionais através do uso de informações pré-programadas⁸. Por razões ainda não completamente entendidas, após uma lesão significativa, a resultante dos mecanismos de reparo da maioria dos tecidos humanos adultos aponta para a formação de cicatrizes. No entanto, a regeneração de tecidos danificados é possível quando o comportamento celular se torna semelhante ao observado nos processos de embriogênese ou de restauração tecidual natural⁸.

Uma das formas de se obter esse resultado é através da substituição da área comprometida por um neotecido, gerado pela combinação de uma matriz extracelular manufaturada e células autólogas saudáveis. Já existem estudos que comprovam a eficiência desse processo no reparo de partes do sistema urinário, com vantagens sobre o tratamento cirúrgico convencional^{3,4,9}. Neouretras, criadas pela integração de matrizes manufaturadas e células autólogas, demonstraram eficácia no reparo de defeitos uretrais em animais e em humanos. Também existem evidências que matrizes sintéticas e fabricadas com colágeno são capazes de regenerar segmentos de ureter e partes da bexiga^{4,5,7,9-12}.

O processo de gênese de um tecido *in vitro* pode ser resumido em três etapas: a produção da matriz, a cultura celular e a integração entre ambas. O presente trabalho procura descrever os aspectos fundamentais de cada etapa na tentativa de produção de um tecido urotelial. Nele, são discutidas as características apresentadas pelas matrizes produzidas, aspectos da cultura de diferentes tipos celulares e as primeiras impressões obtidas da integração entre células e matrizes no modelo experimental desenvolvido.

6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

6.1. INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS E MATRIZES

Todos os tecidos humanos são uma combinação entre células e a matriz extracelular, as quais interagem entre si de forma dinâmica e bidirecional¹³⁻¹⁵. A adesão à matriz é fundamental para a sobrevivência de virtualmente todas as células, já que a ausência de contato induz mecanismos relacionados com a morte celular programada^{15,16}. Atualmente, já é conhecido que a ativação de vias intracelulares que regulam a morfologia, expressão gênica, migração, crescimento e diferenciação depende, em grande parte, da ligação das células à matriz¹⁷⁻¹⁹. Portanto, a adesão a um substrato é um fator decisivo para a gênese de processos biológicos que definirão o destino da célula¹⁶.

Nos tecidos normais, as células são ancoradas a proteínas de adesão da matriz extracelular. As interações primárias entre ambas ocorrem em determinados pontos da membrana celular, descritos como contatos focais e adesões fibrilares^{15,17}. Mesmo considerando a heterogeneidade de sua morfologia e distribuição, a maioria dos pontos de adesão compartilha duas características comuns: são mediados por integrinas e interagem com o citoesqueleto¹⁵.

Integrinas são receptores heterodiméricos da superfície celular formados por uma cadeia α e uma β , os quais reconhecem determinados sítios das proteínas da matriz^{17,18,20,21}. As mudanças conformacionais geradas pela interação receptor-ligante promovem a fosforilação de resíduos de tirosina no domínio intracitoplasmático da integrina. Este evento induz a ligação do receptor ao citoesqueleto e desencadeia uma série de vias envolvidas em diversas funções celulares¹⁶.

Como a adesão de células a um substrato é mediada pela ligação de proteínas de membrana (receptores) a proteínas da superfície, existe uma associação entre a resposta celular e as características desta interface. Estudos comprovam que a habilidade do material em adsorver ou apresentar proteínas, no seu estado ativo, define a sua capacidade em suportar adesão e proliferação celulares^{19,22,23}. Proteínas dissolvidas no meio são adsorvidas pela interface como uma forma de diminuir a desigualdade entre as energias livres das fases sólida e líquida²⁴. Existem evidências que a adsorção ocorre rapidamente (tempos da ordem de poucos segundos) e que a concentração típica de moléculas ligadas é cerca de mil vezes maior que a do meio¹⁹. Logo, o contato inicial da célula não ocorre diretamente com o material, mas em uma cobertura de proteínas adsorvidas.

A ligação da proteína à superfície pode ser compreendida como um processo de equilíbrio químico entre um ligante e seu receptor. Dependendo das condições do meio ou da constante intrínseca da ligação, o equilíbrio pode ser deslocado na direção de espécies dissociadas ou par ligado²⁵. Assim, ocorre uma competição entre diferentes proteínas pelos locais de ligação. A adsorção preferencial de um tipo específico está relacionada com a sua concentração relativa e sua afinidade pela superfície. A adsorção competitiva é um fator crucial no reconhecimento celular ao material. Estudos demonstram que o aumento na quantidade de determinadas proteínas na superfície está relacionado com uma melhora na adesão celular^{19,25,26}.

Além disso, como a função da proteína é determinada por regiões específicas, a atividade da molécula adsorvida depende da manutenção da sua orientação e conformação. A comparação da adsorção de várias proteínas em diferentes superfícies sugere que existem mudanças estruturais na maioria dos casos^{19,25,26}. Os rearranjos estruturais ocorrem porque permitem o aumento do contato com a superfície e resultam em ganho termodinâmico. Já que a adesão das células depende da disponibilidade de sítios de reconhecimento, tanto o perfil de adsorção (tipos de proteínas adsorvidas e em que

quantidades) quanto a sua bioatividade (relacionada com a sua conformação e orientação) são essenciais para que esse processo ocorra^{17,19,20,23,27,28}.

6.1.1. Hidrofilicidade e hidrofobicidade

A maioria dos autores concorda que as superfícies hidrofóbicas adsorvem uma quantidade maior de proteínas que as hidrofílicas^{23,26,29-35}. A força hidrofóbica é o principal fator responsável por essa diferença, pois ao bloquear o contato direto das moléculas de água com a superfície aumenta a energia livre do sistema²⁴. Por possuir segmentos polares e apolares na sua estrutura, a proteína age como um surfactante e a sua adsorção torna a interface termodinamicamente mais favorável. No entanto, essa aparente vantagem não se correlaciona com aumento da adesão celular. Na verdade, é bem documentado que a adesão e a proliferação celulares são superiores em materiais hidrofílicos.

Ao se comparar as conclusões de vários estudos nessa área, verifica-se que a atividade celular é maior em substratos moderadamente hidrofílicos (i.e. ângulos de contato entre 40° e 70°)^{29,30,32,33,35-37}. Além disso, experimentos já demonstraram que os resíduos de tirosina das integrinas não são fosforilados em superfícies hidrofóbicas, o que denota uma deficiência na interação receptor-ligante^{35,36}. A explicação para esses resultados é baseada nas diferenças de conformação das proteínas adsorvidas em diferentes superfícies. O ponto fundamental é a manutenção da funcionalidade protéica, já que suas alterações conformacionais se tornam mais significativas à medida que forças eletrostáticas ou hidrofóbicas começam a dominar a interface^{19,25,26}.

À medida que o substrato se torna mais hidrofílico, forças eletrostáticas interferem com a adsorção e também alteram o perfil das proteínas ligadas. A cooperação de vários mecanismos de adsorção presentes nas superfícies com moderada hidrofilicidade restringe as mudanças conformacionais e preserva a atividade biológica^{19,25}. Além disso, a habilidade

das proteínas competirem por sítios de ligação é maior em superfícies hidrofílicas e essa característica permite que moléculas inespecíficas sejam deslocadas da interface.

6.1.2. Forças Eletrostáticas

Ao serem imersos em solução aquosa, a superfície de praticamente todos os biomateriais adquire cargas eletrostáticas devido à dissociação iônica de determinados grupos funcionais³⁸. A dissociação dos grupos origina cadeias poliméricas contendo íons fixos e contraíons móveis solvatados. A magnitude da carga da superfície depende da natureza dos grupos funcionais, do pH e da força iônica^{38,39}. Essa carga causa uma perturbação no meio e influencia a distribuição de íons da solução. Íons com carga oposta aos da superfície (i.e. contraíons) serão atraídos para ela, enquanto os de mesma carga (i.e. coíons) serão repelidos. Essa distribuição espacial de íons é denominada camada elétrica dupla ou camada elétrica interfacial^{38,39}.

Além da atração eletrostática superfície-proteína, o relaxamento das repulsões entre as moléculas do material são as forças motrizes deste tipo de adsorção. Devido à influência de múltiplas variáveis, a ligação de moléculas via interações eletrostáticas é mais complexa que a hidrofóbica. A interface é blindada pela água e por íons móveis, modulada pelo pH, e tem suas propriedades dielétricas modificadas pela camada elétrica dupla⁴⁰. Tais fatores explicam a maior reversibilidade na ligação de moléculas a esse tipo de superfície. Trabalhos demonstrando que a hidrofobicidade é um maior determinante para adsorção que a carga eletrostática também corroboram esta afirmação²⁶.

O modo de adesão das células é distinto para superfícies com cargas positivas e negativas¹⁹. As membranas celulares, que possuem cargas elétricas negativas, aderem intimamente a superfícies com cargas positivas. Por outro lado, o contato ocorre somente em alguns pontos quando as células são semeadas sobre superfícies negativamente carregadas ou quase neutras. Embora vários autores atribuam essas diferenças a interações

eletrostáticas puras, também existem evidências que o perfil de proteínas adsorvidas seja diferente¹⁹.

Estudos evidenciam que a ligação de células é maior em superfícies positivamente carregadas. Entretanto, a atividade e proliferação celulares geralmente são impedidas neste tipo de substrato¹⁹. Esses dados sugerem que a atração eletrostática aumenta a ligação das células, mas não suporta suas funções subsequentes. Os processos celulares dependem da adesão via associação ligante-receptor, a qual ocorre em ambiente aniônico. Embora a magnitude do caráter aniônico não esteja definida, acredita-se que graus leves a moderados sejam os mais fisiológicos.

6.1.3. Topografia

O papel da topografia sobre a adesão celular é menos nítido que o das interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Embora alguns autores tenham estimado que um espaçamento entre ligantes menor que 140 nm é mandatório para a formação de contatos focais⁴¹, a interpretação dos estudos sobre o efeito da topografia na adesão celular inicial é marcada pela existência de fatores de confusão. Os métodos que produzem texturas regulares na superfície também alteram suas propriedades químicas ou físico-químicas, o que dificulta a identificação de um efeito claro^{19,34}.

Apesar dessa ressalva, existem indicativos que aspectos da topografia podem influenciar na adesão celular, porém o benefício é percebido apenas quando graus baixos de rugosidade são avaliados³³. Em um estudo que mediu a adsorção de fibronectina em diferentes superfícies, foi observada uma correlação positiva entre a quantidade de proteínas ligadas e a rugosidade. No entanto, ao se normalizar os resultados pela área superficial, essa tendência não foi mantida¹⁹. Assim, o efeito predominante da rugosidade sobre a adesão celular pode estar relacionado com o aumento da área disponível (ou com o maior número de pontos) para o contato³².

Por outro lado, a topografia parece ter um efeito significativo sobre a diferenciação celular. Experimentos indicam que o incremento na rugosidade ou desordem da superfície é relacionado com o aumento na diferenciação e na síntese de matriz extracelular¹⁹. Acredita-se que as características topográficas criem espaços confinados, com propriedades distintas do restante da superfície³³. É possível que nesses espaços o contato celular possa ser modificado pela exposição de um diferente perfil de proteínas. Também existem indícios que o aumento da rugosidade poderia ser associado com uma correspondente redução na proliferação, mas essa influência não é observada em todos os estudos³².

6.2. MECANISMOS DE TRANSPORTE

O movimento de moléculas e células através da matriz é um importante aspecto nos mecanismos de formação e manutenção de um tecido^{42,43}. No processo de gênese tecidual *in vitro*, a migração de células para o interior da estrutura é facilitada pela alta porosidade concedida pelo método de processamento. Contudo, à medida que o remodelamento da matriz se sucede, o arcabouço poroso é substituído por um tecido mais compacto, constituído por células, restos da matriz manufaturada e nova matriz extracelular sintetizada. Embora não haja um sistema vascular ou linfático organizados nesta estrutura, é imperativo que as células permaneçam metabolicamente ativas para coordenar os processos de transformação tecidual^{43,44}.

Uma função importante da matriz temporária é permitir o deslocamento de células em toda sua espessura. A migração celular é um processo dinâmico que envolve a interação entre proteínas do substrato, integrinas e o citoesqueleto. Observações obtidas de embriões demonstram que ela é relacionada com a apresentação de determinadas proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina⁴⁵. Estudos com células *in vitro* revelam que elas se movem

das regiões de baixa concentração protéica para as de alta, onde a migração é impedida pelo aumento da força de adesão^{45,46}. Além disso, a mobilidade também depende da capacidade da célula em se descolar da matriz e remodelá-la⁴⁵. Assim, matrizes que adsorvem fortemente proteínas e não sofrem degradação enzimática tendem a apresentar uma menor população celular no seu interior.

Além da migração celular, o processo de formação de um tecido demanda o trânsito de moléculas pelo espaço extracelular. As células requerem um transporte contínuo de nutrientes, fatores reguladores e produtos de degradação para manterem a sua atividade^{43,47}. Associado a isso, o remodelamento da matriz exige que novas macromoléculas e fatores reguladores sejam sintetizados e deslocados através da estrutura até o seu destino. Se tal transporte não for eficiente, a atividade metabólica do tecido é reduzida e surgem áreas de sofrimento celular ou necrose⁴⁷.

As matrizes temporárias são constituídas, predominantemente, por polímeros reticulados capazes de inchar em ambiente aquoso. Portanto, o transporte de solutos dentro das matrizes ocorre primariamente em regiões delimitadas por cadeias poliméricas⁴⁸. Como não existe a pressão hidrostática decorrente da vascularização, o fluxo de qualquer partícula entre a matriz e o meio de cultura é governado pela combinação de três mecanismos: difusão, convecção e efeito elétrico^{43,48-51}. Nesse sistema, o transporte de moléculas é dependente de um conjunto de variáveis relacionadas com a interação entre o soluto e a matriz^{43,48-50}. Tais variáveis incluem o tamanho, concentração e valência do soluto; mobilidade das cadeias do polímero; porosidade da matriz; velocidade do fluido e a existência de fenômenos eletrocinéticos⁴³.

As teorias de transporte para membranas desenvolvidas no último século são a base para a descrição e quantificação desses mecanismos em matrizes manufaturadas. Experimentos realizados em membranas microfabricadas e mesmo em tecidos vivos comprovam a sua aplicabilidade para modelos biológicos^{44,47-49,51-53}. Elas adotam como pressupostos que o tamanho da molécula do soluto é correlacionado com o raio de Stokes-

Einstein (ou raio hidrodinâmico), que o solvente é um meio contínuo e os espaços entre as cadeias poliméricas são poros^{50-52,54,55}. O princípio para o entendimento de tais teorias repousa no facto que as cadeias poliméricas da membrana impedem o movimento do soluto por uma combinação de componentes hidrodinâmicos ou friccionais, estéricos e eletrostáticos^{48,50}.

A difusão de um soluto é governada tanto pelo seu gradiente de concentração através do meio, quanto pela sua difusividade, a qual é relacionada ao raio de Stokes-Einstein⁵⁰. As cadeias do polímero impedem o transporte difusional tanto por agirem como um obstáculo físico ao movimento de moléculas quanto por aumentarem o seu arrasto hidrodinâmico. O primeiro fator é estérico e determina uma seleção no transporte do soluto pelo seu tamanho relativo, já que ele ocorre nos espaços entre as cadeias poliméricas. Além disso, esses obstáculos aumentam o caminho a ser percorrido pelas moléculas durante o seu deslocamento. Impedimentos adicionais, como a tortuosidade do percurso e a rigidez das cadeias, também estão associados com a redução da difusão pelo mesmo motivo^{44,48-50,52,53}.

O componente hidrodinâmico pode ser explicado como um aumento no coeficiente de fricção molecular, ou coeficiente de arrasto, provocado pela interação do soluto com as cadeias poliméricas⁵⁰⁻⁵². Uma macromolécula em solução se comporta, ao menos parcialmente, como uma partícula hidrodinâmica. A presença de objetos fixos, como paredes de poros e fibras da membrana, tende a aumentar o seu arrasto e, portanto, reduz a sua mobilidade⁵¹. A restrição ao fluxo depende da distribuição radial do soluto, ou seja, de quão próximo ele está da parede^{50,52}. Como uma molécula que difunde atingirá todas as posições radiais muitas vezes durante a passagem pelos poros da matriz, a sua difusividade média será menor que a observada no meio⁵⁰.

O transporte convectivo está diretamente relacionado com a velocidade adquirida pelas moléculas quando são impelidas por correntes de fluxo^{50,51,56}. Correntes de convecção surgem como resultado da ação de forças externas - energia térmica, gradientes de pressão

e, para moléculas eletricamente neutras, fluxos eletrosmóticos^{38,56}. As partículas do soluto apanhadas por essas correntes se movem a uma velocidade terminal que é resultante da combinação da força externa com o arrasto friccional decorrente do contato com outras partículas do meio³⁸. Assim, o transporte de moléculas por convecção no interior da matriz é reduzido pelo mesmo componente hidrodinâmico que restringe a difusão^{50,51}.

As interações eletrostáticas entre o soluto e as cadeias poliméricas, mediadas por suas respectivas camadas elétricas duplas, originam um impedimento adicional à difusão e convecção, mesmo na ausência de campos elétricos aplicados. Estudos demonstraram que o transporte de moléculas através de membranas é reduzido drasticamente quando ambas apresentam cargas eletrostáticas do mesmo sinal^{50,51,56}. Observa-se que o efeito eletrostático age como se aumentasse o raio efetivo da partícula e, da mesma forma, como se reduzisse o raio do poro, com um valor proporcional ao comprimento de Debye^{48,56}. Caso as cargas sejam contrárias, as forças eletrostáticas podem promover adsorção e levar a obstrução dos espaços entre as cadeias poliméricas⁵⁶. As interações eletrostáticas tendem a ser mais proeminentes nos poros menores, onde o comprimento de Debye se torna comparável ao raio do poro⁵⁰.

A análise de modelos experimentais permite descrever o comportamento dos diferentes mecanismos de transporte em função do tamanho relativo do soluto (λ) (razão entre o raio do soluto e o raio do poro)^{50,51}. A taxa de difusão na matriz atinge a metade do valor da difusão no solvente puro quando o tamanho relativo do soluto for 0,14 (raio do soluto for 14% do raio do poro). Assim, esse mecanismo de transporte é seriamente impedido muito antes do tamanho da molécula se tornar significativo em relação ao do poro⁵¹.

O transporte via convecção tem um diferente perfil. Ele sofre um aumento inicial de magnitude com o incremento do tamanho do soluto – o tamanho da partícula exclui o seu centro da camada de fluido próxima à parede do poro e, portanto, a protege do movimento mais lento^{50,51}. A partir do momento que o retardo hidrodinâmico decorrente do aumento da

interação com a parede do poro cresce, a convecção também sofre impedimento. Ela atinge a metade do valor da convecção no meio livre quando $\lambda=0,39$ ⁵⁰. O declínio mais rápido da difusão que da convecção com o aumento de λ indica que a primeira é mais sensível à redução do tamanho dos poros e da sua interconecção. Logo, essa particularidade limita a utilização de matrizes muito espessas em sistemas de cultura estáticos, onde o fluxo convectivo tem baixa amplitude.

6.3. SELEÇÃO DOS MATERIAIS

O grande número de moléculas presentes na matriz natural lhe confere uma formidável complexidade funcional^{13,45,57}. Ela influencia o comportamento celular diretamente, através de receptores de membrana, mas também por vias indiretas. A matriz pode sequestrar fatores de crescimento e apresentá-los em concentrações e momentos distintos^{13,45,46,57-59}. Também pode contribuir para o estabelecimento de gradientes de moléculas sinalizadoras, concentrá-las ao redor de certos tipos celulares ou atuar sinergicamente a elas junto às células^{46,58,59}. Além disso, a sua degradação possibilita a liberação de fatores de regulação ligados a seus fragmentos, que agem de maneira singular nos receptores celulares^{46,59}

Já foi demonstrado que existe uma reciprocidade dinâmica entre células e a matriz extracelular¹³. Estudos revelam que ocorre uma variação no conjunto de integrinas e nas vias de sinalização de acordo com a composição dos ligantes no substrato¹⁹. Do mesmo modo, observa-se que o reparo tecidual se caracteriza por apresentar um diferente arranjo de proteínas na matriz em cada um dos seus estágios, facto que é correlacionado com mudanças na atividade celular⁴⁵. Modelos de desenvolvimento mamário *in vitro* também evidenciam que a função da mesma integrina pode variar com a mudança na composição do

meio^{45,59}. Finalmente, pesquisas envolvendo engenharia de tecidos comprovam que diferenças na composição da matriz temporária resultam em variações no grau de diferenciação celular, neovascularização e reação inflamatória^{5,60,61}.

Atualmente, existe uma grande ênfase no desenvolvimento de matrizes que induzam determinadas respostas celulares com o objetivo de aumentar a funcionalidade do neotecido^{13,62}. O conhecimento que a matriz extracelular não é apenas um suporte mecânico para as células, mas influencia diretamente o seu comportamento pela transdução de sinais, determina que a escolha dos materiais que a constituirão pode ter um impacto significativo no produto final⁵⁹.

6.3.1. Gelatina

A gelatina é constituída por uma mistura de polipeptídeos de alta massa molar, com conformações em hélice aleatória e grande polidispersão. A sua obtenção envolve a clivagem das fibras do colágeno e destruição da sua estrutura terciária através de tratamento térmico, ácido ou alcalino⁶³. Assim, apesar de apresentarem conformações distintas, a composição de aminoácidos de ambas as moléculas é muito semelhante⁶³. A unidade de repetição predominante na gelatina consiste no tripeptídeo (-glicina-X-Y-)_n, onde X e Y podem ser qualquer resíduo, mas a posição Y frequentemente é ocupada por prolina ou hidroxiprolina⁶⁴.

O colágeno representa uma família de proteínas que são as principais constituintes da matriz extracelular dos vertebrados⁶⁴. Ao menos vinte e oito tipos são descritos e as suas funções são abrangentes. Eles conferem resistência mecânica e forma aos órgãos e tecidos, ligam-se a outras moléculas da matriz modificando suas propriedades, fornecem sítios de adesão celular e participam dos processos de diferenciação^{45,64,65}. Como a sua sequência de aminoácidos é altamente conservada entre diferentes espécies, produtos derivados do

colágeno apresentam bom reconhecimento celular e baixa imunogenicidade, mesmo quando obtidos de fontes xenogênicas⁶⁴.

6.3.2. Heparina

A heparina é um polissacarídeo linear da classe dos glicosaminoglicanos (GAGs), os quais são caracterizados por apresentarem unidades de repetição formadas por um dissacarídeo cíclico - uma hexosamina ligada a um derivado do ácido hexurônico (ou uma hexose). A configuração predominante na molécula da heparina (75% a 85% da cadeia) consiste em um resíduo de 2-sulfato α -ácido L-idopiranosilurônico (ácido L-indurônico) glicosilado (ligação β -1,4) a 2-desoxi-2-sulfamino α -D-glicopiranosose-6-sulfato (glicosamina)⁶⁶ (Figura 1). Variações nos grupos funcionais do dissacarídeo são responsáveis pelo aparecimento de sequências heterogêneas no restante da cadeia e estabelecem uma média de 2,7 grupos sulfonato por unidade de repetição⁶⁷. A sua massa molar varia entre 5×10^3 e 4×10^4 g/mol e esta polidispersão é decorrente do processo de clivagem após a biossíntese⁶⁷.

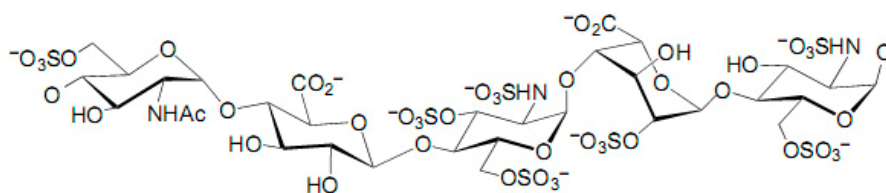


Figura 1. Representação de uma sequência da molécula de heparina.

As características peculiares de sua estrutura determinam a influência da heparina em vários processos biológicos. O alto conteúdo de grupos aniônicos sulfonato e carboxilato confere a esse GAG a maior densidade de cargas negativas entre as macromoléculas

biológicas conhecidas⁶⁷. Sabe-se que esses grupos têm a capacidade de formar pares iônicos com os aminoácidos básicos das proteínas, especialmente com os resíduos de lisina e arginina. Além disso, acredita-se que a conformação em hélice, a qual expõe os grupos aniônicos na superfície, e a flexibilidade dos resíduos de ácido L-indurônico, que pode adotar ao menos três conformações distintas, também contribuam para as interações com outras moléculas^{57,67-70}.

Estudos descrevem a existência de domínios ligantes de heparina em várias proteínas^{57,67,69-72}. Modelos moleculares demonstram que a presença de sequências de aminoácidos consensuais, como XBBXBX e XBBBXXBX (onde B é um aminoácido básico e X denota um neutro ou hidrofóbico), é necessária para a apresentação orientada dos resíduos básicos aos substituintes aniônicos da heparina^{57,67,72}. A heparina modifica a atividade biológica da proteína por induzir alterações conformacionais, promover o seu sequestro na matriz ou atuar como correceptor de fatores de crescimento^{57,70-75}. As proteínas ligadas se tornam mais resistentes à proteólise, ataque de radicais livres e desnaturação térmica.

Os efeitos da heparina têm implicações em vários processos fisiológicos e patológicos. Do ponto de vista da formação dos tecidos, a sua maior influência está associada a interações com fatores de crescimento e proteínas de adesão^{57,67,68,70,76}. Ela tem a capacidade de formar complexos ternários com ligantes e seus respectivos receptores, alterando a estabilidade, meia-vida e afinidade da ligação. É bem documentado que a heparina é um importante estimulador da angiogênese, mas também inibe a migração celular e respostas imunológicas^{57,67,72,76}. Além disso, sua ação sinérgica a fatores de crescimento tem reflexos significativos sobre a diferenciação e a morfogênese^{57,70,72,74-77}.

6.3.3. Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico é o maior dos GAGs e o único não sulfatado^{78,79}. A sua molécula possui uma massa molar da ordem de 2×10^6 g/mol e um comprimento que pode chegar a 25 μm quando estendido⁷⁸⁻⁸⁰. É constituído por monômeros de ácido D-glicurônico unidos a N-acetil-D-glicosamina por ligações glicosídicas alternadas (β -1,3 e β -1,4) (Figura 2). Quando os grupos carboxílicos do ácido glicurônico estão completamente ionizados, as cargas negativas ocorrem regularmente em todos os segundos glicosídeos, com espaçamento médio entre elas de 1 nm^{78,79}.

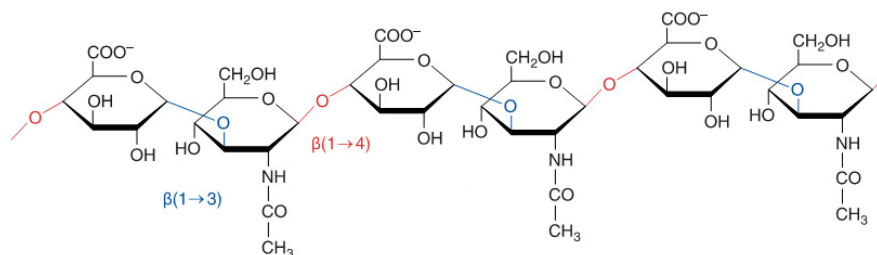


Figura 2. Representação de uma sequência da molécula de ácido hialurônico.

A macromolécula é estabilizada por ligações de hidrogênio paralelas ao eixo da cadeia, o que lhe confere uma conformação de hélice rígida e permite-lhe adotar a forma de um novelo expandido em solução aquosa^{78,79}. Estruturalmente, elas demonstram a tendência de formar redes entrelaçadas e os seus substituintes aniônicos aumentam a pressão osmótica no interstício. Portanto, a sua presença altera significativamente as propriedades viscoelásticas e o grau de hidratação dos tecidos⁷⁸⁻⁸³.

Apesar de ser um constituinte da matriz, a ligação do ácido hialurônico a outras moléculas geralmente requer a mediação de hialaderinas, proteínas que estabilizam as interações entre ambos^{79,80,83,84}. Existem várias hialaderinas descritas tanto na matriz extracelular quanto em receptores de membrana. Embora elas tenham configurações

distintas, existe uma homologia no sítio de ligação ao ácido hialurônico, caracterizado por uma sequência B(X7)B (onde B é arginina ou lisina e X significa um aminoácido não ácido)^{80,81,83,85}.

O ácido hialurônico também é considerado uma molécula de sinalização^{79,80,83}. Ele tem a capacidade de se ligar a vários receptores celulares (e.g. CD44, RHAMM, LYVE-1) que ativam genes, induzem reorganização no citoesqueleto e promovem a migração celular^{81,86}. Estudos correlacionam os efeitos do ácido hialurônico com massa molar de suas moléculas. Quando a sua estrutura está íntegra, observa-se um estímulo à proliferação de determinados tipos celulares, inibição da ação de células inflamatórias e impedimento à diferenciação. Ao ser degradado, seus fragmentos têm um efeito pró-inflamatório manifestado por estímulo a angiogênese, produção de citocinas, proliferação e migração celulares. Por essas razões, ele é particularmente abundante nos processos iniciais do reparo tecidual^{5,60,80-85,87,88}.

6.4. SELEÇÃO DAS CÉLULAS

A formação de uma mucosa urotelial exige a combinação de, ao menos, dois tipos celulares. O substituto ideal para a reconstrução de órgãos urinários deve associar a funcionalidade e propriedades mecânicas de uma camada muscular com os atributos de barreira do urotélio normal⁴. De facto, as primeiras abordagens bem-sucedidas de engenharia de tecido urinário envolveram a integração de células uroteliais e musculares lisas, previamente expandidas em culturas individuais^{4,9}.

O urotélio é um epitélio estratificado, contendo células com graus de diferenciação crescentes da camada basal para a superficial^{1,89}. A sua principal função é formar uma

barreira que impeça a transferência de moléculas entre a urina e o organismo, mesmo na presença de gradientes de concentração entre ambos^{1,90}. Sua baixa permeabilidade é um reflexo da estrutura celular altamente interconectada, sobretudo na camada superficial. Logo, a manutenção da função dos órgãos urinários depende da completa diferenciação destas células.

Os primeiros relatos de sucesso na cultura primária de urotélio foram feitos por Reznikoff e Kirk⁹⁰ em 1983. Cerca de dez anos após, os trabalhos de Southgate e Cilento estabeleceram protocolos de subculturas e demonstraram que elas podem ser expandidas sem perder o padrão cromossômico normal⁹⁰. Ao serem cultivadas *in vitro*, as células uroteliais adotam um fenótipo regenerativo, tornando-se altamente proliferativas^{1,90-94}. Como consequência, elas formam apenas monocamadas e perdem parte dos seus marcadores de diferenciação. No entanto, quando semeadas sobre um estroma ou em meios de cultura específicos, as células uroteliais expandidas têm restauradas as suas capacidades de estratificação e de barreira, o que torna possível o seu uso em implantes biológicos^{90,91,93,95}.

A produção de um tecido *in vitro* envolve a obtenção de grandes quantidades de células através de uma pequena amostra retirada do doador. Nos tecidos adultos, tal tarefa é dificultada porque as células maduras são suscetíveis a processos degenerativos e, em geral, apresentam uma baixa capacidade de multiplicação^{96,98}. Por essas limitações, existe um grande interesse em definir novas fontes celulares com potencial de substituí-las. Nos últimos anos, o avanço no conhecimento da biologia das células-tronco propiciou a utilização deste tipo celular em experimentos de regeneração tecidual^{62,98,99}.

As células-tronco são células indiferenciadas, caracterizadas por uma capacidade de autorrenovação (i.e. proliferar mantendo o estado indiferenciado) e de originar vários tipos celulares^{62,96,98}. Elas podem ser classificadas de acordo com o seu potencial de diferenciação como totipotentes (i.e. capazes de originar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários), pluripotentes (i.e. capazes de originar todos os tipos celulares do embrião), multipotentes (i.e. originam um subgrupo de linhagens celulares) e

oligo ou unipotentes (i.e. células precursoras, que são capazes de originar um grupo restrito ou apenas uma célula madura)^{96,98}.

No estroma de virtualmente todos os tecidos humanos adultos existe uma subpopulação dessas células, denominadas células-tronco mesenquimais, as quais têm um multipotencial de diferenciação confirmado em vários estudos⁹⁹⁻¹⁰². Acredita-se que as células-tronco mesenquimais tenham um papel no processo de reparo natural de tecidos danificados e um efeito modulador sobre o sistema imunológico⁹⁸⁻¹⁰¹. Esses dados despertaram o interesse em utilizá-las na formação e restauração de vários tecidos, inclusive do sistema urinário^{10,96,103,104}.

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GERAL:

Desenvolver um processo que permita a gênese de uma mucosa urotelial *in vitro*.

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Produzir e caracterizar matrizes extracelulares temporárias
- Isolar e cultivar células mesenquimais e epiteliais de segmentos do sistema urinário humano
- Avaliar a integração entre cada tipo celular e as matrizes

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. PRODUÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

8.1.1. Materiais

As matrizes temporárias foram produzidas com uma combinação de glicosaminoglicanos e gelatina ($\overline{M}_w=8,0 \times 10^6$ g/mol Labsynth, São Paulo, Brasil). Os glicosaminoglicanos utilizados foram o ácido hialurônico ($\overline{M}_w=1,6 \times 10^6$ g/mol Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) e heparina ($\overline{M}_w=1,5 \times 10^4$ g/mol Eurofarma, São Paulo, Brasil). Água ultrapura (sistema Milli-Q) e etanol (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) foram utilizados como solventes. Também foi usado o agente reticulante 1-etil(3,3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (191,7 g/mol Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA).

8.1.2. Preparação das Misturas Poliméricas

Previamente à produção das matrizes, foi estabelecido que a proporção, em massa, de gelatina para cada glicosaminoglicano seria de (9:1). As misturas de gelatina e ácido hialurônico foram dispersas em um solvente constituído por água e etanol (1:1) (v:v). Do mesmo modo, a combinação de gelatina e heparina foi dissolvida em água e etanol (3:2) (v:v). A homogeneização das dispersões foi obtida através de agitação por 40 minutos à temperatura de $36(\pm 2)^\circ\text{C}$. As concentrações usadas para a produção de matrizes por *electrospinnig* (eletrofiação) foram 7 mg/mL (gelatina e ácido hialurônico) e 10 mg/mL (gelatina e heparina). Ao mesmo tempo, ambas as misturas também foram preparadas na concentração de 3 mg/mL para posterior processamento via *electrospraying*.

8.1.3. Fabricação das Matrizes Temporárias

As matrizes foram fabricadas através das técnicas de *electrospinning* (eletrofiação) e *electrospraying* (o mesmo equipamento é utilizado para ambas). Os parâmetros adotados para o processamento das misturas por *electrospinning* estão registrados na Tabela 1. O tempo expendido no processo foi fixado em 2 horas. Os mesmos parâmetros foram utilizados no *electrospraying*, com as seguintes exceções: a diferença de potencial elétrico entre capilar e coletor foi fixada em 20 kV para as duas misturas e o tempo estabelecido para o processo foi de 3 minutos.

Tabela 1. Valores dos parâmetros usados no processamento das misturas via *electrospinning*.

	Gelatina – Ác. Hialurônico	Gelatina – Heparina
Voltagem aplicada	21 kV	17 kV
Distância capilar-coletor	15 cm	15 cm
Vazão da mistura	1 mL/h	1 mL/h
Temperatura	38 ± 2 °C	38 ± 2 °C
Umidade relativa	<10%	<10%

De acordo com a sua composição química, as matrizes foram divididas em quatro grupos. Dois grupos foram produzidos através da técnica de *electrospinning*, com a combinação de gelatina - ácido hialurônico (A0) e gelatina - heparina (H0). No terceiro grupo, matrizes produzidas com gelatina-ácido hialurônico foram submetidas a tratamento da sua superfície com gelatina-heparina (3 mg/mL), utilizando-se a técnica de *electrospraying* (AH). Procedimento semelhante foi realizado no quarto grupo, onde as matrizes de gelatina - heparina receberam spray de gelatina - ácido hialurônico sobre a sua superfície (HA).

Oito matrizes foram fabricadas em cada grupo, com dimensões de 8 cm x 2 cm. Para a realização dos experimentos, cada matriz foi dividida em cinco partes: uma circular, com 2 cm de diâmetro, usada para cultura com células; duas semicirculares, com 1,5 cm x 0,75 cm,

para testes de absorção e porosidade; e duas circulares, com diâmetro de 1,5 cm usadas nos testes de potencial zeta, ângulo de contato e perfilometria.

Todas as matrizes foram reticuladas por imersão com a utilização de solução aquosa de EDC 18 mM (pH 5,0) por 16 horas a 5°C. Posteriormente, elas foram submetidas a três lavagens com água Milli-Q por 10 minutos, com o objetivo de remover os resíduos do agente reticulante, e secas em estufa à vácuo.

8.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Uma amostra de cada grupo foi preparada para análise da sua superfície por microscopia eletrônica. Cada espécime foi submetido a recobrimento de sua superfície com nanocamada de carbono. As imagens foram obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 5800. Ao mesmo tempo, procedeu-se a análise de espectrometria por energia dispersiva (EDS) para identificação de enxofre em todas as superfícies.

8.3. PROPRIEDADES RELACIONADAS COM A INTERAÇÃO MATRIZ-CÉLULAS

8.3.1. Potencial Zeta

No presente trabalho, a aferição do potencial zeta (ζ) foi baseada na teoria de Smoluchowski, a qual o relaciona à mobilidade eletroforética das partículas estudadas. A mobilidade eletroforética (μ_e) foi determinada pela razão entre a velocidade eletroforética (velocidade que a partícula adquire em relação ao meio em repouso) e a intensidade do campo elétrico aplicado. Assim, o valor do potencial ζ é obtido pela equação de Helmholtz -

Smoluchowski (1), onde ϵ_s é a coeficiente dielétrico do solvente, ϵ_0 a permissividade elétrica no vácuo e η a viscosidade do solvente.

$$\mu_e = \frac{\epsilon_s \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (1)$$

As amostras circulares de cada grupo, com diâmetros de 1,5 cm, foram trituradas com homogeneizador Ultra-Turrax IKA T10 Basic (IKA Werke GmbH & Co, Alemanha) em 4 mL de solução aquosa de NaCl 10 mM com pH 6,2. A seguir, procedeu-se a filtração das amostras (papel filtro) para a remoção do particulado grosseiro. As medidas de potencial zeta foram obtidas no equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Inc., Reino Unido), adotando-se os seguintes parâmetros: temperatura 25°C, índice de refração da água 1,33, viscosidade da água 0,8872 mPa.s, coeficiente dielétrico da água: 78,5.

8.3.2. Ângulo de Contato

Para a realização deste teste, amostras de cada matriz foram montadas sobre lamínulas de vidro. Uma microgota de água desionizada foi instilada em três pontos diferentes da superfície de cada amostra (medida estática). Após dez segundos de contato, as imagens de cada gota foram capturadas com o auxílio do microscópio óptico Digital Blue QTX (magnificação de 60x). A verificação dos ângulos de contato foi obtida com auxílio do software Surftens® 3.0. Para cada gota, foi realizada a medida do ângulo de contato três vezes e considerada a sua média como representativa. O valor do ângulo de cada amostra foi determinado pela média aritmética simples dos valores dos ângulos das três microgotas.

8.3.3. Rugosidade

Amostras de matrizes previamente montadas sobre laminulas de vidro foram submetidas a teste de perfilometria. As medidas foram realizadas com o Perfilômetro XP-2 (Ambios Technology) com ponteira de 200 nm. O comprimento de varredura se estendeu por cinco milímetros, com uma velocidade de 0,05 mm/s e carga de 0,1 mg. A rugosidade foi calculada pelo Software Stylus Profiler[®]. Adotou-se a média quadrática como o valor da rugosidade de cada varredura. Considerou-se a média de três varreduras como representativa da rugosidade de cada amostra.

8.4. PROPRIEDADES RELACIONADAS COM OS MECANISMOS DE TRANSPORTE

8.4.1. Espessura

A espessura das matrizes foi obtida da medida das amostras destinadas à cultura celular com o auxílio do micrômetro digital Mitutoyo 293 (Mitutoyo Corporation, Japão). A amplitude de medida do equipamento era de 0 a 25 mm e a precisão de 1 μm . Considerou-se como valor representativo de cada matriz a cifra mensurada no centro da amostra.

8.4.2. Absorção de PBS

Com o objetivo de determinar o tempo necessário para atingir o equilíbrio de absorção, foram produzidas matrizes circulares de gelatina e ácido hialurônico (9:1) e gelatina e heparina (9:1) de maneira idêntica às utilizadas no estudo. Elas possuíam um diâmetro de 1,5 cm com suas massas variando entre 2,8 e 4,0 mg. Todos os espécimes foram previamente secos em estufa à vácuo. Após a aferição do peso seco, as amostras foram

imersas em 20 mL de solução tampão de fosfato (PBS 1x - pH 7,4) à temperatura constante de 37°C. Três amostras de cada tipo de matriz foram pesadas em tempos predeterminados com a balança analítica ATI Cahn C35 (precisão 0,1 µg). A pesagem foi realizada após a remoção do excesso da solução sobre a superfície de cada espécime com papel filtro. A absorção de PBS (A) em cada tempo foi determinada a partir da equação (2), onde P₀ é a massa da matriz seca e P_i da matriz intumescida. Considerou-se que a absorção atingia o equilíbrio a partir do ponto em que não existia mais acréscimo significativo ao seu valor.

$$A = \frac{(P_i - P_0)}{P_0} \quad (2)$$

A seguir, procedeu-se o ensaio de absorção. Oito matrizes semicirculares de cada grupo, com dimensões de 1,5 x 0,75 cm e intervalo de massa entre 1,5 e 2,5 mg foram imersas em 20 mL de solução tampão de fosfato (PBS 1x - pH 7,4), à temperatura de 37°C. Após a remoção do excesso da solução sobre a superfície de cada espécime com papel absorvente, procedeu-se a pesagem das matrizes inchadas. A aferição das massas das matrizes secas e intumescidas foi realizada com balança analítica ATI Cahn C35 (precisão 0,1 µg). A absorção de PBS no equilíbrio foi determinada a partir da equação (2).

8.4.3. Porosidade

Neste estudo, a determinação da porosidade das matrizes foi realizada através do método de imersão. Para a realização do experimento, foi escolhido n-heptano como solvente. Primeiramente, foi determinado o tempo necessário para as matrizes atingirem o equilíbrio de absorção. O teste foi realizado de maneira similar a determinação do equilíbrio de absorção de PBS. Matrizes previamente preparadas de gelatina e ácido hialurônico (9:1)

e gelatina e heparina (9:1) foram imersas em 10 mL de heptano a 5°C. A absorção foi calculada através da equação (2) em tempos predeterminados e em triplicata.

Uma vez determinado o tempo de imersão para alcançar o equilíbrio, as amostras de cada grupo foram mergulhadas no solvente por este período e quantificadas as respectivas absorções. Para o cálculo da porosidade (P) foi utilizada a equação (3), considerando m_{Hep} a massa de Heptano (obtida pela diferença de massa entre a matriz intumescida e a matriz seca), ρ_{Hep} a densidade do heptano, m_{Mat} a massa da matriz seca, ρ_{Mat} a densidade da matriz (obtida de uma amostra maciça do material, conforme a norma ISO 1183:2004).

$$P = \frac{\frac{m_{Hep}}{\rho_{Hep}}}{\left(\frac{m_{Hep}}{\rho_{Hep}} + \frac{m_{Mat}}{\rho_{Mat}}\right)} \quad (3)$$

8.5. ISOLAMENTO E CULTURA CELULARES

As células uroteliais foram obtidas de segmentos de ureteres descartados após nefrectomias, nos quais o urotélio não apresentava processos patológicos. As amostras foram coletadas de seis pacientes que aceitaram participar do estudo, com diagnósticos de exclusão funcional renal (04) e neoplasia de células renais (02). Os segmentos de ureter retirados tinham uma área entre 1 e 3 cm². Eles foram dissecados de maneira asséptica para remoção da serosa e colocados em meio de transporte (solução salina de Hank, HEPES, aprotinina e 1% penicilina-estreptomicina) (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Ao mesmo tempo, foi removida uma pequena porção de tecido adiposo periureteral e perirrenal (cerca de 5 mL), a qual foi limpa em soro fisiológico e colocada em meio de

transporte próprio (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina-estreptomicina) (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Foi utilizado o protocolo de Southgate et. al.^{90,93} para o isolamento e cultura das células uroteliais. A amostra de ureter foi imersa em uma solução removedora de epitélio (0,1% EDTA) por 16 horas. Após essa etapa, o epitélio foi descolado do estroma e desagregado em uma solução de colagenase tipo IV (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) (100 UI/mL) por 30 minutos (37°C). A seguir, o meio para queratinócitos (KFSM) (5 mL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi acrescentado e a dispersão foi centrifugada (250g) por 5 minutos. O pellet resultante foi então ressuspensionado em 5 mL de meio de cultura (KFSM suplementado com fator de crescimento epitelial, extrato de pituitária bovina e 2% penicilina-estreptomicina) e semeado em uma garrafa de cultivo celular (25 mL). A densidade de inicial foi de 2×10^4 células por centímetro quadrado. O meio foi trocado em dias alternados.

O processo usado para isolar células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSCs) foi baseado em uma modificação de protocolo publicado por Vindigni et. al.¹⁰³. Em uma placa de Petri, os espécimes de tecido adiposo foram cortados em pequenos pedaços (<3 mm) e lavados exaustivamente com PBS. A seguir, o tecido resultante foi colocado em uma solução de colagenase tipo I (Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA) por 30 minutos (37°C) sob agitação. Após esse período, foi acrescentado meio de cultura (DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino) e a dispersão foi centrifugada (300g) por 10 minutos. Após essa etapa, o pellet resultante foi ressuspensionado em 5 mL de meio de cultura (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% penicilina-estreptomicina) e procedeu-se a semeadura em uma garrafa de cultivo celular (25 mL). A densidade padronizada foi entre 5×10^3 e 1×10^4 células por centímetro quadrado. O meio foi trocado duas vezes por semana. As células foram utilizadas para os experimentos após a quarta passagem.

Em ambas as culturas, as garrafas foram incubadas em estufa com atmosfera controlada (umidade relativa 95%, 5% CO₂ a 37°C). Foram realizadas subculturas quando as

células atingiram uma confluência superior a 90%. As células foram descoladas por incubação com EDTA e tripsina, ressuspensas em meio de cultura contendo inibidor da tripsina (ou soro fetal bovino para as células mesenquimais), centrifugadas e novamente semeadas. A cada troca de meio, as células eram examinadas por microscopia óptica para avaliar seu crescimento e a possibilidade de contaminação.

8.6. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Imunofenotipagem

Uma amostra das ADSCs, contendo 9×10^5 células, foi separada para a realização de análise imunofenotípica. As células foram divididas em 10 tubos de ensaio e suspensas em PBS. A seguir, foram incubadas com anticorpos humanos monoclonais (CD29, CD34, CD44, CD45, CD90 and HLA-DR) por 30 minutos. O conteúdo de cada tubo foi analisado em um citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, EUA) e os dados foram avaliados pelo software CellQuest®.

Ensaio de Diferenciação Celular

A capacidade de diferenciação das ADSCs em linhagens adipogênica e osteogênica foi investigada em um ensaio *in vitro*. Os procedimentos utilizados foram baseados no protocolo descrito por Meirelles et. al¹⁰¹. Para a realização deste teste, as células foram cultivadas em uma placa de cultura de 12 poços, com a seguinte formatação: controle (poços 1 e 2), diferenciação adipogênica (3 e 4) e diferenciação osteogênica (5 e 6). Foi padronizada a concentração de 1×10^4 células por poço.

Para a diferenciação adipogênica, as células foram expostas por duas semanas a IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) suplementado com 20% de plasma humano,

dexametasona (10^{-7} M), insulina (2,5 $\mu\text{g/mL}$), indometacina (5 μM) e heparina (10 unidades/mL). Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com Oil Red O.

Na diferenciação osteogênica, as células foram incubadas por quatro semanas com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, dexametasona (10^{-8} M), L-ácido ascórbico 2-fosfato (5 $\mu\text{g/mL}$) e β -glicerofosfato (10 mM). Elas também foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com Alizarin Red S para detectar a deposição de cálcio. O grupo controle foi cultivado com DMEM e 10% de soro fetal bovino.

8.7. SEMEADURA DAS CÉLULAS NAS MATRIZES

Cada tipo celular foi semeado nos quatro grupos de matrizes, com uma concentração de 2×10^5 células por matriz. Os conjuntos foram incubados por duas semanas em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino e 2% penicilina-estreptomicina. Após esse período, as matrizes foram fixadas com paraformaldeído 4%, submetidas a um processo de desidratação (de etanol a xilol) e incluídas em parafina. Cortes histológicos de 3 μm de espessura foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina.

8.8. ANÁLISE DE PROTEÍNAS

8.8.1. Extração e Quantificação de Proteínas

Oito matrizes cultivadas com células uroteliais foram processadas individualmente em um homogeneizador por 30 segundos a 7500 rpm (4°C). Antes de iniciar o processamento, foram adicionados 300 μL de solução tampão de lise RIPA (*Modified*

Radioimmunoprecipitation Buffer) (50 mM HEPES, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e 2 mM de Ortovanadato de sódio, 0,1% Triton X-100). A dispersão resultante foi mantida em repouso por 2 h a 4°C. Após esse período, ela foi centrifugada durante 10 minutos (10000 g a 4°C) para a remoção do sobrenadante. A seguir, uma alíquota de cada amostra foi retirada, diluída (1:400) e submetida a quantificação protéica pelo método colorimétrico de Bradford. A quantidade de proteínas foi determinada por espectrometria com comprimento de onda (595 nm).

8.8.2. Western Blotting

Para separação das proteínas, foi utilizado um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com uma concentração de 8%. Aproximadamente 150 µg de proteína extraída de cada amostra foi desnaturada em solução de Laemmli (30% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris, 750 mg DTT e 0,001% azul de bromofenol) a 95°C por 3 minutos e colocada em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada na presença de uma solução tampão (192 mM glicina, 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3). Uma diferença de potencial elétrico de 120 volts e um tempo de 2 horas e 30 minutos foram usados como parâmetros para a migração das proteínas. O processo foi monitorado pela visualização do deslocamento do marcador de peso molecular. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose pelo sistema semi-seco de eletrotransferência (Semidry Biorad®). O procedimento foi efetuado em 1 hora, com uma diferença de potencial elétrico de 20 volts e na presença de um tampão (25 mM Tris, 192 mM glicina e 10% metanol, pH 8,3).

A seguir, as membranas foram imersas durante 2h em uma solução bloqueadora de TTBS (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,4) acrescida de leite em pó desnatado (5%) para saturar sítios de ligação inespecíficos. Após essa etapa, elas foram incubadas com o anticorpo monoclonal primário para citoqueratina 7 (53 kDa) (sc-53264, Santa Cruz Biotechnology) por, no mínimo, 16 horas (4°C sob agitação constante). Posteriormente, as membranas foram lavadas com TTBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e

então reincubadas com o anticorpo secundário por 2 horas. Em seguida, foram lavadas com TBS (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05%, pH 7,4) (3 lavagens de 10 minutos cada). Foi utilizado o processo de quimiluminescência (ECL) para a revelação.

8.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de análise de variância (ANOVA) fator único foi aplicado para avaliar as diferenças entre as médias das seguintes variáveis dependentes: espessura, porosidade, ângulo de contato, potencial zeta, absorção de PBS e rugosidade. A variável independente foi o tipo de matriz. O teste de Tukey foi usado para comparações pareadas entre os diferentes grupos. Anteriormente ao teste estatístico, as variáveis dependentes foram examinadas quanto à acurácia dos seus dados, normalidade de suas distribuições e homogeneidade de variância. O resultado do exame dos pressupostos foi satisfatório, com uma única exceção: evidenciou-se violação da homogeneidade de variância entre os grupos da variável rugosidade. Assim, optou-se pelo uso do teste de Welch para avaliação entre grupos e Gomez-Howell para comparações pareadas desta variável. Utilizou-se o software SPSS 17.0 (Statistical Packages for the Social Sciences, IBM) para a realização dos cálculos estatísticos. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

8.10. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As células utilizadas no estudo foram obtidas de segmentos de ureteres e gordura descartados após nefrectomias. As amostras retiradas não apresentavam processos patológicos. Os pacientes receberam a garantia de sigilo em relação às informações obtidas e o uso do material coletado foi absolutamente restrito para fins de pesquisa científica. Os

indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento informado (anexo 8). Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), tendo sido aprovado sob o número 09-408.

8.11. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

A produção e caracterização das matrizes foram realizadas em laboratórios do Instituto de Química, Instituto de Física, Faculdade de Farmácia e Centro de Microscopia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os procedimentos relacionados com a cultura celular foram realizados no Centro de Pesquisa no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Instituto de Pesquisas de Células-Tronco (Faculdade de Farmácia/UFRGS). Para a análise protéica, foi utilizada a infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, instalado no Departamento de Fisiologia (UFRGS), e do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, situado no Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

8.12. FONTES DE FINANCIAMENTO

Este projeto contou com financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE protocolo 09-408), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq nº 474560/2010-4) e do Instituto de Pesquisa de Células-Tronco.

9. RESULTADOS

9.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com o objetivo de avaliar a superfície de cada matriz, procedeu-se a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada à espectrometria por energia dispersiva (EDS) (Figura 3). As imagens foram obtidas com uma voltagem aplicada de 15 kV e o detector ajustado para formação de imagem dos elétrons retroespalhados. A microanálise do elemento enxofre, presente na heparina e ausente no ácido hialurônico, permitiu a verificação da conservação da modificação química introduzida pelo *electropraying* após o processo de reticulação química. A Tabela 2 mostra a percentagem de enxofre existente na superfície de cada matriz em relação à quantidade total de átomos.

Tabela 2. Resultados da quantificação do elemento enxofre por EDS na superfície das matrizes.

Enxofre (%)	Tipo de Matriz			
	A0	AH	H0	HA
	0,49 a 0,76	0,96 a 1,17	1,95 a 2,28	1,17 a 1,84

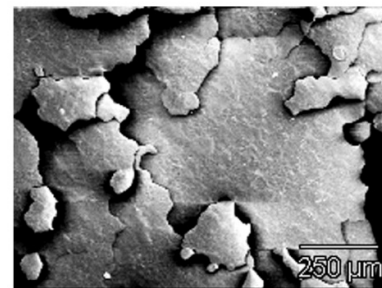
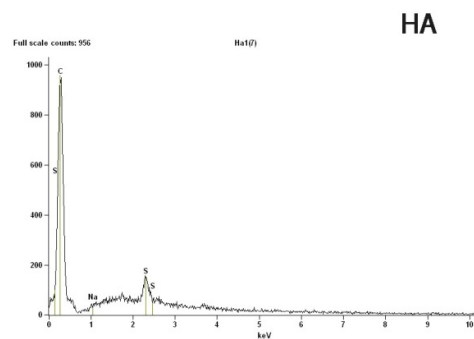
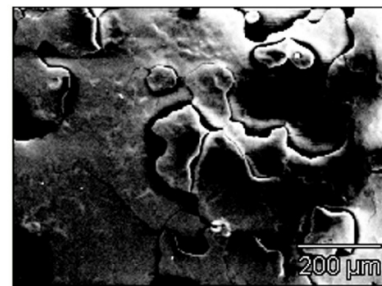
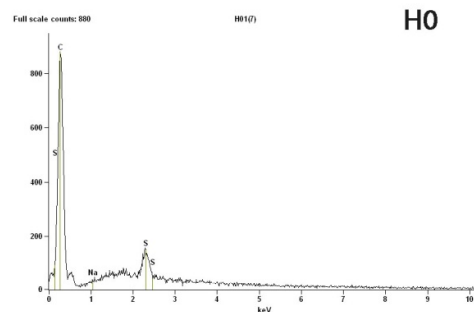
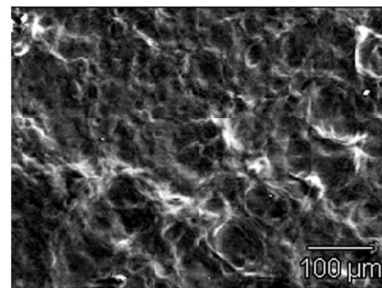
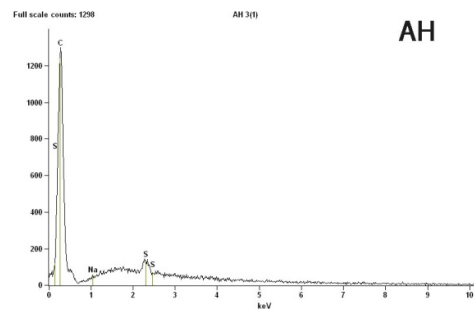
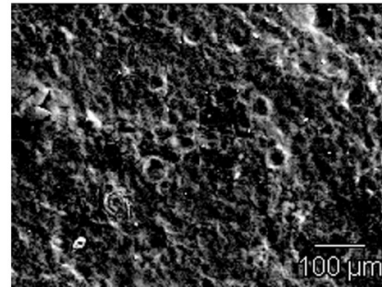
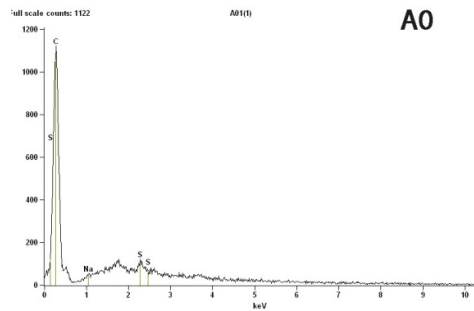


Figura 3. Fotomicrografias da superfície das matrizes. Coluna à esquerda demonstra a análise por EDS.

9.2. PROPRIEDADES RELACIONADAS COM A INTERAÇÃO MATRIZ-CÉLULAS

Os resultados dos testes de potencial zeta, ângulo de contato e rugosidade se encontram demonstrados na Tabela 3, juntamente com a análise de variância entre os grupos. Eles são apresentados como média aritmética simples da variável e a probabilidade de erro α do teste estatístico. Observa-se que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas três variáveis estudadas. As comparações entre os diferentes tipos de matriz para cada variável serão feitas individualmente. Os dados completos das análises estatísticas realizadas se encontram nos anexos 4, 5 e 6.

Tabela 3. Média dos resultados das variáveis relacionadas com a interação matriz-células.

	Tipo de Matriz				p
	A0	AH	H0	HA	
Potencial Zeta (mV)	-10,96	-8,55	-6,14	-7,55	0,004
Ângulo de Contato (°)	63	65	75	69	<0,001
Rugosidade (μm)	0,122	0,125	0,123	0,170	0,007

9.2.1. Potencial Zeta

Independentemente da composição química, todas as matrizes são aniônicas. Entretanto, ao se comparar as matrizes A0 e H0, observou-se que as primeiras têm um potencial eletrostático significativamente mais negativo ($p=0,002$). A adição de heparina à superfície das matrizes com corpo de ácido hialurônico (AH) foi suficiente para reduzir o potencial a tal ponto que não se evidencia mais diferença estatística ao ser comparada com as matrizes H0 ($p=0,216$). Por outro lado, a adição de ácido hialurônico à superfície de matrizes com corpo de heparina (HA), não alterou significativamente o caráter aniônico em comparação à matriz H0 ($p=0,655$). Os intervalos de confiança da diferença entre as médias obtidos pelo teste de Tukey são demonstrados na Figura 4 (sempre que o intervalo cruza o ponto zero, não existe diferença estatística entre os grupos analisados).

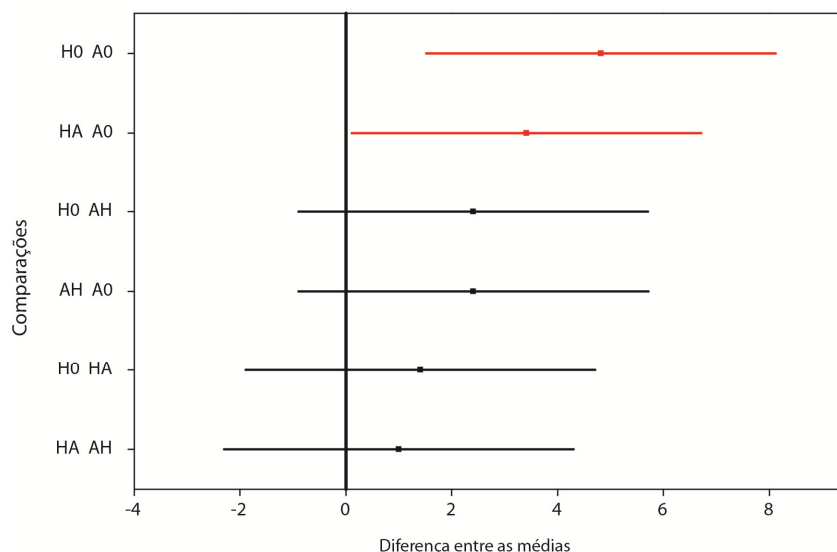


Figura 4. Comparações entre matrizes para o potencial zeta. O Gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.

9.2.2. Ângulo de Contato

Todas as matrizes têm superfícies hidrofílicas (ângulos de contato $< 90^\circ$). Quando as matrizes constituídas somente por ácido hialurônico (A0) e heparina (H0) são comparadas, evidenciou-se que as últimas são menos hidrofílicas que as primeiras ($p < 0,001$). A Figura 5 mostra uma fotografia do ângulo de contato das matrizes A0 e H0. A adição de heparina à superfície das matrizes com corpo de ácido hialurônico não torna sua hidrofílicidade semelhante às matrizes H0 ($p = 0,002$). No entanto, o acréscimo de ácido hialurônico às matrizes com corpo de heparina aumentou a hidrofílicidade da superfície a ponto de não ser mais observada uma diferença entre as matrizes A0 e HA ($p = 0,063$). As comparações estão demonstradas na Figura 6.



Figura 5. Teste do ângulo de contato das matrizes A0 e H0.

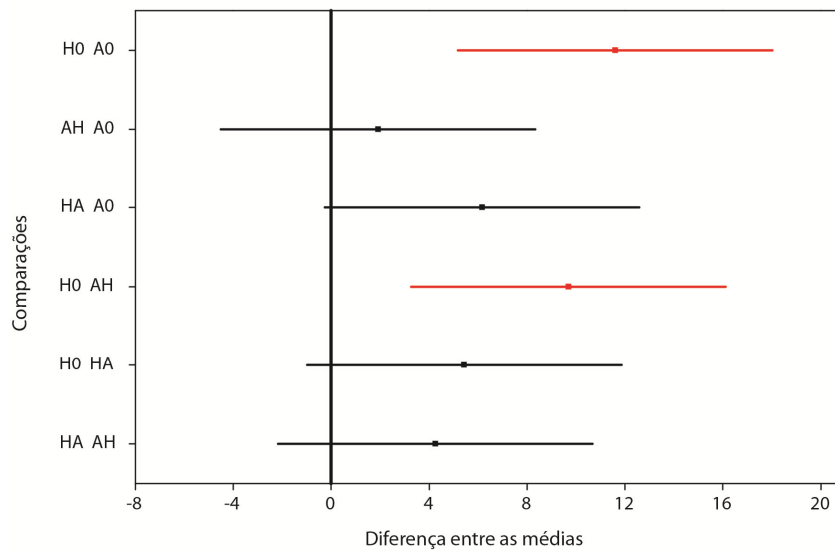


Figura 6. Comparações entre matrizes para o ângulo de contato. O Gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.

9.2.3. Rugosidade

A representação do perfil de rugosidade de diferentes matrizes é apresentada na Figura 7. Ao se comparar os grupos, nota-se que não existe diferença entre a rugosidade das matrizes A0, AH e H0 (médias em torno de $0,125 \mu\text{m}$). Entretanto, evidencia-se um aumento significativo da rugosidade média nas matrizes de HA, que se destaca sobre as demais. A representação gráfica dos intervalos de confiança da diferença entre as médias é mostrada na Figura 8.

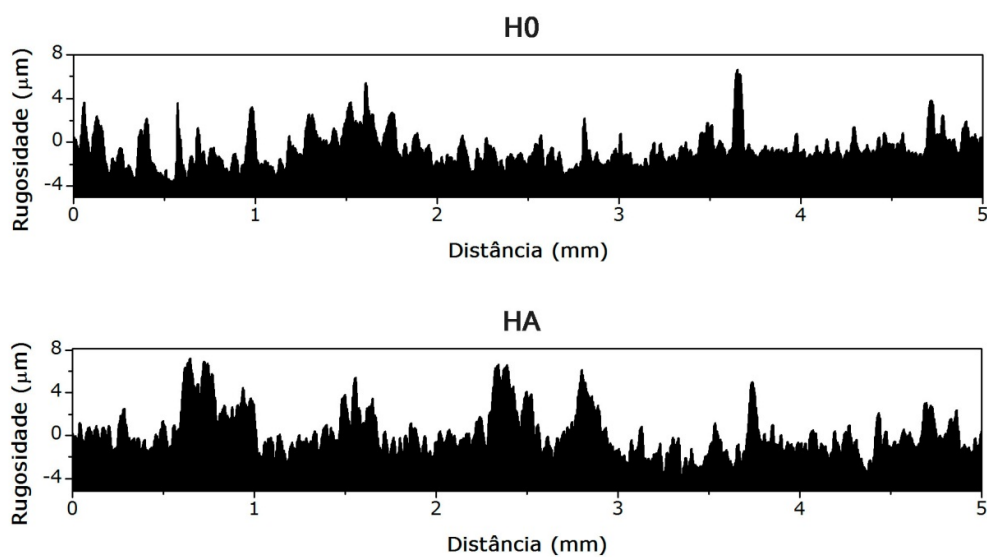


Figura 7. Representação do perfil de rugosidade das matrizes H0 e HA.

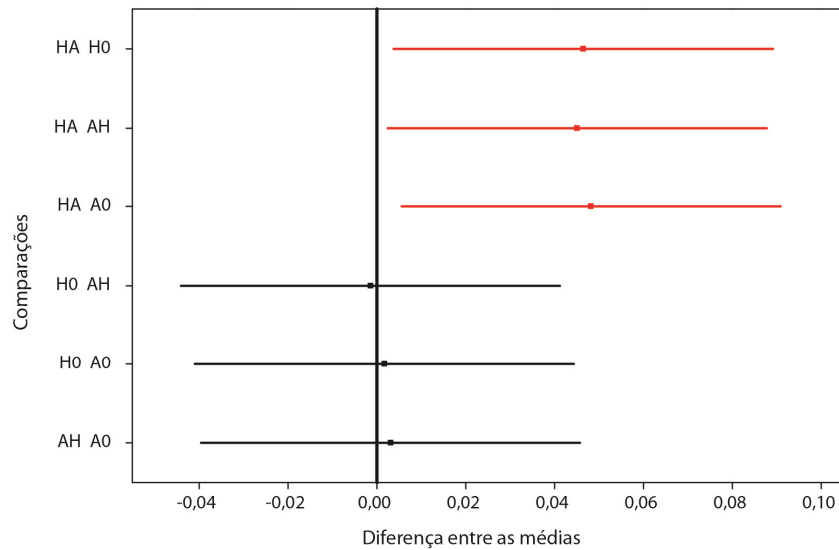


Figura 8. Comparações entre matrizes para a rugosidade. O Gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.

9.3. PROPRIEDADES RELACIONADAS COM OS MECANISMOS DE TRANSPORTE

9.3.1. Determinação do Equilíbrio da Absorção de PBS

A Figura 9 demonstra a curva de absorção de PBS das matrizes de gelatina-ácido hialurônico e gelatina-heparina. Para ambas as matrizes, considerou-se o período de 1 hora como necessário para o equilíbrio de absorção ser alcançado. No anexo 1 se encontram os valores de todas as medidas realizadas.

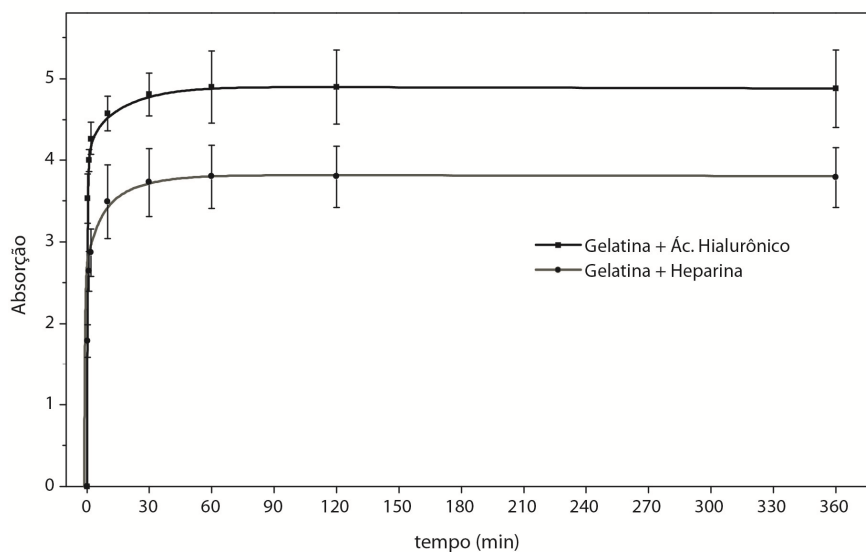


Figura 9. Cinética de absorção de PBS das matrizes A0 e H0.

9.3.2. Determinação do Equilíbrio da Absorção de Heptano

De maneira similar à verificação do equilíbrio de absorção do PBS, examinou-se a curva de absorção de n-heptano pelas matrizes de gelatina-ácido hialurônico e gelatina-heparina. Assim, assumiu-se o tempo de 24 horas como necessário para o equilíbrio de absorção de heptano ser atingido (Figura 10). Todas as medidas encontram-se registradas no anexo 1.

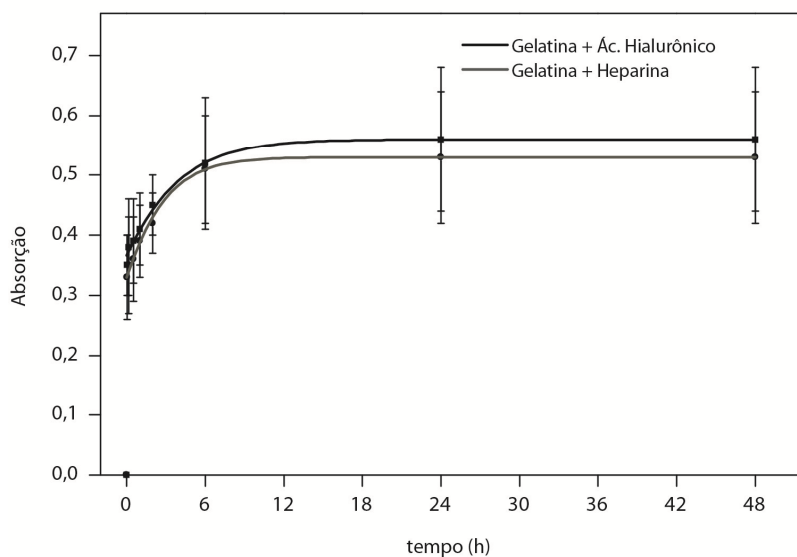


Figura 10. Cinética de absorção de heptano das matrizes A0 e H0.

9.3.3. Análise das Variáveis

Os resultados dos testes de espessura, porosidade e absorção de PBS se encontram demonstrados na tabela 4, juntamente com a análise de variância entre os grupos. Observa-se que não existe diferença estatística entre os grupos quando se analisa suas espessuras e porosidades. A variável absorção apresentou uma diferença significativa entre os tipos de matrizes e será avaliada separadamente. Os dados completos das análises estatísticas realizadas se encontram nos anexos 2 e 3.

Tabela 4. Média dos resultados das variáveis relacionadas com o transporte de solutos. (NS: não significativo).

	Tipo de Matriz				p
	A0	AH	H0	HA	
Espessura (μm)	74,3	79,2	78,8	81,2	NS
Absorção	4,80	4,35	3,61	3,15	<0,001
Porosidade (%)	51,3	52,5	51,5	48,3	NS

9.3.4. Absorção de PBS

Identifica-se uma clara divisão nos resultados com base na composição química do corpo da matriz. Ao serem executados os testes pareados, observa-se que não existiu diferença estatística entre os grupos com mesma composição química no corpo: entre A0 e AH ($p=0,23$) e entre H0 e HA ($p=0,22$). No entanto, sempre que foram comparadas matrizes cujos corpos apresentavam composições químicas diferentes, houve diferença significativa. Os intervalos de confiança da diferença entre as médias obtidos pelo teste de Tukey estão demonstrados na Figura 11.

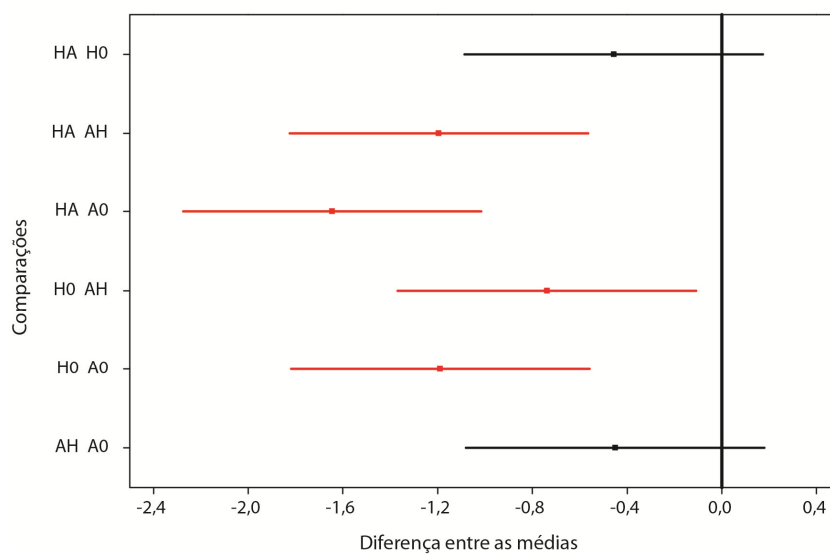


Figura 11. Comparações entre matrizes para a absorção de PBS. O gráfico demonstra os intervalos de confiança (95%) obtidos pelo teste de Tukey.

9.4. CULTURA CELULAR

9.4.1. Urotélio

Das seis culturas de células uroteliais realizadas, uma não atingiu confluência por deficiência na adesão celular e três foram perdidas por contaminação. As duas culturas primárias remanescentes atingiram confluência e permitiram a realização de subculturas. Foi possível mantê-las em cultivo por até três passagens, sem sinais de senescência. Observou-se certa heterogeneidade na morfologia das células epiteliais na cultura primária, a qual foi reduzida após a primeira passagem. A Figura 12 demonstra a fotomicrografia de uma cultura estabelecida.

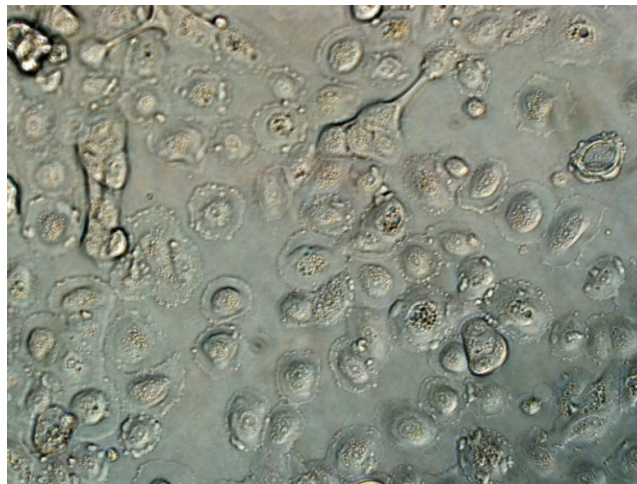


Figura 12. Fotomicrografia da cultura de células uroteliais (magnificação 200x).

9.4.2. Cultura e Caracterização de Células-Tronco Derivadas do Tecido Adiposo

Cinco das seis culturas primárias de ADSCs foram perdidas por contaminação (04) e problemas na tripsinização (01). A única remanescente exibiu um crescimento sustentado até atingir a quarta passagem, quando foi utilizada nos experimentos. As células

apresentaram uma morfologia fusiforme desde a cultura primária. A Figura 13 demonstra a cultura de ADSCs.

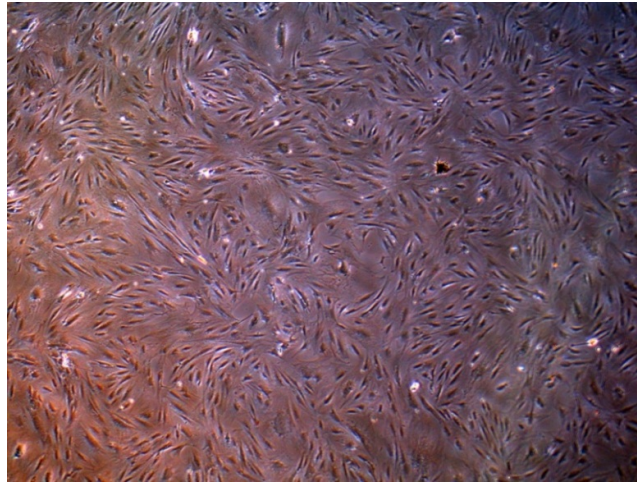


Figura 13. Fotomicrografia da cultura de ADSCs (magnificação 40x).

A análise do perfil imunofenotípico por citometria de fluxo evidenciou que as ADSCs expressavam os marcadores CD29, CD90 e CD44 (embora este marcador fosse positivo em menos de 50% das células). Ao mesmo tempo, elas não apresentavam marcação para CD34, CD45 e HLA-DR. O anexo 7 demonstra o registro do perfil imunofenotípico das células avaliadas.

O potencial de diferenciação das ADSCs foi confirmado pelo ensaio correspondente. A diferenciação adipogênica foi verificada pelo desenvolvimento de vacúolos intracitoplasmáticos corados pelo Oil Red, que confirma o seu conteúdo lipídico. As áreas coradas por Alizarin Red demonstram a deposição de matriz calcificada, característica da diferenciação osteogênica (Figura 14).

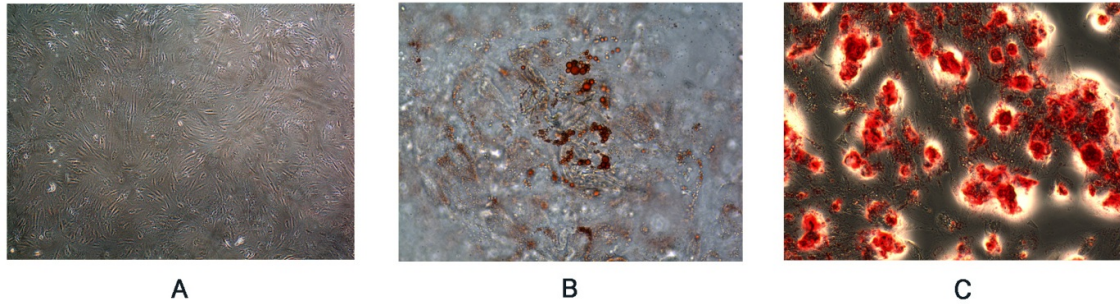


Figura 14. Fotomicrografias do ensaio de diferenciação das ADSCs (magnificação 100x). (A) Controle. (B) Gotículas de lipídios (laranja) indicando a diferenciação adipogênica. (C) Matriz calcificada (vermelho) confirmando a diferenciação osteogênica.

9.5. CULTURA DAS CÉLULAS NAS MATRIZES

Após duas semanas de cultura, a análise dos cortes histológicos revelou que ambos os tipos celulares foram capazes de aderir e proliferar sobre as matrizes. A Figura 15 mostra o aspecto macroscópico de uma matriz após a interação com células. As células uroteliais formaram uma camada simples sobre o substrato. Não foi possível identificar locais de estratificação, sinais de polarização celular e, tampouco, migração para o interior da matriz (Figura 16A). A análise da expressão de citoqueratina 7 por Western blotting revelou a presença deste marcador de diferenciação do urotélio nos quatro tipos de matrizes (Figura 16B).

Ao exame histológico, as ADSCs cultivadas nas matrizes exibiram um arranjo de multicamadas. A observação mais detalhada revela que existem indícios de duas morfologias distintas crescendo conjuntamente. Células com um aspecto fusiforme, que parecem predominar nas camadas basais e intermediárias, associadas a outras com núcleo arredondado, localizadas preferencialmente na superfície (Figura 16C).

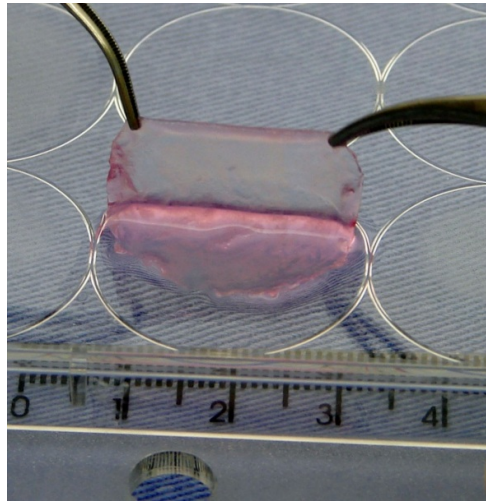


Figura 15. Registro fotográfico da matriz H0 após a cultura com ADSCs.

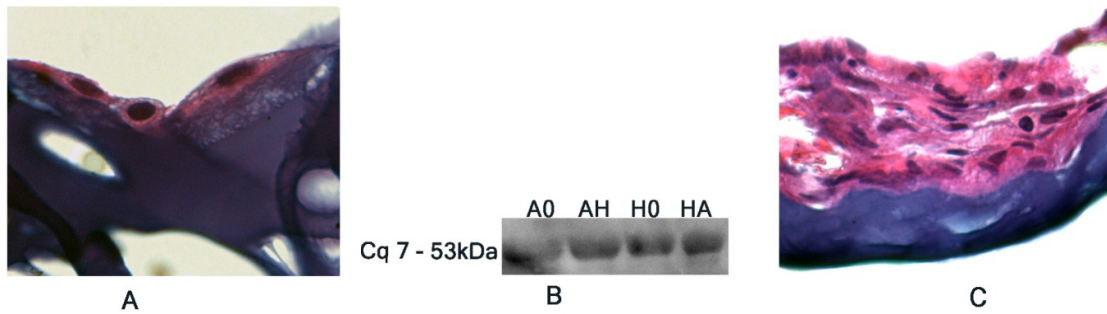


Figura 16. Interações entre células e matrizes. (A) Corte histológico demonstrando células uroteliais aderidas a uma matriz (magnificação 1000x). (B) Bandas indicando a presença de citoqueratina 7. (C) Corte histológico demonstrando a formação de camadas de células mesenquimais (400x).

10. DISCUSSÃO

O princípio da Engenharia de Tecidos é mimetizar o processo da gênese tecidual natural fornecendo às células um arcabouço, denominado matriz temporária ou “*scaffold*”, que servirá de base para a construção do tecido desejado². Como a matriz extracelular natural apresenta composição e propriedades distintas nos diversos tecidos do organismo, é lógico supor que essa mesma regra deva ser aplicada no planejamento do produto manufaturado.

Atualmente, o enfoque no desenvolvimento de novas matrizes está dirigido para a produção de materiais que imitem certas propriedades da matriz extracelular natural com o objetivo de induzir respostas celulares específicas^{13,62}. Tais respostas podem ser obtidas tanto pela incorporação de moléculas bioativas, quanto pela seleção dos materiais e ajuste de suas propriedades.

Neste estudo, essas ideias orientaram tanto a escolha das matérias-primas quanto a formatação dos tipos de matrizes. A seleção de macromoléculas presentes nos tecidos urinários visou identificar o seu efeito sobre a atividade celular. A variação do glicosaminoglicano na superfície dos arcabouços teve por objetivo expor as células a um ambiente que simulasse as condições de matrizes extracelulares no estado embrionário (A0), normal (AH) e não fisiológico (H0 e HA).

Não há um método de fabricação de matrizes que possa ser empregado em todas as aplicações da engenharia de tecidos. Dependendo do tipo de tecido e das propriedades dos materiais, poderá haver vantagem na utilização de um método específico. O uso do *electrospinning* (eletrofiação) está entre as principais técnicas de processamento para matrizes indutoras de tecidos moles^{105,106}. As matrizes produzidas por esse método possuem características que favorecem a proliferação e migração celulares - uma grande área superficial em relação ao volume e alta porosidade¹⁰⁵.

O electrospinning é uma técnica utilizada para a obtenção de fibras com diâmetros submicrométricos¹⁰⁵. Essencialmente, ele consiste na geração de um campo elétrico entre um capilar, ligado a um reservatório que contém uma mistura de polímeros dissolvidos, e um coletor. Quando a força eletrostática se torna maior que a tensão superficial da mistura na ponta do capilar, forma-se um fino jato que viaja desta para o coletor. Durante esse processo, a evaporação do solvente origina fibras com diâmetros nanométricos a micrométricos.

As características das fibras são determinadas por parâmetros que podem ser ajustados: como a vazão da solução, a concentração e a composição da mistura, o tipo de solvente, a magnitude do potencial elétrico aplicado e a distância entre o capilar e o coletor. O mesmo princípio se aplica ao *electrospraying*. No entanto, os parâmetros do processo são regulados para que sejam formadas microgotas¹⁰⁵.

O processamento de macromoléculas naturais por *electrospinning* é dificultado pela presença de fortes interações intermoleculares (forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio), as quais reticulam o material e impedem o estiramento das moléculas durante a formação das fibras^{107,108}. No presente trabalho, esse problema foi contornado pela adoção do protocolo de Li et. al¹⁰⁷. A elevação da temperatura acima de 36 °C é suficiente para romper as ligações intermoleculares de hidrogênio da gelatina e dos GAGs. Além disso, o uso de etanol como cossolvente reduz a tensão superficial da água, facilitando a formação de fibras.

As matrizes foram submetidas a um processo de reticulação química com a finalidade de evitar a dissolução da matriz em meio aquoso e aumentar a sua resistência mecânica. A carbodiimida (EDC) é um agente reticulante que atua sobre o ácido carboxílico das proteínas e polissacarídeos, aumentando a sua reatividade através da formação de anidrido carboxílico. O anidrido reage com os grupos amina e hidroxila de outras cadeias, resultando em ligações do tipo amida e éster^{109,110}.

O uso da carbodiimida é vantajoso sobre o de outros agentes reticulantes, pois ela atua como um catalizador e, portanto, não permanece incorporada à ligação¹⁰⁸⁻¹¹⁰. As suas moléculas sofrem uma reação de terminação e originam compostos derivados da ureia, que podem ser removidos da matriz com água. Experimentos envolvendo colágeno e polissacarídeos demonstram que esse agente confere a matrizes diminuição das taxas de degradação e aumento da resistência mecânica, sem demonstrar toxicidade celular^{106,109,111,112}.

A análise por MEV revelou que a superfície das matrizes não apresenta um conjunto de fibras, mas tem a morfologia de uma membrana. Cortes histológicos, avaliados posteriormente por microscopia óptica, demonstraram que as matrizes são formadas por um arranjo de lâminas sobrepostas em camadas (Figura 17). Portanto, o efeito do agente reticulante sobre as fibras modificou a arquitetura dos arcabouços. Estudos que aplicaram o mesmo processo em matrizes de colágeno conseguiram manter o seu arranjo fibrilar, porém não foi possível repetir este resultado no presente trabalho.

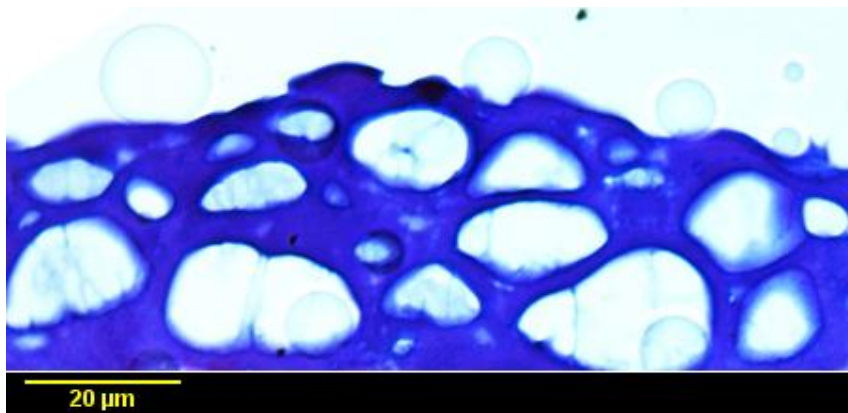


Figura 17. Fotomicrografia de um corte transversal de uma matriz H0 (microscopia óptica, coloração hematoxilina-eosina, barra: 20 μm).

A modificação na morfologia das matrizes gerou a necessidade de comprovação da conservação da variação do GAG introduzida na manufatura. Por esse motivo, procedeu-se a microanálise do elemento enxofre na superfície dos diferentes tipos de matrizes. A

avaliação por EDS identifica a presença de elementos químicos através da detecção do Rx característico (Lei de Moseley) emitido por cada átomo ao ser bombardeado por elétrons. Como a heparina é constituída por átomos de enxofre e eles são ausentes no ácido hialurônico, é possível distinguir ambas as moléculas pela presença deste elemento.

A análise das superfícies demonstra que a concentração de enxofre na matriz A0 é baixa (na média em torno de 0,6% do total de átomos). Esse valor reflete a presença do enxofre nos resíduos de metionina da gelatina. Em comparação, a proporção de enxofre nas matrizes de gelatina-heparina (H0) sobe para mais de 2%. As matrizes em que houve o tratamento da superfície apresentam valores intermediários deste elemento, indicando que a modificação permaneceu mesmo após o processo de reticulação.

10.1. PROPRIEDADES RELACIONADAS COM A INTERAÇÃO MATRIZ-CÉLULAS

10.1.1. Potencial Zeta

Ao serem imersos em solução aquosa, proteínas e glicosaminoglicanos adquirem cargas eletrostáticas devido à dissociação iônica de seus grupos funcionais. A densidade de cargas eletrostáticas da superfície é proporcional ao gradiente de potencial elétrico entre ela e o meio eletricamente neutro. Como não é possível a aferição deste potencial pelo posicionamento de eletrodos, utilizam-se teorias que o relacionam ao comportamento da camada de contraíons adjacente à superfície.

Dentre as várias divisões teóricas da camada de contraíons, uma é particularmente importante para a definição do potencial zeta: a separação desta camada em duas partes por um plano que demarca uma região interna, fixa, e outra externa, que sofre cisalhamento pela fricção com as moléculas do solvente. O valor que representa a espessura da região interna é denominado comprimento de Debye (κ^{-1})³⁸.

O potencial elétrico existente entre o meio eletricamente neutro e o plano de cisalhamento da camada elétrica dupla é denominado eletrocinético ou zeta (ζ). Pela sua maior distância da superfície, a magnitude do potencial ζ é menor que a do potencial da superfície (ou de Stern). No entanto, admite-se que eles sejam semelhantes caso a força iônica do meio seja baixa e os íons dissolvidos sejam monovalentes e simétricos (1:1)^{38,39}.

A teoria de Smoluchowski pode ser usada para a determinação do potencial ζ de moléculas com qualquer conformação, desde que o seu raio seja muito maior que κ^{-1} e o potencial aferido menor que 50 mV³⁹. Para assegurar a confiabilidade dos resultados, o experimento seguiu esses pressupostos. Também é importante ressaltar que as medidas obtidas representam o potencial médio de toda a matriz. A avaliação de regiões específicas não pode ser feita por este ensaio.

A análise dos resultados demonstra que as matrizes A0 apresentam valores de potencial zeta significativamente mais aniônicos que as H0. Esse aparente paradoxo revela a maior interação da heparina com a gelatina. Sua maior densidade de cargas negativas, associada com a flexibilidade conformacional dos resíduos de ácido L-indurônico, são responsáveis pela maior reatividade da heparina com as proteínas. Esse facto se traduz na redução no número de grupos funcionais disponíveis para a dissociação iônica nas matrizes em que a heparina está presente.

10.1.2. Ângulo de Contato e Rugosidade

Ao se instilar uma gota d'água sobre uma superfície, a análise do ângulo formado pela intersecção das três interfaces existentes (fases sólida, líquida e gasosa) permite inferir a hidrofilicidade ou hidrofobicidade do material²⁴. Considera-se que a superfície é totalmente hidrofílica quando esse ângulo tende a zero. Tal facto significa que o líquido se espalha facilmente pela superfície do sólido, pois a diferença entre as energias livres na interface tende a ser nula. Por outro lado, a superfície é considerada hidrofóbica quando esse ângulo

é maior que 90° . O líquido se separa do substrato e assume a forma esférica devido a grande diferença entre ambas as energias livres de superfície²⁴.

A hidrofiliçidade é muito dependente da capacidade do material em formar ligações de hidrogênio com as moléculas da água¹⁹. Esse argumento explica o aumento da hidrofiliçidade das matrizes em que o ácido hialurônico está presente na superfície. A sua menor interação com a gelatina preserva um maior número de grupos carboxilato com habilidade de formar ligações intermoleculares de hidrogênio.

Neste trabalho, a interpretação do aumento da rugosidade nas matrizes HA é dificultada pela ausência de um teste que consiga rastrear as moléculas do ácido hialurônico. No entanto, é possível estabelecer a hipótese que esse incremento seja decorrente da agregação das moléculas desse GAG nos pontos da superfície com maior característica polar, onde sua miscibilidade deve ser maior.

Outro ponto que deve ser considerado é a influência da rugosidade sobre o ângulo de contato¹¹³. É bem documentado que aumento da rugosidade da superfície induz variações na forma da microgota, as quais se expressam por um incremento na dispersão dos resultados das medições. Além disso, verifica-se a tendência de decréscimo no valor real do ângulo quando ele é medido em superfícies hidrofílicas rugosas^{113,114}. Portanto, os valores dos ângulos de contato aferidos na matriz HA podem estar distorcidos pela sua maior rugosidade, o que criaria um viés de confusão na comparação com os outros tipos de matriz.

Existe a possibilidade de corrigir esse viés com a normalização dos resultados por um fator de correção para rugosidade, obtido da razão entre a área interfacial real e a projetada¹¹³. Entretanto, este procedimento não pôde ser aplicado no estudo pela ausência de informações relacionadas com a área na perfilometria.

10.2. PROPRIEDADES RELACIONADAS COM OS MECANISMOS DE TRANSPORTE

10.2.1. Porosidade

A porosidade de um material é definida como a relação entre o volume ocupado por poros (espaço vazio) e o volume total. O princípio do método de imersão é determinar o espaço vazio do interior do material o imergindo em um mau solvente para as moléculas que o compõem.

Assim, assumindo-se que não existe miscibilidade entre polímero e solvente, o ganho de massa será unicamente decorrente do preenchimento dos poros. Dessa forma, o heptano foi escolhido para este experimento porque os ésteres e amidas (ligações presentes nas proteínas e polissacarídeos) são imiscíveis em hidrocarbonetos (o parâmetro de Flory-Huggins tende a dois para estes compostos)¹¹⁵.

A equação (2) se origina da substituição do volume pela relação entre a massa e a densidade do material. A densidade dos polímeros foi calculada a partir da medida de amostras maciças de gelatina-ácido hialurônico (9:1) e gelatina-heparina (9:1). Respectivamente, seus resultados foram 1,59 g/cm³ e 1,56 g/cm³.

Os valores da porosidade dos quatro tipos de matrizes se distribuem em torno de 50%. Eles são considerados baixos para matrizes e podem influenciar negativamente a migração celular e o transporte de solutos. Atribui-se a perda de porosidade à modificação da arquitetura das matrizes pelo efeito do agente reticulante.

10.2.2. Absorção de PBS

Em última análise, as matrizes temporárias são retículos de polieletrólitos (i.e. macromoléculas que têm a capacidade de dissociar cargas eletrostáticas em solventes polares). A explicação para o comportamento destes materiais em meio aquoso provém do facto que suas cadeias poliméricas possuem segmentos com íons, intercalados com outros eletricamente neutros. De acordo com os modelos de Flory, Katchalsky e Michaeli, a energia livre de um reticulado de polieletrólitos durante o processo de inchamento pode ser entendida como uma combinação entre elementos iônicos e não-iônicos^{40,53,116,117}.

O componente não-iônico pode ser expresso nos termos da teoria de Flory-Huggins para polímeros neutros. O retículo incha pela oportunidade de aumentar a entropia do sistema, mas o processo é dependente da qualidade do solvente. Essa associação é denominada energia livre da mistura e descreve as interações não-Coulombianas entre ambos. A energia livre iônica compreende as interações eletrostáticas entre os íons fixos, contraíons e coíons, assim como a influência da difusão de íons dissolvidos no solvente para o interior da malha.

A dissociação dos grupos origina íons fixos e contraíons móveis solvatados. Como os íons fixos não podem difundir para o meio, seus contraíons também devem permanecer no interior do retículo para manter a eletroneutralidade do sistema (Equilíbrio de Donnan). Desse modo, o polímero atua como uma membrana semipermeável, impedindo que os íons difundam para a solução externa. Enquanto a concentração de íons móveis for maior dentro da matriz que no seu exterior, a pressão osmótica dirigirá o solvente para o interior da rede, criando um fluxo.

Além disso, a interação entre os íons fixos cria forças de eletrostáticas repulsivas, as quais estiram as cadeias poliméricas e aumentam a capacidade de absorção da matriz. À medida que a rede incha, as cadeias poliméricas são alongadas e assumem conformações entropicamente desfavoráveis. Tal fenômeno origina a energia livre elástica, que se opõe ao processo e estabelece o equilíbrio de absorção.

O tampão fosfato simula a osmolaridade e o pH do soro humano. Logo, a cinética de absorção das matrizes A0 e H0 reproduz, com uma boa acurácia, os seus comportamentos em meio de cultura. Observa-se que o equilíbrio de absorção é atingido rapidamente pela indução de fluxos de solvente para o interior dos retículos. Assumindo-se que as interações não-iônicas da heparina e do ácido hialurônico com o solvente sejam semelhantes, a maior absorção das matrizes A0 pode ser creditada a sua maior densidade de cargas eletrostáticas (exibem potencial zeta de maior magnitude).

É importante ressaltar que o comprimento de cadeia entre reticulações também pode estar influenciando o resultado, porém ele não foi medido neste estudo. Com os dados disponíveis, é possível afirmar que a modificação de superfície não alterou a capacidade de absorção de PBS. Isso se deve ao facto do volume ocupado pela modificação química ser muito menor que o volume total da matriz, o que torna o seu efeito não significativo.

Em geral, a difusividade das moléculas de baixa massa molar é diretamente relacionada com a fração do volume ocupado pela água no interior do material. Portanto, a análise da absorção de PBS permite afirmar que as matrizes com corpo de ácido hialurônico (A0 e AH) são mais eficientes no transporte de pequenos solutos.

10.3. CULTURA CELULAR

Os avanços nos métodos de cultivo das últimas décadas tornaram possível a geração de grandes quantidades de células mesmo quando obtidas de pequenas amostras de tecido. Assim, a ideia de integrar células e matrizes temporárias com o objetivo de regenerar partes danificadas de órgãos tornou-se uma realidade. Neste estudo, foi possível isolar dois tipos celulares de segmentos do sistema urinário, expandi-los e atingir quantidades suficientes para o implante em matrizes. O alto índice de perda de culturas deve ser creditado à curva de aprendizado a qual o autor se submeteu.

As culturas primárias de urotélio apresentam certa heterogeneidade de morfologia, pois a adesão inicial reproduz os diferentes graus de diferenciação do epitélio transicional. Após algumas passagens, observa-se que persistem apenas as células que expressam as características das camadas basais, com menor grau de diferenciação^{90,93,94}. Apesar de ser descrita a possibilidade de manter estas células em cultura por mais de seis passagens, é prudente considerar os efeitos da expansão *in vitro* sobre a função celular e limitar este procedimento.

Atualmente, existe um grande interesse em usar células-tronco mesenquimais com a finalidade de regenerar órgãos do sistema urinário^{10,96,99}. Embora células maduras tenham demonstrado aptidão em gerar um estroma funcional, acredita-se que as propriedades das células-tronco possam conferir aos tecidos uma qualidade superior. Além de exibirem uma capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, elas apresentam maior resistência à senescência e podem reduzir a reação inflamatória decorrente do implante *in vivo*^{98,100}.

Um dos sítios mais ricos em células-tronco mesenquimais é o tecido adiposo. Por ser abundante no organismo e de fácil acesso para coleta, ele tem o potencial de originar grandes quantidades de células indiferenciadas^{99,101-103}. Estudos utilizando ADSCs comprovaram a sua habilidade em expressar genes de células musculares lisas *in vitro* e desenvolver uma camada muscular ao serem implantadas *in vivo*^{96,102}.

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, existem critérios para definir as células-tronco mesenquimais^{99,100}. Elas devem exibir persistência em condições de cultura padrão, expressar determinados marcadores de superfície e demonstrar capacidade de diferenciação *in vitro*. As células-tronco isoladas do tecido adiposo são selecionadas de uma população heterogênea com base na sua capacidade de aderir e proliferar em frascos de cultura⁹⁹. Na superfície interna dos frascos, elas adotam uma morfologia alongada que se assemelha a de um fibroblasto.

Não existe um marcador específico para estas células, mas há um consenso entre os pesquisadores que as células-tronco mesenquimais não expressam receptores de células

hematopoéticas (CD14, CD34 e CD45)⁹⁹⁻¹⁰². Tampouco apresentam receptores do complexo de histocompatibilidade classe II (HLA-DR). Embora existam algumas diferenças entre estudos, é reconhecido que as ADSCs expressam marcadores para CD29, CD44, CD90 e Stro-1^{99,100}.

O critério mais importante para definir uma célula-tronco é a sua capacidade de originar células precursoras adultas ou células com diferenciação terminal⁹⁹. Já foi demonstrado que as ADSCs podem se diferenciar em linhagens adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica¹⁰². A diferenciação adipogênica é caracterizada pelo aparecimento de células contendo vacúolos lipídicos intracelulares. Para diferenciação osteogênica, utilizam-se os critérios de aumento da expressão de fosfatase alcalina ou identificação da deposição de matriz calcificada por método de coloração específico.

A análise da interação de ambos os tipos celulares com as matrizes produzidas foi apenas qualitativo. Neste momento, não existem dados suficientes para determinar se a variação na composição das matrizes foi traduzida em alguma mudança significativa na função celular. Da mesma forma, não foi possível avaliar o efeito das propriedades físico-químicas mensuradas e da associação de ambos os tipos celulares na formação de uma mucosa urotelial.

Contudo, verificou-se que ambas as células aderem e proliferam sobre todos os tipos de matrizes fabricadas neste estudo. Tanto o urotélio quanto as ADSCs parecem exibir comportamentos compatíveis com os descritos em outros estudos *in vitro*⁹⁶ e não foram observados indícios de aberrações (i.e. fusões celulares e sinais de fenótipos neoplásicos).

A análise da citoqueratina 7 revelou que as células uroteliais mantiveram a expressão desta proteína após o período de cultivo com matrizes. A citoqueratina 7 é o primeiro marcador de diferenciação urotelial a ser expresso e está presente em todas as camadas do urotélio normal^{89,90,92,93}. Assim, é possível afirmar que estas células não se desdiferenciaram no processo.

11. CONCLUSÕES

Este estudo procurou desenvolver um modelo para a formação de uma mucosa urotelial *in vitro*. Os seus resultados demonstram que foi possível transpor as principais etapas desse processo, mesmo que ainda faltem dados referentes à integração entre células e matrizes. As principais considerações estão destacadas abaixo:

- O uso da técnica de *electrospinning* para a fabricação de matrizes temporárias constituídas por macromoléculas naturais implica em uma maior complexidade de execução. A necessidade de reticulação após o processamento destruiu o padrão fibrilar do arcabouço e reduziu significativamente a sua porosidade final.
- A variação do glicosaminoglicano não alterou somente a composição da matriz, mas também as suas propriedades físico-químicas. A maior interação da heparina com a gelatina ocasionou uma redução na magnitude da densidade de cargas eletrostáticas do material. Este facto repercutiu principalmente sobre a capacidade de absorção e hidrofiliabilidade das matrizes.
- Apesar de apresentarem baixa porosidade, as demais propriedades das matrizes favorecem a interação celular: leve carácter aniônico, hidrofiliabilidade moderada, boa absorção e ausência de extremos de rugosidade.
- Foi possível isolar e expandir os tipos celulares necessários para a formação do tecido desejado. A caracterização das células mesenquimais derivadas de tecido adiposo comprovou os seus atributos de células-tronco.
- As matrizes temporárias produzidas neste estudo foram eficientes em garantir a adesão e proliferação das células uroteliais e ADSCs. No entanto, a sua presença, isoladamente, não foi suficiente para promover a estratificação do urotélio.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Staack A, Hayward SW, Baskin LS, Cunha GR. Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation* 2005;73:121-33.
2. Nerem RM. The challenge of imitating nature. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of Tissue Engineering*. 3 ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2007:7-14.
3. Atala A. Regenerative medicine and urology. *British Journal of Urology International* 2003;92:58-67.
4. Atala A. Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system. *American Journal of Transplantation* 2004;4:58-73.
5. Loai Y, Yeger H, Coz C, et al. Bladder tissue engineering: tissue regeneration and neovascularization of HA-VEGF-incorporated bladder acellular constructs in mouse and porcine animal models. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010;94A:1205-15.
6. Ben-Moshe Y, Amiel GE. Biocompatible materials for bladder substitution. *British Journal of Urology International* 2008;102:1334-8.
7. Zhu W, Xu Y, Feng C, Fu Q, Song L, Cui L. Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. *World Journal of Urology* 2010;28:493-8.
8. Yannas IV. Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration. *Journal of the Royal Society Interface* 2005;2:403-17.
9. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology* 1999;17:149-55.
10. Cross WR, Thomas DFM, Southgate J. Tissue engineering and stem cell research in urology. *British Journal of Urology International* 2003;92:165-71.
11. Sievert K-D, Amend B, Stenzl A. Tissue engineering for the lower urinary tract: a review of a state of the art approach. *European Urology* 2007;52:1580-9.
12. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet* 2011;377:1175-82.
13. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars In Cell & Developmental Biology* 2002;13:377-83.
14. Feinberg T, Weiss SJ. Developmental ECM sculpting: laying it down and cutting it up. *Developmental Cell* 2009;17:584-6.
15. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001;2:793-805.

16. Streuli CH. Integrins and cell-fate determination. *Journal of Cell Science* 2009;122:171-7.
17. Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes *Current Opinion in Cell Biology* 1997;9:76-85.
18. Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Current Opinion in Cell Biology* 1999;11:737-44.
19. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Engineering* 2005;11:1-18.
20. Jones EY. Three-dimensional structure of cell adhesion molecules *Current Opinion in Cell Biology* 1996;8:609-8.
21. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010;11:633-43.
22. Garcia AJ, Vega MD, Boettiger D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Molecular Biology of the Cell* 1999;10:785-98.
23. McFarland CD, Thomas CH, Carlo DeFilippis, Steele JG, Healy KE. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000;49.
24. Adamson AW, Gast AP. *Physical chemistry of surfaces*. Sixth ed. New York, NY: John Wiley & Sons Inc; 1997.
25. Longo G, Szleifer I. Ligand-receptor interactions in tethered polymer layers. *Langmuir* 2005;21:11342-51.
26. MacDonald DE, Deoa N, Markovic B, Stranickd M, Somasundarana P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 2002;23:1269-79.
27. Katz BZ, Zamir E, Bershadsky A, Kam Z, Yamada KM, Geiger B. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Molecular Biology of the Cell* 2000;11:047-1060.
28. Richert L, Schneider A, Vautier D, et al. Imaging cell interactions with native and crosslinked polyelectrolyte multilayers. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2006;44:273-85.
29. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2007;28:3074-82.
30. Bartolo LD, Morelli S, Bader A, Drioli E. Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. *Biomaterials* 2002;23:2485-97.
31. Lee JW, Kim YH, Park KD, Jee KS, Shin JW, Hahna SB. Importance of integrin β 1-mediated cell adhesion on biodegradable polymers under serum depletion in mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Biomaterials* 2004;25:1901-9.

32. Molina MP, Moreno PG, Barbero JEF, et al. Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces. *Acta Biomaterialia* 2011;7:771–8.
33. Ranella A, Barberoglou M, Bakogianni S, Fotakis C, Stratakis E. Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures. *Acta Biomaterialia* 2010;6:2711–20.
34. Wirth C, Grosogeat B, Lagneau C, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. Biomaterial surface properties modulate in vitro rat calvaria osteoblasts response: Roughness and or chemistry? *Materials Science and Engineering C* 2008;28:990–1001.
35. Zlatanov I, Groth T, Lendlein A, Altankov G. Dynamics of β 1-integrins in living fibroblasts - effect of substratum wettability. *Biophysical Journal* 2005;89:3555–62.
36. Groth T, Altankov G. Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. *Biomaterials* 1996;17:1227-34.
37. Ruardy TG, Moorlag HE, Schakenraad JM, Mei HCvd, Busscher HJ. Growth of fibroblasts and endothelial cells on wettability gradient surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 1997;188:209–17.
38. Masliyah JH, Bhattacharjee S. *Electrokinetic and colloid transport phenomena*: JohnWiley & Sons, Inc; 2006.
39. Delgado AV, Caballero FG, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science* 2007;309:194–224.
40. Nap R, Gong P, Szeifer I. Weak polyelectrolytes tethered to surfaces: effect of geometry, acid–base equilibrium and electrical permittivity. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* 2006;44:2638–62.
41. Massia SP, Hubbell JA. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin α _v β ₃-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *The Journal of Cell Biology* 1991;114:1089-100.
42. Garcia AM, Frank EH, Grimshaw PE, Grodzinsky AJ. Contributions of fluid convection and electrical migration to transport in cartilage: relevance to loading. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1996;333:317–25.
43. Grodzinsky AJ, Kamm RD, Lauffenburger DA. Quantitative aspects. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of Tissue Engineering*. 3 ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2007:251-61.
44. Shenoy V, Rosenblatt J. Diffusion of macromolecules in collagen and hyaluronic acid, rigid-rod-flexible polymer, composite matrices. *Macromolecules* 1995;28:8751-8.
45. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental Biology* 2010;341.
46. Thorsteinsdóttir S, Deries M, Cachaço AS, Bajanca F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Developmental Biology* 2011;354:191–207.

47. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Research* 1987;47:3039-51.
48. Amsden B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. *Macromolecules* 1998;31:8382-95.
49. Zhang Y, Amsden BG. Application of an obstruction-scaling model to diffusion of vitamin B12 and proteins in semidilute alginate solutions. *Macromolecules* 2006;39:1073-8.
50. Deen WM. Hindered transport of large macromolecules in liquid-filled pores. *AIChE Journal* 1987;33:1409-25.
51. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological Reviews* 2008;88:451–87.
52. Nitsche JM. Pore diffusion of nonspherical Brownian particles *Industrial & Engineering Chemical Research* 1995;34:3606-20.
53. Ramanujan S, Pluen A, McKee TD, Brown EB, Boucher Y, Jain RK. Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. *Biophysical Journal* 2002;83:1650–60.
54. Darwish MIM, Maarel JRCvd, Zitha PLJ. Ionic transport in polyelectrolyte gels: model and NMR investigations. *Macromolecules* 2004;37:2307-12.
55. Pujar NS, Zydney AL. Electrostatic and electrokinetic interactions during protein transport through narrow pore membranes *Industrial & Engineering Chemical Research* 1994;33:2473-82.
56. Dechadilok P, Deen WM. Electrostatic and electrokinetic effects on hindered diffusion in pores. *Journal of Membrane Science* 2009; 336: 7–16.
57. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007;446:1030-7.
58. Guillame-Gentil O, Semenov O, Roca AS, et al. Engineering the extracellular environment: strategies for building 2D and 3D cellular structures *Advanced Materials* 2010;22:5443–62.
59. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216-9.
60. Jha AK, Yang W, Kirn-Safran CB, Farach-Carson MC, Jia X. Perlecan domain I-conjugated, hyaluronic acid-based hydrogel particles for enhanced chondrogenic differentiation via BMP-2 release. *Biomaterials* 2009;30 6964–75.
61. Shin YM, Kim K-S, Lim YM, Nho YC, Shin H. Modulation of spreading, proliferation, and differentiation of human mesenchymal stem cells on gelatin-immobilized poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) substrates. *Biomacromolecules* 2008;9:1772–81.
62. Votteler M, Kluger PJ, Walles H, Schenke-Layland K. Stem cell microenvironments - unveiling the secret of how stem cell fate is defined. *Macromolecular Bioscience* 2010;10:1302–15.
63. Eastoe JE. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal* 1955;61:589-600.

64. Olsen BR. Matrix molecules and their ligands. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds. Principles of Tissue Engineering. 3 ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2007:101-15.
65. Aitken KJ, Bägli DJ. The bladder extracellular matrix. Part 1: architecture, development and disease. *Nature Reviews Urology* 2009;6:596-611.
66. Gatti G, Casu B, Hamer GK, Perlin AS. Studies on the conformation of heparin by H and C NMR spectroscopy. *Macromolecules* 1979;12:1001-7.
67. Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angewandte Chemie International Edition* 2002;41:390-412.
68. Harvima IT, Lappalainen K, Hirvonen M-R, et al. Heparin modulates the growth and adherence and augments the growth-inhibitory action of TNF- α on cultured human keratinocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;92:372-86.
69. Hsu JY, Hsu MY, Sorger T, Herlyn M, Levine EM. Heparin/endothelial cell growth supplement regulates matrix gene expression and prolongs life span of vascular smooth muscle cells through modulation of interleukin-1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1999;135:647-54.
70. Sasisekharan R, Venkataraman G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Current Opinion in Chemical Biology* 2000;4:626-31.
71. Guidry C, Grinnell F. Heparin modulates the organization of hydrated collagen gels and inhibits gel contraction by fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 1987;104:1097-103.
72. Xu X, Dai Y. Heparin: an intervenor in cell communication. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2010;14:175-80.
73. Dowd CJ, Cooney CL, Nugent MA. Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274:5236-44.
74. Mishra-Gorur K, John J, Castellot J. Heparin rapidly and selectively regulates protein tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology* 1999;178:205-15.
75. Stamov D, Grimmer M, Salchert K, Pompe T, Werner C. Heparin intercalation into reconstituted collagen I fibrils: impact on growth kinetics and morphology. *Biomaterials* 2008;29:1-14.
76. Nurcombe V, Kumarasuriyar A, Cool SM. The development of heparan sulfate sugars as therapeutics: versatility that couples stem cells, tissue engineering, and wound repair. *Drug Development Research* 2004;62:303-16.
77. Lundmark K, Tran PK, Kinsella MG, Clowes AW, Wight TN, Hedin U. Perlecan inhibits smooth muscle cell adhesion to fibronectin: role of heparan sulfate. *Journal of Cellular Physiology* 2001;188:67-74.
78. Cleland RL, Wang JL, Detweiler DM. Polyelectrolyte Properties of sodium hyaluronate 2. Potentiometric Titration of hyaluronic acid. *Macromolecules* 1982;15:386-95.
79. Laurent TC, Fraser JRE. Hyaluronan. *FASEB Journal* 1992;6:2397-404.

80. Nusgens BV. Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule? *Annales de Dermatologie* 2010;137:3-8.
81. Knudson CB. Hyaluronan and CD44: strategic players for cell–matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Research (Part C)* 2003;69:174–96
82. Kreger ST, Voytik-Harbin SL. Hyaluronan concentration within a 3D collagen matrix modulates matrix viscoelasticity, but not fibroblast response. *Matrix Biology* 2009;28:336–46.
83. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2001;12:79–87.
84. Weigel PH, Yik JHN. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;1572:341– 63.
85. Zheng L, Riehl TE, Stenson WF. Regulation of colonic epithelial repair in mice by toll-like receptors and hyaluronic acid. *Gastroenterology* 2009;137:2041–51.
86. Lee JY, Spicer AP. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology* 2000;12:581–6.
87. Karna E, Milyk W, Surazynski A, Pałka JA. Protective effect of hyaluronic acid on interleukin-1-induced deregulation of β 1-integrin and insulin-like growth factor-I receptor signaling and collagen biosynthesis in cultured human chondrocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2008;308:57–64.
88. Sheehana KM, DeLott LB, West RA, Bonnema JD, DeHeer DH. Hyaluronic acid of high molecular weight inhibits proliferation and induces cell death in U937 macrophage cells. *Life Sciences* 2004;75:3087–102.
89. Veranic P, Romih R, Jezernik K. What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *European Journal of Cell Biology* 2004;83:27-34.
90. Sugasi S, Lesbros Y, Bisson I, Zhang YY, Kucera P, Frey P. In vitro engineering of human stratified urothelium: analysis of its morphology and function. *The Journal of Urology* 2000;164:951–7.
91. Feil G, Maurer S, Nagele U, et al. Immunoreactivity of p63 in monolayered and in vitro stratified human urothelial cell cultures compared with native urothelial tissue. *European Urology* 2008;53:1066–73.
92. Kreft ME, Sterle M, Jezernik K. Distribution of junction - and differentiation - related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol* 2006;125:475–85.
93. Scrtven SD, Booth C, Thomas DFM, Trejdosiewicz LK, Southgate J. Reconstitution of human urothelium from monolayer cultures. *The Journal of Urology* 1997;158 1147-52.
94. Thangappan R, Kurzrock EA. Three clonal types of urothelium with different capacities for replication. *Cell Proliferation* 2009;42:770–9.
95. Mudge CS, Klumpp DJ. Induction of the urothelial differentiation program in the absence of stromal cues. *The Journal of Urology* 2005;174:380–5.

96. Becker C, Jakse G. Stem cells for regeneration of urological structures. *European Urology* 2007;51:1217–28.
97. Lai J-Y, Yoon CY, Yoo JJ, Wulf T, Atala A. Phenotypic and functional characterization of *in vivo* tissue engineered smooth muscle from normal and pathological bladders. *The Journal of Urology* 2002;168 1853–8.
98. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639–48.
99. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009;31:25-35.
100. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling* 2011;9:1-14.
101. Meirelles LdS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 2006;119:2204-13.
102. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001;7:211-28.
103. Vindigni V, Michelotto L, Lancerotto L, et al. Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. *Neurological Research* 2010;32:47-54.
104. Zhu W-d, Xu Y-m, Feng C, Fu Q, Song L-j, Cui L. Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. *World Journal of Urology* 2010;28:493–8.
105. Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous materials and their applications. *Annual Reviews of Materials Research* 2006;36:333–68.
106. Sisson K, Zhang C, Farach-Carson MC, Chase DB, Rabolt JF. Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability. *Biomacromolecules* 2009;10:1675-80.
107. Li J, He A, Zheng J, Han CC. Gelatin and gelatin hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions. *Biomacromolecules* 2006;7:2243 7.
108. Torres-Giner S, Gimeno-Alcañiz JV, Ocio MJ, Lagaron JM. Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods. *Applied Materials & Interfaces* 2009;1:218–23.
109. Kuijpers AJ, Engbers GHM, Krijgsveld J, Zaat SAJ, Dankert J, Feijen J. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 2000;11:225–43.
110. Lu P-L, Lai J-Y, Ma DH-K, Hsiue G-H. Carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels as cell sheet delivery vehicles: characterization and interaction with corneal endothelial cells. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 2008;19:1–18.
111. Powell HM, Boyce ST. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials* 2006;27:5821–7.

112. Wachem PBv, Plantinga JA, Wissink MJB, et al. In vivo biocompatibility of carbodiimide-crosslinked collagen matrices: effects of crosslink density, heparin immobilization, and bFGF loading. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001;55:368–78.
113. Lin FYH, Li D, Neumann AW. Effect of surface roughness on the dependence of contact angles on drop size *Journal of Colloid and Interface Science* 1993;159:86-95.
114. Kwok DY, Lam CNC, Li A, et al. Measuring and interpreting contact angles: a complex issue. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1998;142:219–35.
115. Mark JE. *Physical Properties of Polymers Handbook*. 2nd ed. New York: Springer; 2006.
116. Vilgis TA, Wilder J. Polyelectrolyte networks: elasticity, swelling, and the violation of the Flory-Rehner hypothesis. *Computational and Theoretical Polymer Science* 1998;8:61-73.
117. Yin D-W, Horkay F, Douglas JF, Pablo Jd. Molecular simulation of the swelling of polyelectrolyte gels by monovalent and divalent counterions. *The Journal of Chemical Physics* 2008;129.

ANEXO 1

ABSORÇÃO PBS - MATRIZES A0

	15 s	1 min	2 min	10 min	30 min	1 h	2 h	6 h	24 h	48 h
Amostra										
1	3,70	4,06	4,38	4,70	4,95	5,16	5,17	5,16	5,07	4,98
2	3,50	4,01	4,26	4,56	4,78	4,80	4,80	4,76	4,69	4,62
3	3,40	3,92	4,18	4,49	4,69	4,74	4,74	4,73	4,63	4,49
Média	3,53	4,00	4,27	4,58	4,81	4,90	4,90	4,88	4,80	4,70
DP	0,15	0,07	0,10	0,11	0,13	0,23	0,23	0,24	0,24	0,25

* DP (Desvio Padrão)

ABSORÇÃO PBS - MATRIZES H0

	15 s	1 min	2 min	10 min	30 min	1 h	2 h	6 h	24 h	48 h
Amostra										
1	1,71	2,57	2,78	3,32	3,56	3,62	3,63	3,62	3,49	3,46
2	1,96	2,78	3,04	3,75	3,97	4,01	4,01	4,00	3,90	3,83
3	1,76	2,56	2,79	3,39	3,67	3,76	3,76	3,76	3,66	3,59
Média	1,81	2,64	2,87	3,49	3,73	3,80	3,80	3,79	3,68	3,63
DP	0,13	0,12	0,15	0,23	0,21	0,20	0,19	0,19	0,21	0,19

* DP (Desvio Padrão)

ABSORÇÃO HEPTANO - MATRIZES A0

	1 min	10 min	30 min	1 h	2 h	6 h	24 h	48 h
Amostra								
1	0,38	0,45	0,46	0,46	0,49	0,59	0,61	0,61
2	0,29	0,30	0,32	0,34	0,39	0,41	0,44	0,44
3	0,37	0,39	0,39	0,43	0,47	0,57	0,59	0,59
Média	0,35	0,38	0,39	0,41	0,45	0,52	0,55	0,55
DP	0,05	0,08	0,07	0,06	0,05	0,11	0,09	0,09

* DP (Desvio Padrão)

ABSORÇÃO HEPTANO - MATRIZES H0

	1 min	10 min	30 min	1 h	2 h	6 h	24 h	48 h
Amostra								
1	0,26	0,28	0,31	0,32	0,37	0,41	0,41	0,41
2	0,38	0,40	0,39	0,43	0,48	0,58	0,59	0,59
3	0,35	0,36	0,38	0,40	0,42	0,54	0,56	0,56
Média	0,33	0,35	0,36	0,39	0,42	0,51	0,53	0,53
DP	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,09	0,10	0,10

* DP (Desvio Padrão)

ANEXO 2

ABSORÇÃO

Amostra	Tipo de Matriz			
	A0	AH	H0	HA
1	5,20	4,08	4,09	3,98
2	5,40	4,58	3,35	2,85
3	5,00	4,46	3,98	3,91
4	4,44	4,08	3,77	2,57
5	4,21	4,54	3,80	3,35
6	5,50	4,91	3,63	3,16
7	4,24	4,03	2,99	3,03
8	4,43	4,14	3,30	2,41
Média	4,80	4,35	3,61	3,15
DP	0,53	0,32	0,37	0,57

* DP (Desvio Padrão)

Comparações Múltiplas

Tukey HSD

Tipo de Matriz		Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1 A0	2 AH	,45000	,23062	,230	-,1797	1,0797
	3 H0	1,18875*	,23062	,000	,5591	1,8184
	4 HA	1,64500*	,23062	,000	1,0153	2,2747
2 AH	1 A0	-,45000	,23062	,230	-1,0797	,1797
	3 H0	,73875*	,23062	,017	,1091	1,3684
	4 HA	1,19500*	,23062	,000	,5653	1,8247
3 H0	1 A0	-1,18875*	,23062	,000	-1,8184	-,5591
	2 AH	-,73875*	,23062	,017	-1,3684	-,1091
	4 HA	,45625	,23062	,220	-,1734	1,0859
4 HA	1 A0	-1,64500*	,23062	,000	-2,2747	-1,0153
	2 AH	-1,19500*	,23062	,000	-1,8247	-,5653
	3 H0	-,45625	,23062	,220	-1,0859	,1734

* A diferença entre as médias é significativa ($p < 0,05$).

ANEXO 3

POROSIDADE

Amostra	Tipo de Matriz			
	A0	AH	H0	HA
1	0,42	0,40	0,57	0,52
2	0,44	0,53	0,55	0,43
3	0,48	0,58	0,51	0,41
4	0,63	0,50	0,53	0,44
5	0,56	0,59	0,46	0,45
6	0,63	0,41	0,48	0,62
7	0,53	0,56	0,58	0,54
8	0,42	0,63	0,44	0,46
Média	0,51	0,52	0,51	0,48
DP	0,08	0,08	0,05	0,07

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,008	3	,003	,455	,716
Within Groups	,156	28	,006		
Total	,164	31			

ESPESSURA (μm)

Amostra	Tipo de Matriz			
	A0	AH	H0	HA
1	76	74	89	87
2	71	81	85	69
3	86	77	77	73
4	77	66	75	95
5	83	80	74	82
6	73	87	78	88
7	79	76	71	76
8	90	93	82	80
Média	74,3	79,2	78,8	81,2
DP	6,5	8,2	6,0	8,5

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	202,125	3	67,375	1,225	,319
Within Groups	1539,750	28	54,991		
Total	1741,875	31			

ANEXO 4

POTENCIAL ZETA (mV)

Amostra	Tipo de Matriz			
	A0	AH	H0	HA
1	-10,66	-12,60	-8,85	-8,45
2	-7,89	-11,70	-9,84	-9,80
3	-15,60	-7,81	-8,37	-10,17
4	-11,40	-5,11	-4,85	-6,83
5	-11,20	-5,89	-3,82	-7,07
6	-9,36	-9,54	-5,27	-7,96
7	-8,61	-7,99	-3,13	-6,30
8	-13,00	-7,81	-5,06	-3,86
Média	-10,96	-8,55	-6,14	-7,55
DP	2,49	2,60	2,50	2,02

* DP (Desvio Padrão)

Comparações Múltiplas

Tukey HSD

Tipo de Matriz		Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1 A0	2 AH	-2,40875	1,21019	,216	-5,7129	,8954
	3 H0	-4,81625*	1,21019	,002	-8,1204	-1,5121
	4 HA	-3,41000*	1,21019	,041	-6,7142	-,1058
2 AH	1 A0	2,40875	1,21019	,216	-,8954	5,7129
	3 H0	-2,40750	1,21019	,216	-5,7117	,8967
	4 HA	-1,00125	1,21019	,841	-4,3054	2,3029
3 H0	1 A0	4,81625*	1,21019	,002	1,5121	8,1204
	2 AH	2,40750	1,21019	,216	-,8967	5,7117
	4 HA	1,40625	1,21019	,655	-1,8979	4,7104
4 HA	1 A0	3,41000*	1,21019	,041	,1058	6,7142
	2 AH	1,00125	1,21019	,841	-2,3029	4,3054
	3 H0	-1,40625	1,21019	,655	-4,7104	1,8979

* A diferença entre as médias é significativa ($p < 0,05$).

ANEXO 5

ÂNGULO DE CONTATO (°)

Amostra	Tipo de Matriz			
	A0	AH	H0	HA
1	62,5	62,7	78,3	75,6
2	63,5	65,2	81,3	64,8
3	60,6	71,7	81,4	73,9
4	64,5	65,9	75,8	68,6
5	68,5	62,2	75,4	71,3
6	55,7	65,7	65,1	60,8
7	68,4	66,8	74,8	66,7
8	65,3	64,1	69,7	76,6
Média	63	65	75	69
DP	4,1	2,9	5,5	5,5

* DP (Desvio Padrão)

Comparações Múltiplas

Tipo de Matriz	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
1 A0	2 AH	-1,912	2,350	,847	-8,33	4,50
	3 H0	-11,600*	2,350	,000	-18,02	-5,18
	4 HA	-6,162	2,350	,063	-12,58	,25
2 AH	1 A0	1,912	2,350	,847	-4,50	8,33
	3 H0	-9,688*	2,350	,002	-16,10	-3,27
	4 HA	-4,250	2,350	,291	-10,67	2,17
3 H0	1 A0	11,600*	2,350	,000	5,18	18,02
	2 AH	9,688*	2,350	,002	3,27	16,10
	4 HA	5,438	2,350	,119	-,98	11,85
4 HA	1 A0	6,162	2,350	,063	-,25	12,58
	2 AH	4,250	2,350	,291	-2,17	10,67
	3 H0	-5,438	2,350	,119	-11,85	,98

* A diferença entre as médias é significativa ($p < 0,05$).

ANEXO 6

RUGOSIDADE (μm)

Amostra	Tipo de Matriz			
	A0	AH	H0	HA
1	0,102	0,129	0,095	0,174
2	0,122	0,129	0,090	0,167
3	0,076	0,109	0,078	0,198
4	0,085	0,119	0,159	0,186
5	0,143	0,134	0,110	0,201
6	0,091	0,143	0,124	0,132
7	0,188	0,134	0,176	0,170
8	0,170	0,105	0,159	0,135
Média	0,122	0,125	0,123	0,170
DP	0,041	0,013	0,036	0,025

* DP (Desvio Padrão)

Comparações Múltiplas

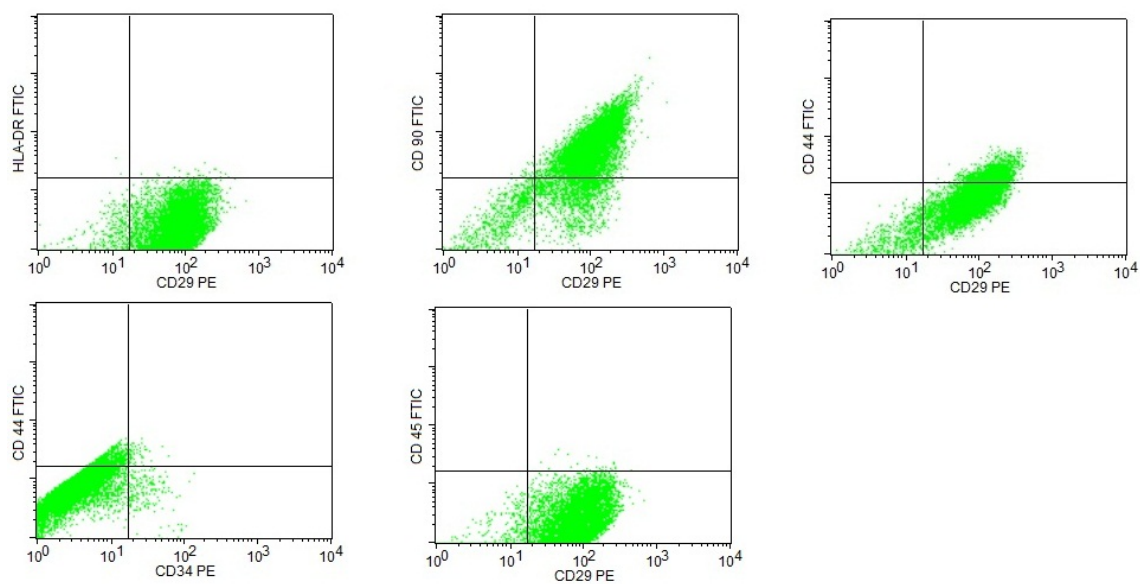
Gomez-Howell

Tipo de Matriz	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
1 A0	2 AH	-,003125	,015328	,997	-,05167	,04542
	3 H0	-,001750	,019553	1,000	-,05868	,05518
	4 HA	-,048250	,017238	,068	-,09958	,00308
2 AH	1 A0	,003125	,015328	,997	-,04542	,05167
	3 H0	,001375	,013805	1,000	-,04196	,04471
	4 HA	-,045125*	,010267	,006	-,07633	-,01392
3 H0	1 A0	,001750	,019553	1,000	-,05518	,05868
	2 AH	-,001375	,013805	1,000	-,04471	,04196
	4 HA	-,046500	,015900	,052	-,09339	,00039
4 HA	1 A0	,048250	,017238	,068	-,00308	,09958
	2 AH	,045125*	,010267	,006	,01392	,07633
	3 H0	,046500	,015900	,052	-,00039	,09339

* A diferença entre as médias é significativa ($p < 0,05$).

ANEXO 7

PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS ADSCs



As células vivas foram avaliadas para dois marcadores de superfície simultaneamente. Os anticorpos monoclonais utilizados foram: CD29, CD34, CD44, CD45, CD90 e HLA-DR.

ANEXO 8

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO:

Prezado(a) Sr(a).:

Estamos conduzindo um estudo com o objetivo de produzir mucosa urotelial (tecido que reveste o interior do sistema urinário) in vitro (em laboratório). Ele é baseado na semeadura de uma matriz polimérica com células provenientes dos órgãos que conduzem e armazenam a urina no nosso corpo (ureteres e bexiga). Como o(a) Sr(a). realizará uma cirurgia para remoção parcial ou total de um órgão urinário, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, será feita a coleta de uma amostra de tecido (cerca de 1 a 2 cm) do órgão que foi retirado. Tal procedimento, não acarretará em aumento do risco da sua cirurgia, visto que a amostra será obtida do órgão que foi removido. No caso da equipe médica que realiza a sua intervenção cirúrgica considerar que esse procedimento poderá prejudicar o diagnóstico de sua enfermidade ou o seu tratamento, a coleta não será feita (mesmo com a sua concordância prévia). Dessa amostra, serão retiradas as células usadas na tentativa de formar um novo tecido urinário em laboratório (**essas células não serão implantadas em outras pessoas**). Se o(a) Sr(a). concordar, armazenaremos os tecidos gerados em laboratório para que outras características possam ser analisadas posteriormente, em outros trabalhos do nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas pesquisas poderão auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para pacientes que sofreram perdas de partes do sistema urinário. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o seu tratamento atual.

O(A) Sr(a). é livre para decidir por participar ou não do estudo, e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição, se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de uma amostra do órgão retirado na cirurgia a que serei submetido(a) e do uso das células dela obtidas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e sobre a confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

ANEXO 9

ARTIGO:

Culture of urothelium and adipocyte-derived stem cells on temporary matrices: a preliminary study.

Joelson Tomedi^{1,4}, Nádyá Pesce da Silveira^{1*}, Annelise Ribeiro da Rosa², Patricia Pranke², Ilma Simoni Brum³, Milton Berger⁴, Brasil Silva Neto⁴.

¹*Chemistry Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,*

²*Pharmacy College, Stem Cell Research Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

³*Departament of Physiology, Laboratory of Endocrine and Tumoral Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

⁴*Departament of Surgery, Urology Division, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre*

Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre – Brazil

Telephone/FAX +55(51)33086291

** e-mail: nadya@iq.ufrgs.br*

This work was supported by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE protocol 09-408), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 474560/2010-4) and the Stem Cell Research Institute.

Abstract:

Purpose: Advances in culture techniques and production of temporary matrices have allowed the development of biological substitutes for injured urinary tissues. In this article, an approach to isolate urothelium and mesenchymal stem cells from urinary tissues is described. Moreover, their capacity to grow in temporary matrices prepared with natural biopolymers is investigated.

Materials and Methods: Four types of matrices were manufactured based on a mixture of gelatin and different combinations of heparin and hyaluronic acid. Adipocyte-derived stem cells and urothelium were isolated from urinary tissues and expanded in culture. Adipocyte-derived stem cells were characterized in order to confirm their multilineage potential. Each cellular type was seeded onto matrices and specimens were histologically analyzed after a predetermined period. Additionally, cytokeratin 7 expression by urothelial cells was tested.

Results: Both cellular types were expanded in primary cultures and they grew in our matrix model. Adipocyte-derived stem cells confirmed their multilineage potential in vitro. Urothelial cells maintained the cytokeratin 7 expression when cultured in matrices.

Conclusions: These data suggest that by using this strategy it might be feasible to build an ex vivo tissue in the future.

Keywords: tissue engineering, urinary tract, adult stem cells, urothelium.

Introduction:

Since the first reports on the successful engineered urothelial tissue implants in the end of the 20th century, there has been an increasing interest in using reconstructive therapies among urologists¹. In fact, the strategy of implanting a biological substitute, formed by a combination of autologous cells and temporary matrices, has been proving to be an effective way of restoring damaged urothelial tissue in animal models and humans²⁻⁶.

The concept of tissue engineering therapy is based on the fact that cells can generate a new functional tissue using pre-programmed genetic information, as long as they are placed in a supporting tridimensional matrix². The temporary matrix allows cells to survive, proliferate and reorganize the structure of a new tissue. However, the simple interposal of a cell-free matrix onto a urinary segment is related to deficient development of cellular layers and varied

degrees of matrix fibrosis and contraction⁴. Therefore, cells and matrix have to be integrated *in vitro* before implantation.

A successful approach in urologic tissue engineering involves isolation and culture of urothelium and smooth muscle cells for further combination in matrices⁴. Although differentiated cells have demonstrated the capacity to generate a functional stroma, there has been a growing interest in using mesenchymal stem cells for this purpose. It is currently thought that the stem cells' abilities for proliferation, self-renewal, immunomodulation and multilineage differentiation could endow tissues with a superior quality⁷⁻¹¹. Studies have shown that adipocyte-derived stem cells (ADSCs) are effective when used in urinary tract reconstruction. Notably, there is evidence that these cells can express markers of smooth muscle differentiation *in vitro* and develop a smooth muscle layer when implanted *in vivo*^{12, 13}.

Our research group has investigated the intrinsic capacity of mesenchymal stem-cells and urothelium to grow in natural biopolymer matrices. Here, the approach that we used to expand human cells isolated from urinary tissues is described. Also, the preliminary results of their interaction with manufactured matrices are shown.

Materials and Methods:

Cell isolation and culture: Samples of ureter with an area ranging from 1 to 3 cm² were obtained from nephrectomies where the urothelium did not present pathological conditions. At the same time, a small amount of periureteral and perirenal fat (about 5 mL) was collected. Patients provided written informed consent before surgery and the Internal Review Board from Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the study (Project 09-408).

The protocol published by Southgate et al¹⁴ was followed to perform the isolation and culture of urothelial cells. Briefly, the sample of ureter was cleaned to remove fat and debris before being transferred to a stripping solution (0.1% ethylenediaminetetraacetic acid). After detachment of the urothelium from the stroma, urothelial sheets were disaggregated in collagenase IV and seeded into culture flasks in keratinocyte serum-free medium supplemented with epidermal growth factor, bovine pituitary extract and 1% penicillin-streptomycin association (Invitrogen, Carlsbad, CA).

The process used to isolate adipose-derived stem cells was based on a modification of a previous protocol (Vindigni et al)¹⁵. The specimens of adipose tissue were trimmed and washed in phosphate-buffered saline (PBS) until complete elimination of blood and debris. They were then enzymatically dissolved in 0.05% collagenase I for 30 minutes at 37°C. The resultant suspension was centrifuged and the pellet was seeded into culture flasks. Culture was expanded with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1% of streptomycin-penicillin association. Cells were used for experiments when they reached the 4th passage.

Flow Cytometry analysis: A sample of mesenchymal cells was separated in order to carry on immunophenotypic characterization. The cells were suspended in PBS at 6×10^5 cells per tube and incubated for 30 minutes with the following human monoclonal antibodies: CD29/PE, CD34/PE, CD44/FITC, CD45/FITC, CD90/FITC and HLA-DR/FITC (PharMingen-BD Biosciences, San Diego, CA). The isotype mouse immunoglobulin G controls conjugated with phycoerythrin (PE) and fluorescein isothiocyanate (FITC) were used to determine the positivity of the samples. Only living cells were analyzed by excluding dead cells that were positive for 7-aminoactinomycin D (Invitrogen, Carlsbad, CA) at a final concentration of 1 mg/mL. Living cells were evaluated for two cell surface markers simultaneously using monoclonal antibodies listed previously. Cells were analyzed with a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences), and 10,000 events were analyzed using the CELLQuest software (BD Biosciences).

Differentiation Assays: Multilineage differentiation capacity of mesenchymal cells was investigated *in vitro*. Differentiation assays for adipocytes and osteoblasts were performed according to standard protocols in the laboratory (Meirelles et al)¹⁶. For adipogenic differentiation, the cells were cultured for 2 weeks in Iscove's modified Dulbecco's medium containing 20% human plasma, dexamethasone (10^{-7} M), insulin (2.5 μ g/mL), indomethacin (5 μ M) and heparin (10 units/mL). The cells were fixed and stained with Oil Red O. For osteogenic differentiation they were incubated for 4 weeks in DMEM supplemented with 10% FBS, dexamethasone (10^{-8} M), L-ascorbic acid-2-phosphate (5 μ g/mL) and β -glycerophosphate (10mM). The cells were stained with Alizarin Red S in order to detect deposits of calcium.

Matrix culture: According to their chemical composition, the scaffolds were divided in four types. Two groups were produced with a simple combination of gelatin - hyaluronic acid (A0) and gelatin - heparin (H0). In the third group, heparin was added to the surface of a gelatin -

hyaluronic acid matrix (AH). The same procedure was applied to the last group, where the surface of gelatin - heparin scaffold was treated with hyaluronic acid (HA).

Each cell type was seeded in the amount of 2.0×10^4 cells per matrix. Cells and scaffolds were incubated for 2 weeks in DMEM containing 5% FBS. After this period, matrices were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours and stained with hematoxylin and eosin (HE).

Western blotting: Samples of matrices incubated with urothelial cells were homogenized and protein extraction was performed using the RIPA (*Modified Radioimmunoprecipitation Buffer*) method. Determination of extracted protein quantities was made by Bradford assay. Proteins were denatured by Laemmli solution, fractionated on 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. Cytokeratin 7, a marker of urothelial differentiation, was detected with monoclonal cytokeratin 7 antibody (sc-53264, Santa Cruz Biotechnology) (diluted 1:100) and secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase.

Results:

Culture of urothelium: Urothelial cells exhibited sustained growth *in vitro* and they were kept in culture for up to three passages before their seeding onto matrices. Figure 1A shows the morphology of these cells in a primary culture. The manner in which these cells interacted with each scaffold and whether they maintained their differentiation was then examined. After two weeks of culture, HE stained paraffin sections of matrices showed that urothelial cells were able to form a single layer. In addition, signs of cellular migration inside the matrix were not identified (Figure 4A). The expression of cytokeratin 7 was detected in all four types of matrices (Figure 4B).

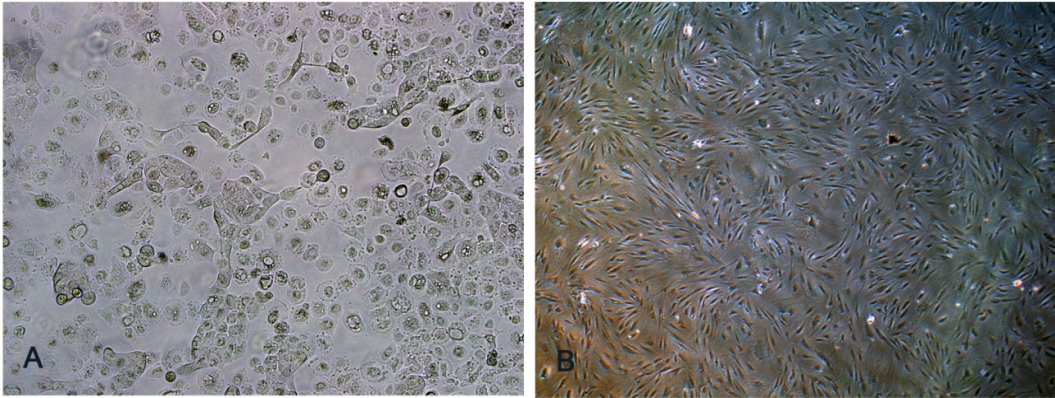


Figure 1. Morphology of primary cultures *in vitro*. Urothelial cells (100x) (A). ADSCs (40x) (B).

Culture of mesenchymal cells: The primary culture of mesenchymal cells derived from adipose tissue displayed a fibroblast-like morphology when observed under inverted microscopy (Figure 1B). After the 4th passage, flow cytometry analysis evidenced that the cells exhibited a positive expression of CD29 and CD90, weakly positive for CD44, and negative for CD34, CD45 and HLA-DR (Figure 2). The adipogenic differentiation potential of mesenchymal cells was confirmed by development of lipid drops stained by Oil Red. Mineralized areas stained by Alizarin Red demonstrated the osteogenic differentiation (Figure 3).

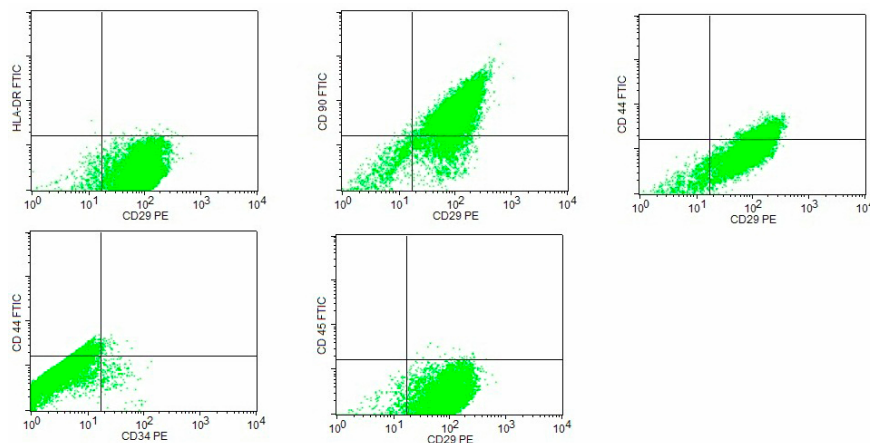


Figure 2. Immunophenotypic profile of ADSCs.

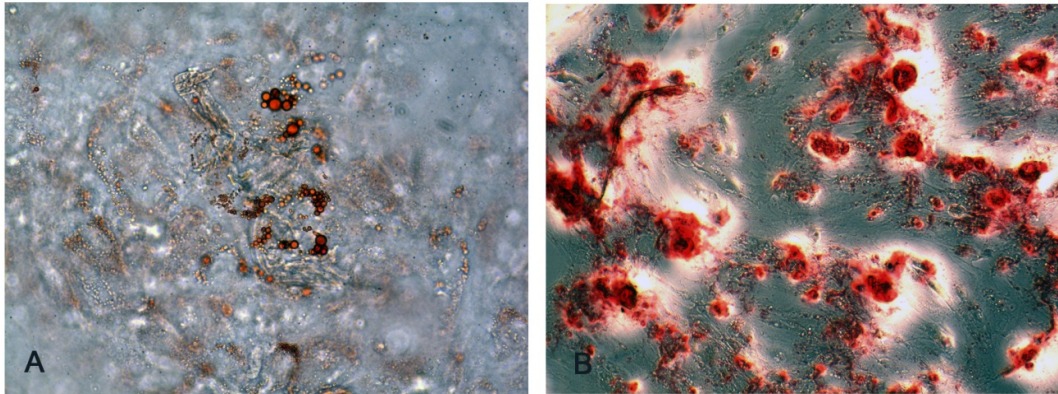


Figure 3. ADSCs demonstrate multilineage differentiation potential. Lipid vacuoles stained with Oil Red show adipogenic differentiation (100 X) (A). Calcium deposits stained with Alizarin Red show osteogenic differentiation (100 X) (B).

ADSCs cultured on matrices developed a multilayer arrangement. In a more detailed analysis, it is possible to identify two cellular morphologies growing simultaneously. Fusiform cells with elongated nuclei, which seem to dominate the basal layers, and cells with round nucleuses preferentially located on the surface (Figure 4C).

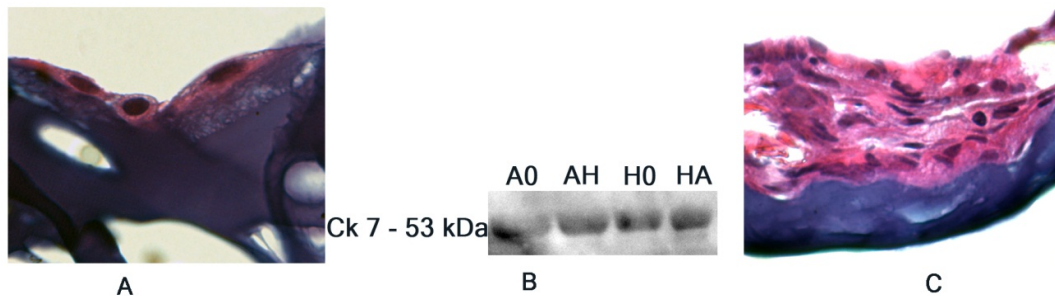


Figure 4. Cell-matrix interactions. Histological view of urothelial cells (1000x) (A). Analysis of cytokeratin 7 by Western blotting (B). Histological view of ADSCs (400x) (C).

Discussion:

The aim of this study was to describe a process which might be used to produce a urinary implant through tissue engineering. A substitute for a damaged urothelial segment must possess barrier attributes of urothelium and the mechanical properties of a muscular layer. Thus, it is essential to fully understand the techniques of harvesting and expansion of urothelial and mesenchymal cells to achieve success in this process.

As previously stated in other articles, primary culture is a reliable approach to achieve the required amounts of urothelial cells to matrix seeding^{14, 17, 18}. When cultured, these cells demonstrated a good proliferation rate with no signs of senescence in up to three passages. The choice of mesenchymal stem cells was based on the assumptions that their plasticity and higher resistance to senescence could create a more functional stroma. Because of its abundance and relative easiness to harvest, adipose tissue possesses the potential to originate large quantities of undifferentiated cells. In this work, ADSCs were isolated from a small quantity of fat which covers urinary organs.

Even though it is well-known that adipose tissue is a source of mesenchymal stem cells, it is necessary to characterize the cells in order to assure this state. According to the International Society for Cellular Therapy, there are criteria used to define mesenchymal stem cells^{8, 10, 19}. They have to exhibit adherence in standard culture conditions, express characteristic surface markers and show multipotential differentiation ability. The nonexistence of hematopoietic markers (CD34 and CD45), absence of HLA-DR, and the expression of CD29, CD44 and CD90 are all hallmarks of human mesenchymal stem cells. In addition, the successful induction of differentiation in adipocytes and osteoblasts confirms their multipotential nature.

Currently, there is an interest in creating scaffolds which can simulate certain properties of natural extracellular matrix in order to induce a specific cellular behavior. It is known that changes in extracellular matrix composition modify cellular activity during processes of tissue repair and embryogenesis^{20, 21}. Thus, the variation of glycosaminoglycan among matrices intended to expose cells to different environments so as to identify possible differences in tissue formation.

In this study, the analysis of cell-matrix interactions was only qualitative. Until now, there is insufficient data to determine if the matrix composition caused a significant change in

cellular function. However, it was observed that both cellular types were able to attach and grow in all scaffolds produced.

Urothelial cells were able to epithelize matrices, but they did not show any sign of stratification or cellular polarization. Mudge & Klumpp²² have already demonstrated that urothelium stratification *in vitro* demands a stroma or an inductive medium to be achieved. Even so, they maintained cytokeratin 7 expression, which is a mark of urothelial differentiation^{23, 24}. On the other hand, mesenchymal cells presented a different performance when cultured onto matrices. They formed a multilayer structure, in which two cellular types seem to grow together. Additional studies might define if this behavior is related to a matrix-induced differentiation.

Conclusions:

This study reports that human urothelial cells and ADSCs can be isolated from urinary tissues in a single procedure. The scaffolds promoted cellular adhesion and proliferation, although they could not ensure urothelium stratification. Although further work still needs to be done, these results indicate that this approach may be successful in future attempts to build a human tissue *ex vivo*.

References:

1. Atala, A.: Regenerative medicine and urology. *British Journal of Urology International*, **92**: 58, 2003
2. Atala, A.: Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system. *American Journal of Transplantation*, **4**: 58, 2004
3. Loai, Y., Yeager, H., Coz, C. et al.: Bladder tissue engineering: tissue regeneration and neovascularization of HA-VEGF-incorporated bladder acellular constructs in mouse and porcine animal models. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **94A**: 1205, 2010
4. Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J. J. et al.: De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology*, **17**: 149, 1999
5. Raya-Rivera, A., Esquiliano, D. R., Yoo, J. J. et al.: Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*, **377**: 1175, 2011
6. Sievert, K.-D., Amend, B., Stenzl, A.: Tissue engineering for the lower urinary tract: a review of a state of the art approach. *European Urology*, **52**: 1580, 2007

7. Becker, C., Jakse, G.: Stem cells for regeneration of urological structures. *European Urology*, **51**: 1217, 2007
8. Bydlowski, S. P., Debes, A. A., Maselli, L. M. F. et al.: Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **31**: 25, 2009
9. Cross, W. R., Thomas, D. F. M., Southgate, J.: Tissue engineering and stem cell research in urology. *British Journal of Urology International*, **92**: 165, 2003
10. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. et al.: Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, **9**: 1, 2011
11. Wagers, A. J., Weissman, I. L.: Plasticity of adult stem cells. *Cell*, **116**: 639, 2004
12. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H. et al.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, **7**: 211, 2001
13. Zhu, W., Xu, Y., Feng, C. et al.: Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. *World Journal of Urology* **28**: 493, 2010
14. Scrtven, S. D., Booth, C., Thomas, D. F. M. et al.: Reconstitution of human urothelium from monolayer cultures. *The Journal of Urology*, **158** 1147, 1997
15. Vindigni, V., Michelotto, L., Lancerotto, L. et al.: Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. *Neurological Research*, **32**: 47, 2010
16. Meirelles, L. d. S., Chagastelles, P. C., Nardi, N. B.: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, **119**: 2204, 2006
17. Feil, G., Maurer, S., Nagele, U. et al.: Immunoreactivity of p63 in monolayered and in vitro stratified human urothelial cell cultures compared with native urothelial tissue. *European Urology*, **53**: 1066, 2008
18. Sugasi, S., Lesbros, Y., Bisson, I. et al.: In vitro engineering of human stratified urothelium: analysis of its morphology and function. *The Journal of Urology*, **164**: 951, 2000
19. Dominici, M., Blanc, K. L., Mueller, I. et al.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**: 315, 2006
20. Hynes, R. O.: The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, **326**: 1216, 2009
21. Rozario, T., DeSimone, D. W.: The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental Biology*, **341**, 2010
22. Mudge, C. S., Klumpp, D. J.: Induction of the urothelial differentiation program in the absence of stromal cues. *The Journal of Urology*, **174**: 380, 2005
23. Kreft, M. E., Sterle, M., Jezernik, K.: Distribution of junction - and differentiation - related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol*, **125**: 475, 2006
24. Staack, A., Hayward, S. W., Baskin, L. S. et al.: Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation*, **73**: 121, 2005