



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

VITOR ANDRADE NASCIMENTO

Cultivo de células-tronco mesenquimais sobre substratos de PHBV-PCL: Análise do meio de cultura em FT-Raman.

Santo André

2019

VITOR ANDRADE NASCIMENTO

Cultivo de células-tronco mesenquimais sobre substratos de PHBV-PCL: Análise do meio de cultura em FT-Raman

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pelo Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC (UFABC) na área de Biologia Celular como requisito para obtenção do grau em bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr.

Santo André

2019

VITOR ANDRADE NASCIMENTO

Cultivo de células-tronco mesenquimais sobre substratos de PHBV-PCL: Análise do meio de cultura em FT-Raman.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pelo Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH) da Universidade Federal do ABC (UFABC) na área de Biologia Celular como requisito para obtenção do grau em bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Christiane B. Lombello
Universidade: Universidade Federal do ABC

Me. Thaís Souza
Universidade: Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. Renata Simões
Universidade: Universidade Federal do ABC

Santo André, 13 de Maio de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à minha mãe por todo apoio, carinho e compreensão nos bons e maus momentos. Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr., por cada ensinamento, palavra de apoio, por toda paciência e pelo acompanhamento constante em minha vida e trajetória acadêmica. Agradeço aos meus amigos, aos colegas e companheiros de graduação, que sempre estiveram presentes, me motivando e apoiando. Agradeço à banca examinadora pela disponibilidade e contribuição neste trabalho.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do ABC por todos os recursos disponíveis, necessários à concepção deste e de outros trabalhos desenvolvidos nela.

Sem o apoio de todos à minha volta, esta conquista não seria possível.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) possuem grande potencial para aplicação em procedimentos terapêuticos considerando-se a sua plasticidade para alterações biológicas em tecidos ou mesmo órgãos, contribuindo para a recuperação de funções afetadas ou perdidas. A capacidade de autorrenovação e diferenciação dessas células servem de esteio aos mais distintos procedimentos de engenharia tecidual e terapias autólogas. Dada a abrangência no emprego das CTMs, há necessidade de se compreender melhor as propriedades que permeiam fenômenos como a diferenciação osteogênica. Portanto, este projeto objetiva o desenvolvimento de uma metodologia de análise empregando-se a FT-Raman para identificação e quantificação de componentes bioquímicos e metabólicos presentes em meios de cultura condicionados por células-tronco mesenquimais, com ou sem indução à diferenciação osteogênica. Para a concepção dos meios de análise, as culturas celulares com sua diferenciação induzida, estabeleceram-se em arcabouços de polímeros biorreabsorvíveis: poli(hidroxi-butilato-co-hidroxi-valerato) (PHBV) e o poli (ε-caprolactona) (PCL). As amostras contendo os meios de cultura foram analisadas em FT-Raman para sondagem de grupos funcionais, bem como possíveis alterações moleculares associadas com a diferenciação e metabolismo celular. Foi possível discernir então grupos funcionais e moleculares específicos secretados no meio, como colesterol e fosfatidilinositol; triglicérides; forma Beta de polipeptídeos, além da expressão de DNA. Na presente avaliação, a FT-Raman apresentou-se como uma técnica de resolução limitada, uma vez que modos vibracionais de estiramento próximos ou mesmo iguais podem ser expressos por moléculas diferentes. Dificultando a análise. Houve variações nas leituras entre as amostras estudadas, concluindo-se que a FT-Raman não atendeu às expectativas nas condições estudadas.

Palavras-chave: biomateriais, regeneração tecidual, cultura de células, diferenciação celular, química analítica.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) have great potential for application in therapeutic procedures considering their plasticity for biological changes in tissues or even organs, contributing to the recovery of affected or lost functions. The self-renewal and differentiation capacity of these cells serve as a mainstay for the most different tissue engineering procedures and autologous therapies. Given the scope of employment of MSCs, there is a need to understand the properties better that permeate phenomena such as osteogenic differentiation. Therefore, this project aims the development of an analysis methodology using Raman Spectroscopy to identify and quantify biochemical and metabolic components present in culture media conditioned by mesenchymal stem cells, with or without induction of osteogenic differentiation. For the design of the analytical media, the cell cultures with their induced differentiation were established in bioresorbable polymer scaffolds: poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) and poly (ε-caprolactone) (PCL). The samples containing the culture media were analyzed in Raman Spectroscopy for probing functional groups, as well as possible molecular alterations associated with cell differentiation and metabolism. It was then possible to discern specific functional and molecular groups secreted in the medium, such as cholesterol and phosphatidylinositol; triglycerides; form of polypeptides, in addition to DNA expression. In the present evaluation, Raman Spectroscopy was presented as a limited resolution technique, since near or even equal vibrational modes of stretching can be expressed by different molecules. Difficult to analyze. There were variations in the readings between the studied samples, concluding that Raman spectroscopy didn't meet the expectations in the studied conditions.

Key words: biomaterials, tissue regeneration, cell culture, cell differentiation, analytical chemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mecanismos de Diferenciação	1
1.2. As células-tronco mesenquimais (CTMs)	6
1.3. Condições do cultivo e o metabolismo das CTMs	8
1.4. Polímeros	12
1.5. Espectroscopia Raman	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Preparação de Polímeros de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHVB) e Poli(caprolactona) (PCL)	14
3.2. Cultura Celular	15
3.3. Indução da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais	15
3.4. Análise do meio de cultura por Espectroscopia Raman	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Espectroscopia Raman	22
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

Regeneração trata-se da capacidade de renovação ou recomposição de tecidos, órgãos ou mesmo organismos após danos físicos consideráveis. Tal propriedade deve-se à aptidão multiplicativa – conforme a necessidade – das células não afetadas, bem como sua diferenciação, a fim de regenerar a parte lesionada.

Apesar de sua capacidade multiplicativa, a qual propicia a regeneração tecidual, bem como o reparo de lesões, as células possuem limitações quanto ao número de vezes que podem se multiplicar. Tal limitação acarreta em respostas teciduais não adequadas à lesão, ou mesmo em um reparo incompleto da parte lesionada (Hench, 1998; Wolpert, 2000; Stevens & Lowe, 2000; Junqueira & Carneiro, 2012; Santos Jr *et al.*, 2013), daí a busca por metodologias científicas que amenizem os problemas causados pela limitação multiplicativa das células (Hench, 1998; Wolpert, 2000; Stevens & Lowe, 2000; Cotran, 2000; Junqueira & Carneiro, 2012; Santos Jr *et al.*, 2013).

A ciência busca formas de driblar os problemas da ausência de regeneração ou mesmo de uma regeneração incompleta. Para isso, são pesquisados materiais e formas que contribuam na regeneração de áreas lesionadas, onde, apenas a proliferação celular (processo que origina novas células a partir da divisão de outras), já não surte efeito. Dentre as metodologias utilizadas atualmente, podemos citar a engenharia tecidual, a regeneração tecidual guiada e a terapia celular (Hench, 1998). Tais procedimentos, que possuem um grande nível de tecnologia associado a eles, dependem porém, do conhecimento sobre os mecanismos básicos de diferenciação celular, da resposta de células e tecidos a lesões, bem como da regeneração celular e tecidual propriamente dita.

1.1. Mecanismos de Diferenciação

Os seres humanos possuem uma limitada capacidade de regeneração, bem como restauração de seus tecidos e órgãos, sendo essas conseguidas através da ativação de células-tronco somáticas localizados em um nicho específico (como ocorre, por exemplo, com as células sanguíneas) ou através da indução de células diferenciadas à proliferação (como ocorre, por exemplo, no fígado). Por outro lado, algumas espécies de vertebrados têm grandes capacidades regenerativas que, em certos casos, se estendem a substituição dos membros completos. Ao estudar estes fenômenos regenerativos, começa-se a descobrir os mecanismos

celulares e moleculares que poderiam ser usados para desenvolver estratégias regenerativas para os seres humanos (Jopling *et al.*, 2011).

Para um melhor entendimento acerca do processo de regeneração celular, faz-se necessária a fundamentação de conceitos importantes à introdução do objeto em estudo. No caso, o processo de diferenciação celular, no qual ocorre a tomada de diferentes vias ao processo de expressão gênica em cada célula, o que mudará sua morfologia, alterando também sua interação no processo de manutenção da vida dos organismos aos quais constituem. A diferenciação celular direciona a atuação da célula em processos distintos, visto que *ocorre a especialização do trabalho realizado pela mesma*.

Ocorre também, de forma inversamente proporcional, a relação entre a potencialidade e diferenciação celular, sendo a primeira, *a capacidade de uma célula de gerar tipos celulares diferentes*. Entende-se assim, que quanto maior o grau de diferenciação de uma célula, menor será sua capacidade de originar outros tipos celulares (Cotran *et al.*, 2000; Junqueira & Carneiro, 2012).

Durante o processo de formação de um organismo, isto é, seu desenvolvimento embrionário inicial, ocorre o início da diferenciação celular, sendo essa precedida pela determinação do destino que cada célula terá no decorrer do desenvolvimento. A diferenciação – um processo de alterações auto-perpetuáveis de caráter interno – distinguirá as descendentes de cada célula, das demais. A determinação também pode ocorrer de forma simultânea à diferenciação (Cotran *et al.*, 2000; Santos Jr *et al.*, 2013).

A diferenciação ocorre mediante a interação das células com diferentes morfógenos, substâncias capazes de determinar a formação de estruturas orgânicas (Robey, 2000; Santos Jr *et al.*, 2013). Uma vez diferenciada, espera-se que o fenótipo adquirido seja estável. Todavia, em determinadas ocasiões, os padrões de diferenciação podem se alterar mesmo em células já diferenciadas, o que demonstra a possibilidade de reversão do estágio de diferenciação (Junqueira & Carneiro, 2012; Santos Jr *et al.*, 2013). Estes eventos podem ocorrer em dois processos distintos, sendo a *desdiferenciação* o processo onde ocorre a perda das características diferenciadas de uma célula, passível em processos de regeneração/reposição de membros, e a *transdiferenciação* onde ocorre a conversão de um tipo celular diferenciado em outro (Santos Jr *et al.*, 2013).

Como supracitado, o grau de diferenciação celular (sua especialização) é inversamente proporcional à sua capacidade de divisão e, conseqüentemente, à sua capacidade de originar outros tipos celulares. O que se deve ao fato de que várias substâncias, como os morfógenos, fatores de crescimento, hormônios, entre outras, serem capazes de alterar os níveis de proteínas como p27, p21 e p57, responsáveis pelo bloqueio do ciclo celular e entrada em G0 (fase em que não há estímulo à divisão celular). Tal alteração ocasiona redução da proliferação celular, bem como na diferenciação das mesmas (concomitante) (Robey, 2000; Santos Jr *et al.*, 2013).

Outro fator de grande relevância para o estudo da diferenciação celular é a relação desse processo com a Matriz Extracelular (MEC). A MEC pode ser definida como uma *rede de macromoléculas composta de proteínas fibrosas, proteoglicanos, glicoproteínas estruturais, proteínas não colagênicas e ácido hialurônico*. Vista inicialmente como uma estrutura de suporte, atualmente sabe-se que ela atua com veemência no comportamento da célula e também em sua diferenciação. Isso porque seus componentes lhe permitem a modulação da adesão e migração das células, além de propiciar a síntese de novos componentes de matriz e receptores para estes componentes. A migração e a adesão celular são importantes no processo de desenvolvimento, pois promovem o agrupamento de células com características semelhantes para compor os diferentes tecidos e órgãos. Além disso, o colágeno, componente mais abundante da MEC, serve como um organizador da agregação dessa mesma matriz durante a diferenciação de tecidos (Yannas & Ioannis, 2001; Santos Jr *et al.*, 2013).

A diferenciação celular pode ser induzida por sinais externos, os quais devem ser interpretados pela célula para que a diferenciação de fato ocorra. Isso acontece por meio da existência de receptores específicos para esses sinais externos. Resumidamente, a transdução dos sinais do meio extracelular tem início com a interação das células com as moléculas sinalizadoras (hormônios, fatores de crescimento, morfógenos, MEC) via receptores. Os processos subsequentes à interação conduzem às alterações na expressão gênica celular em resposta aos sinais externos – Diferenciação (Yannas & Ioannis, 2001; Junqueira & Carneiro, 2012; Santos Jr *et al.*, 2013).

Vista a importância da diferenciação para as funções celulares acerca da manutenção de um organismo, bem como seu funcionamento e formação, cabe inteirar-se sobre o processo de regeneração que – como citado anteriormente – trata-se da capacidade de recomposição e

renovação de partes mediante ao detrimento ou remodelagem de tecido somático (Wolpert, 2000; Cotran *et al.*, 2000).

Um dos mecanismos associados à regeneração natural é a desdiferenciação, que envolve uma célula terminalmente diferenciada voltando a uma fase menos diferenciada de sua própria linhagem. Este processo permite à célula proliferar-se novamente antes da rediferenciação, o que conduz à substituição destas células que foram perdidas (Jopling *et al.*, 2011).

Transdiferenciação é outro mecanismo natural que foi observado pela primeira vez na regeneração do cristalino do olho de salamandra há mais de 100 anos. Processo onde, como supracitado, ocorre a conversão de um tipo celular diferenciado em outro (Santos Jr *et al.*, 2013). Isso ocorre porque as células regridem a um ponto onde torna-se possível sua mudança de linhagem (Jopling *et al.*, 2011). Cabe ainda designar outro processo, no qual células diferenciadas reverterem sua pluripotência, a Reprogramação. A partir daqui, podem diferenciar-se para quase qualquer tipo de célula.

O processo de regeneração pode ser distinguido em dois tipos: *Morfalaxia* – a regeneração ocorre mediante a repadronização e delimitação de tecidos já existentes, ocorrendo pouco crescimento de tecidos novos – e *Epimorfose* – onde ocorre o crescimento de novas estruturas corretamente padronizadas (Wolpert, 2000; Cotran *et al.*, 2000).

A morfalaxia está presente no processo regenerativo de *Hydra*, ocorrendo de maneira dinâmica, onde há uma proliferação celular estável e contínua. À medida que os tecidos crescem, as células deslocam-se ao longo da coluna corporal. A *Hydra* adulta precisa perder células continuamente para manter seu tamanho, sendo que a perda de células ocorre nas extremidades dos tentáculos e no disco basal do broto do pé, e que a maior parte da produção excessiva de células é utilizada no brotamento assexuado de novas *Hydra* a partir da coluna corporal (Wolpert, 2000). Tal repadronização dinâmica das células ocorre através de mecanismos que conferem capacidade regenerativa à esse animal. A regeneração morfalática resulta em uma *Hydra* de menor tamanho, a qual alcançará o tamanho normal após se alimentar.

Em relação à epimorfose, como salientado anteriormente, ocorre a regeneração padronizada de novas estruturas, o que leva a refletirmos sobre o fato de células

completamente diferenciadas do membro maduro retornarem ao ciclo celular, desdiferenciando-se, para rediferenciarem-se no processo de regeneração, formando tipos celulares diferentes, ocorrendo a reestruturação do membro lesionado (Wolpert, 2000).

A regeneração epimórfica ocorre em anfíbios Urodelos, da ordem Caudata, os quais são os únicos vertebrados adultos capazes de regenerar seus membros. Spallanzani foi o primeiro a relatar tal fenômeno em 1768, a partir de observações provindas da regeneração em membros de salamandras, juntamente com outros exemplos de regeneração em Urodelos. A capacidade de regenerar grandes secções do plano corporal é difundida em meio à filogenia dos metazoários, sendo que a descoberta dessa capacidade era um aspecto importante do surgimento da biologia experimental, no século XVIII (Wolpert, 2000).

A plasticidade de diferenciação celular - capacidade de diferenciar-se em células de funcionalidades distintas entre si – proporciona um ensaio celular conveniente para a comparação de uma célula diferenciada em Urodelos com a sua congênera em mamíferos. É importante reconhecer que existem exemplos de regeneração em mamíferos que envolvem plasticidade. Por exemplo, a regeneração do fígado parece ser comparável à regeneração cardíaca em salamandras em que os hepatócitos dividem-se sem perda da função diferenciada. A regeneração dos nervos periféricos mielinizados requer que células de Schwann dividam-se e percam a expressão da mielina antes de rediferenciarem-se em conjunto com o axônio de regeneração (Brockes & Kumar, 2002). Em relação aos mamíferos, apesar de sua incapacidade de regenerar membros completos, muitos, incluindo crianças pequenas, têm a capacidade de regenerar as extremidades de seus dígitos (Wolpert, 2000).

Atualmente, o método principal para a medicina regenerativa é o isolamento de células-tronco adequadas, seguido por manipulações que visam dirigir a diferenciação no sentido da morfogênese de estruturas complexas. Embora isso atraia considerável interesse no presente, muitas das aplicações são suficientemente problemáticas para justificar a consideração de abordagens alternativas e complementares. A estratégia em Urodelos – a reespecificação limitada de células diferenciadas residuais – é tão bem sucedida que seria surpreendente se não fosse eventualmente julgada como uma abordagem terapêutica em alguns contextos de regeneração em mamíferos. (Brockes & Kumar, 2002).

1.2. As células-tronco mesenquimais (CTMs)

As células-tronco (CT) podem ser classificadas segundo sua potencialidade em toti, pluri multi ou unipotentes. São denominadas totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero; as pluripotentes podem originar todas as células que formam um embrião (propriamente dito) e são provenientes da massa interna do blastocisto (CT embrionárias); são classificadas como multipotentes as células que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, as CT mesenquimais (CTMs) e neurais (Schwindt *et al.*, 2005). Existem ainda células oligopotentes, capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem do que as multipotentes, e as unipotentes que originam apenas um único tipo celular maduro (Wagers & Weissman, 2004). Estas duas últimas são consideradas por alguns autores células progenitoras e não células-tronco (Schwindt *et al.*, 2005).

De todas as linhagens de células-tronco somáticas estudadas até o presente momento, as CTMs apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodérmicos, como o tecido muscular, conjuntivo, cartilaginoso, ósseo, entre outros e não mesodérmicos, como componentes do sistema nervoso (Meirelles *et al.*, 2006).

As características imunomoduladoras e imunossupressoras presentes em CTMs ampliam as possibilidades de sua utilização em terapias. As CTMs secretam grande variedade de citocinas pró e antiinflamatórias além de fatores de crescimento. Tais moléculas bioativas promovem a modulação da resposta inflamatória, o restabelecimento do suprimento vascular e a reparação adequada do tecido, contribuindo para a homeostase tecidual e imunológica sob condições fisiológicas. Podem também induzir a secreção de outros fatores solúveis em outras células do tecido para estímulo à diferenciação destas células (ainda indiferenciadas), contribuindo ao processo de reparação (Monteiro, 2010).

Atualmente, procedimentos terapêuticos com CTMs possuem um grande potencial para alterações biológicas em um tecido ou órgão alvo, melhorando e recuperando funções afetadas ou perdidas (Mimeault *et al.*, 2006). Elas são caracterizadas como multipotentes e têm contribuído significativamente para a engenharia de tecidos devido a sua capacidade de auto renovação, diferenciação e potencial de uso em terapias autólogas (Gondara *et al.*, 2008). Células multipotentes são encontradas em uma grande variedade de procedências como medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária e cordão umbilical (Machado & Santos Jr, 2013).

As células-tronco adultas são classificadas como multipotentes pois diferenciam-se em células do tecido de onde derivam. As CTMs se diferenciam em número limitado de células especializadas (Zago & Covas, 2007), mas não se restringem em formar células apenas do tecido do qual se originam. Elas podem se diferenciar em células de outros tecidos, ósseas, cartilaginosas e adiposas, característica que as tornam muito especiais para a engenharia de tecidos (Machado & Santos Jr, 2013). No entanto, os mecanismos que modulam a diferenciação das células-tronco ainda são passíveis de esclarecimento. Sabe-se que o contato entre as células e o microambiente molecular onde elas estão inseridas tem grande papel nesse processo.

Pesquisadores tiveram grande progresso acerca do controle de diferenciação e proliferação *in vitro* e também no isolamento destas células de diferentes fontes (Lechner & Huss, 2006). CTMs da medula óssea tem importante potencial de diferenciação e facilidade para isolamento e cultivo (Cardoso & Arruda, 2009). Contudo estudos recentes comprovam que estas células podem ser obtidas de tecido adiposo, sendo extraídas por processo lipoaspirativo, uma grande vantagem em relação ao processo de obtenção pela medula óssea que causa extrema dor ao paciente (Hicok *et al.*, 2004).

In vitro, em cultivo adequado, exibem morfologia semelhante a células fibroblásticas e se aderem bem a substratos plásticos, podendo ser expandidas diversas vezes mantendo seu padrão de diferenciação (Meirelles, 2006). Contudo, o seu uso clínico não se faz mais aconselhável quando expandidas por mais de 40 gerações (Deans & Moseley, 2000). Trabalhos envolvendo CTMs aplicadas à terapia celular crescem a cada ano e seus resultados apontam para o uso em potencial dessas células, o que gera grandes expectativas no que diz respeito ao reparo de lesões ósseas, por exemplo (Del Carlo *et al.*, 2009).

Durante o processo de diferenciação das células osteoprogenitoras, que são células com um maior nível de determinação que as células-tronco, a expressão de colágeno I, fosfatase alcalina, osteonectina, sialoproteína óssea, osteocalcina e osteopontina é identificada como um marcador do estágio de diferenciação osteogênica (Liu *et al.*, 2003).

As CTMs podem ser isoladas por distintos métodos, sendo o mais frequente um gradiente de densidade para obtenção de células mononucleares. As células mononucleares isoladas são cultivadas com meio contendo soro fetal, sendo que as CTMs aderem ao plástico. Algumas células da linhagem hematopoética também podem aderir, no entanto, dadas as

várias trocas do meio de cultura, essas células são removidas. Portanto, enquanto este procedimento elimina a maior parte das células contaminantes, a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente com as diversas passagens e, após determinado número delas, a cultura torna-se enriquecida pela fração que se auto-renova, as CTMs. Estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, perfazendo a necessidade de várias passagens sucessivas para obtenção de grandes quantidades de CTMs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares. Todavia, se mais passagens são necessárias, pode haver alteração da qualidade das CTMs. Tais alterações são mais recorrentes quando se utiliza material de origem adulta do que as células derivadas de crianças (Bydlowski *et al.*, 2009).

Atualmente, vislumbra-se, graças aos constantes avanços em pesquisa e estudos clínicos, o transplante de CTMs como terapia a distintas doenças humanas. Todavia, dada a baixa porcentagem de CTMs em indivíduos adultos, faz-se necessário a expansão destas para abordagens regenerativas e imunoterápicas junto a uma necessária padronização de condições de culturas para otimizar a comparação de resultados em casos de emprego de CTMs (Sotiropoulou *et al.*, 2006).

Distintos métodos têm sido propostos para avaliar a qualidade de CTMs para emprego em protocolos clínicos, variando desde os simples ensaios de formação de “colônias” (Digirolamo *et al.*, 1999) até caracterizações complexas de morfologia (Colter *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004). Contudo, acerca da expansão concomitante à manutenção da capacidade das CTMs se diferenciarem em múltiplas linhagens, não há uma abordagem consensual (Sotiropoulou *et al.*, 2006). Diante disso, estudos acerca de condições adequadas de cultivo, bem como de protocolos de expansão e indução à diferenciação são necessários. As condições de cultivo adequadas são de extrema importância para obtenção de linhagens viáveis à aplicações nos mais diversos estudos e terapias.

1.3. Condições do cultivo e o metabolismo das CTMs

Recentes estudos investigaram os efeitos de isquemia e seus componentes (hipóxia e depleção de glicose) na viabilidade e multipotência das CTMs, demonstrando que estas têm maior capacidade de sobrevivência sob tal condição (isquemia) se comparadas aos cardiomiócitos (Mylotte *et al.*, 2008). Evidências obtidas por análise de alterações na

morfologia celular, a atividade da caspase e exposição a fosfatidilserina. Os mesmos estudos constataram também que as CTMs são resistentes à determinados períodos de hipóxia (O_2 a 0,5%), bem como a inibição da respiração mitocondrial com 2,4- dinitrofenol durante 72 horas. Tal resistência provém do emprego de glicólise ao invés de respiração mitocondrial, um indicativo de que, na ausência de oxigênio, CTMs mantêm-se dada a produção de ATP anaeróbio (Mylotte *et al.*, 2008).

Em relação à privação de glicose (meio livre de glicose com combinação de 2-desoxiglicose), houve morte rápida de CTMs. Depleção de ATP celular ocorreu a uma taxa inferior durante a privação de glicose do que durante a isquemia, o que sugere que a glicólise possui uma função que independe da produção de energia em CTMs (Mylotte *et al.*, 2008).

Após a exposição a condições hipóxicas ou isquêmicas, as CTMs mantiveram sua capacidade de diferenciar-se em condrócitos e adipócitos mantendo também seu potencial cardiomiogênico. Tais resultados sugerem que as CTMs são caracterizadas pela flexibilidade metabólica, o que lhes permite sobreviver sob condições de estresse isquêmico sem a perda de seu fenótipo multipotente. Estas características importantes de CTMs podem ter uma importância considerável no aprimoramento de terapias com células-tronco em doenças cardíacas (Mylotte *et al.*, 2008).

Os estudos que analisam o metabolismo energético durante a proliferação e diferenciação de CTMs centraram-se principalmente no consumo de glicose e produção de lactato (Wang *et al.*, 2005; Follmar *et al.*, 2006; Grayson *et al.*, 2006; Mischen *et al.*, 2008). CTMs produzem lactato dado consumo de glicose sob condições de normóxia. A produção de lactato sob normóxia, denominado “efeito Warburg”, pode ser observado por outros tipos celulares sob condições de hipóxia, *in vivo*, tais como condrócitos e células tumorais (Krebs, 1972; Rajpurohit *et al.*, 1996). As CTMs aumentam sua taxa de glicólise sob condições de hipóxia, “efeito Pasteur”. (Krebs, 1972; Wang *et al.*, 2005; Grayson *et al.*, 2006; Mischen *et al.*, 2008).

Embora haja poucos dados referentes ao metabolismo energético de CTMs em processo de diferenciação, dados sobre o fenótipo de células maduras são encontrados com maior descrição. Os condrócitos apresentam elevado nível de glicólise com o mínimo consumo de oxigênio (Rajpurohit *et al.*, 1996; Heywood & Lee, 2008). Todavia, a expansão de condrócitos resulta no aumento do consumo de oxigênio, relacionado com a fosforilação

oxidativa (Domm *et al.*, 2002, 2004; Malda *et al.*, 2004; Heywood & Lee, 2008). Os osteoblastos têm significativamente maiores consumo de oxigênio do que os condrócitos, apresentando metabolismo misto, utilizando tanto da glicólise como da fosforilação oxidativa para produção de ATP mediante cultura sob normóxia, isto é, níveis normais de oxigênio (Borle *et al.*, 1960; Smith *et al.*, 1973; Komarova *et al.*, 2000).

A expansão *ex vivo* de CTMs para aplicações clínicas perfaz um processo custoso, sendo que, o período de tempo para alcançar um número relevante de células varia entre 3 e 5 semanas, o que, dada perspectiva de terapia celular, trata-se de um longo período, vista urgência em obtenção de células. A otimização do processo de expansão deve então considerar tais aspectos e focar na maximização do rendimento celular, reduzindo o tempo de cultura de células, o que irá como resultado reduzir os custos totais do processo (Kirouac & Zandstra, 2008).

CTMs expandidas sob hipóxia apresentam níveis significativamente mais elevados de expansão ao longo do tempo em cultura se comparadas com células cultivadas sob condições de normóxia. Verificou-se que, após três passagens, CTMs expandidas sob hipóxia apresentam encurtamento maior de comprimento dos telômeros, que foi certamente relacionado com a proliferação maior observada a esta tensão de oxigênio (Bonab *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Embora a redução do comprimento de telômeros seja normalmente associado com a senescência celular (Baxter *et al.*, 2004), a falta de estudos correlacionando a atividade *in vivo* dos telômeros de CTMs, não permite determinar se o desempenho terapêutico dessas células seria afetado (Santos *et al.*, 2010).

A expansão de CTMs humanas sob um ambiente de baixa tensão de oxigênio melhorou significativamente, em estudos de Santos *et al.* (2010), a proliferação de células, por aceleração do processo de divisão celular, enquanto aumenta o metabolismo e sua eficiência. As CTMs expandidas mantiveram a sua capacidade clonogênica e perfil imunofenotípico, além do potencial de diferenciação. Tais constatações reafirmam a premissa de que a cultura sob hipóxia pode, rapidamente e facilmente, ser transposta para um processo de expansão em escala clínica a fim de maximizar o rendimento de CTMs e, ao mesmo tempo, reduzir o tempo de cultura de células mantendo a qualidade do produto (Santos *et al.*, 2010).

Como já ressaltado, a maioria das aplicações terapêuticas de CTMs requerem a expansão destas. Estudos recentes utilizaram de CTMs provindas de humanos, caprinos e

ratos sob a ótica de distintos fatores de expansão (inibidores de crescimento, metabolismo e crescimento), visando estabelecer as melhores condições para expansão de maneira segura e eficiente (Schop *et al.*, 2009).

De uma forma geral, para a cultura de células, glicose e glutamina são os mais importantes nutrientes para a produção de energia, por parte das células (adenosina 5'-trifosfato, ATP), energia essa necessária ao seu crescimento e manutenção. A glicose, fonte primária de ATP para células de mamífero, é utilizada por fosforilação oxidativa ou por glicólise. Tanto o consumo de glicose como a produção de lactato, indica uma rota metabólica utilizada pelas células para a produção de energia a partir da glicose (Glacken, 1988; Ljuggren & Häggström, 1994). Além de um constituinte proteico (através de biossíntese), a glutamina é também uma importante fonte de energia para a cultura de células de mamíferos, sendo metabolicamente desaminada ao glutamato, este é então convertido a α -cetoglutarato, pela via de transaminação alanina ou pela via de desaminação usando glutamato desidrogenase (GDH), produzindo um adicional de amônia (NH_3). α -cetoglutarato é então convertido em piruvato (Schop *et al.*, 2009).

A conversão de glutamina em piruvato é chamada de glutaminólise. O piruvato pode ser convertido em lactato ou alanina ou ser completamente decomposto no ciclo cítrico. A glutaminólise pode ser uma fonte de energia eficiente ou ineficiente (Schop *et al.*, 2009).

Como as células consomem glicose e glutamina para produzir energia, elas produzem dois metabólitos tóxicos: lactato e NH_3 , que podem inibir seu crescimento (Hassell *et al.*, 1991), resultado da ruptura de gradientes eletroquímicos de pH que afetam todo o transporte de membrana (Jessup *et al.*, 1984; Schneider & Morison, 1996; Schop *et al.*, 2009). O acúmulo de lactato pode baixar o pH do meio, inibindo, posteriormente, o crescimento celular (Schneider & Morison, 1996). A NH_3 não ionizada pode difundir-se facilmente através da membrana plasmática, bem como da membrana interna das organelas, aumentando o pH dos compartimentos intracelulares (Schneider & Morison, 1996).

CTMs de cabras cresceram – de acordo com os estudos utilizando de inibidores de crescimento, metabolismo e crescimento – significativamente mais rápido do que as CTMs de rato e humanos, as quais utilizam glicose para a produção de energia celular provinda principalmente de glicólise, uma via dita ineficiente. CTMs de cabras também utilizam de

glicose para produção de energia, provinda principalmente da fosforilação oxidativa, uma via eficiente (Schop *et al.*, 2009).

A glutamina não se mostrou uma importante fonte de energia para as três espécies testadas. Finalmente, variações entre as concentrações de inibidores de crescimento foram observadas para lactato e NH_3 entre as três espécies. CTMs de ratos são mais sensíveis a lactato e NH_3 do que CTMs de humanos e cabras. O aumento da taxa de expansão foi obtido com a elevação do nível de lactato. Após o cultivo de células com concentrações de lactato e NH_3 , as CTMs humanas mantiveram seu potencial de diferenciação *in vitro*. Tais resultados servem de esteio a melhoria no processo de expansão de CTMs em biorreatores, fundamentais a redução no tempo de produção e posterior utilização em terapias celulares (Schop *et al.*, 2009).

1.4. Polímeros

Os distintos biomateriais poliméricos podem ser empregados como suporte de fontes celulares para a regeneração óssea, dada sua interação com a interface dos fragmentos receptores e estímulo ao processo de restauração tecidual podendo atuar, também, como substitutos ósseos eficazes (Hench, 1998; Atala, 2009).

Os polímeros de interesse biológico e biomédico podem ser classificados como biodegradáveis e biorreabsorvíveis (Vert *et al.*, 2012). Os biorreabsorvíveis são aqueles eliminados do organismo por vias naturais assim como os subprodutos que podem ser gerados, sem que haja danos colaterais (Barbanti *et al.*, 2005; Santos Jr, 2010).

Na engenharia de tecido ósseo pode-se empregar o poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), um termoplástico natural produzido por bactérias e amplamente utilizado como implante para reparo de pequenas fraturas ósseas e lesões na medula espinhal, apresentando boa biocompatibilidade e sendo eliminado *in vivo* através da ação de D-3 hidroxibutirato, um ácido presente no sangue humano (Sultana & Wang, 2012). Estudos outrora realizados avaliaram o comportamento de CTMs sobre fibras de PHBV, obtendo resultados positivos quanto a viabilidade a celular (Lu *et al.*, 2012)

Outro polímero fortemente empregado é o poli (ε-caprolactona) (PCL). Um poliéster que apresenta degradação por hidrólise em valores de pH fisiológico, boa compatibilidade com tecidos humanos e fácil processamento. (Casarin *et al.*, 2011; Ma, 2004).

Com o objetivo de complementar as funções e características dos polímeros para otimizar sua utilização na engenharia tecidual, podem-se constituir blendas. As propriedades do PHBV e do PCL podem se complementar, por exemplo (Casarin *et al.*, 2011).

Em nosso projeto, utilizamos dos polímeros supracitados – isolados e em blendas – em sua forma densa e porosa para a realização dos estudos de citotoxicidade e viabilidade das CTMs analisadas.

1.5. FT-Raman

A FT-Raman é uma técnica espectroscópica vibracional que pode ser usada para sondar opticamente as alterações moleculares associadas aos tecidos alterados (Short *et al.*, 2006). O método foi descrito pela primeira vez em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, que recebeu o Prêmio Nobel dois anos depois por seu trabalho (Singh, Riess, 1998). Os espectros Raman mostram a intensidade dispersa como uma função da diferença de energia entre os fótons incidentes e dispersos, que são obtidos por um feixe de laser monocromático que incide em uma amostra. A perda (ou ganho) nas energias de fótons corresponde à diferença nos níveis de energia vibracional final e inicial das moléculas participantes da interação. Os espectros resultantes são caracterizados por mudanças no número de onda (inverso do comprimento de onda em cm^{-1}) da frequência incidente. A diferença de frequência entre a luz incidente e a espalhada por Raman é denominada mudança Raman, que é única para moléculas individuais. Os modos vibracionais Raman são espectralmente estreitos e, em muitos casos, podem ser associados à vibração de uma ligação química particular (ou a um único grupo funcional) na molécula específica (Choo-Smith *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2015).

Existe na literatura um grande número de pesquisadores que relataram o uso da FT-Raman de tecidos biológicos, que incluem investigações em ossos, córnea, tecidos cervicais, tecido epitelial, pulmão, mama, pele, tecido gastrointestinal, cérebro, tecido oral, fígado, grupo heme de proteína, placa aterosclerótica, soro, artérias coronárias humanas, linfócitos, eritrócitos humanos, células cancerígenas. Também existem relatos em bactérias da flora humana. Também há descrição em moléculas como DNA e drogas anticâncer (revisado em Movasaghi *et al.*, 2007).

Os objetivos de se empregar a FT-Raman são, de uma forma geral, a identificação de diferenças espectrais entre tecidos biológicos normais e patológicos além da quantificação de componentes bioquímicos e metabólicos presentes em amostras de fluidos biológicos (Naumann, 2001; Raniero *et al.*, 2011; Silveira Júnior, 2001; Choo-smith *et al.*, 2002). Esta técnica foi empregada no presente projeto para analisar os constituintes moleculares e estruturais de amostras, cujo espectro consiste em uma série de picos ou bandas, correspondendo cada um ao modo vibracional característico de uma molécula, por exemplo (Movasaghi, 2007).

Neste trabalho, além das células-tronco que cresceram sobre placas, analisou-se também o meio de cultura das células que cresceram sobre polímeros de PHBV, PCL e sua blenda na proporção 75:25. Todos os polímeros nas formas densas e porosas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo a avaliação de uma metodologia de análise empregando-se a FT-Raman para identificação e quantificação de componentes bioquímicos e metabólicos presentes em meios de cultura condicionados por células-tronco mesenquimais, com ou sem indução à diferenciação osteogênica. Objetiva-se também a identificação e quantificação de biomoléculas expressas em meios de cultura nos polímeros puros de PHBV e de PCL, bem como em blends PHBV/PCL na concentração de 75/25, além da identificação de moléculas e/ou grupos funcionais que estejam associados ao metabolismo e/ou diferenciação celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação de Polímeros de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHVB) e Poli(caprolactona) (PCL)

Os materiais foram produzidos no Centro de Engenharia e Ciências Sociais Aplicadas (CECS), da UFABC, sob a orientação da Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge. Foram utilizados polímeros composto de poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHVB, 12% wt Aldrich 403121-100G) com 12% de valerato e policaprolactona (PCL, Aldrich 440744-250G,

Mn 70000-90000) tipo CAPA 6500 com massa molar reportada de 50.000 g/mol. Os materiais foram dissolvidos em clorofórmio 5% p/p (Vetec Química) e seguidamente foram colocados em placa de Petri para evaporação do solvente. Para criar os poros das membranas porosas o agente porogênico utilizado foi cloreto de sódio (NaCl) peneirado que foi acrescentado na solução de clorofórmio. As soluções foram vertidas em Placas de Petri e deixadas na capela para evaporação do clorofórmio, após a evaporação completa do mesmo as membranas densas foram armazenadas em um dessecador sob vácuo e as membranas porosas foram colocadas em água destilada para a lavagem do sal. Após 24 horas imersas em água, as membranas porosas foram colocadas em álcool 95% para desidratação. As amostras foram então colocadas novamente em capela para evaporação e finalmente armazenadas em dessecador. Foram produzidos polímeros puros e blendas PHBV/PCL na concentração de 75/25. Os testes adotados neste estudo são recomendados pela *American Society for Testing and Material* (ASTM) F813-83 como padrão para avaliação de biomateriais de acordo com normas internacionais vigentes (ISO-10993, 1997; NBR-ISO10993,1999). Os polímeros foram esterilizados em álcool 70% por 16 horas em temperatura ambiente.

3.2. Cultura Celular

Utilizou-se da linhagem de células-tronco mesenquimais (GIBCO® *Rat (SD) MesenchymalStemCells*), isoladas a partir de medula óssea de ratos SpragueDawley. A linhagem foi adquirida do laboratório Invitrogen (Life Technologies, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas a 37° C em estufa com 5% de CO₂, em meio de cultura DMEM (com baixa concentração de glicose) com GlutaMAX™-I e 10% de soro fetal bovino (Gibco Life Technologies Corporation, USA). Fez-se a troca de meio sempre que houve acidificação do mesmo e os subcultivos foram efetuados duas a três vezes por semana, sempre em condições de semi-confluência, conforme recomendação do fornecedor.

3.3. Indução da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais

As células foram mantidas em meio DMEM (com baixa concentração de glicose) com GlutaMAX® e 10% de SFB a 37°C com 5% CO₂. Após este período o meio contido nas placas foi substituído à meio específico para diferenciação osteogênica (StemPro Osteocyte Differentiation Basal Medium, Gibco®). Uma das culturas foi mantida como controle, no

qual foi mantido apenas o meio DMEM (baixa glicose) com GlutaMAX® e 10% de SFB, com a troca regular do mesmo. O procedimento de troca de meios se deu a cada 3 dias pelo período de 21 dias, conforme especificações do fornecedor das CTMs e meios utilizados. Após este período, o meio contido nas placas (inclusive controles) foi recolhido em tubos de centrífuga (Eppendorf®) e congelado, após 7, 14 e 21 dias em meio de diferenciação.

Aspectos morfológicos e estabelecimento de confluência foram observados em microscópio ao longo de todo o período de cultura celular, havendo marcação do meio com alizarina, para verificar expressão de cálcio e, conseqüente, constatação de diferenciação em células ósseas.

3.4. Análise do meio de cultura por FT-Raman

Para a identificação das bandas espectrais no espectro vibracional e sondagem dos grupos funcionais e/ou alterações moleculares associadas com a diferenciação e metabolismo, as amostras foram analisadas em FT-Raman (Varian®), utilizando primeiramente um módulo de placa de 96 poços e, posteriormente um módulo em cubeta de quartzo. Ambas as análises buscando discernir grupos funcionais e moleculares específicos secretados no meio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

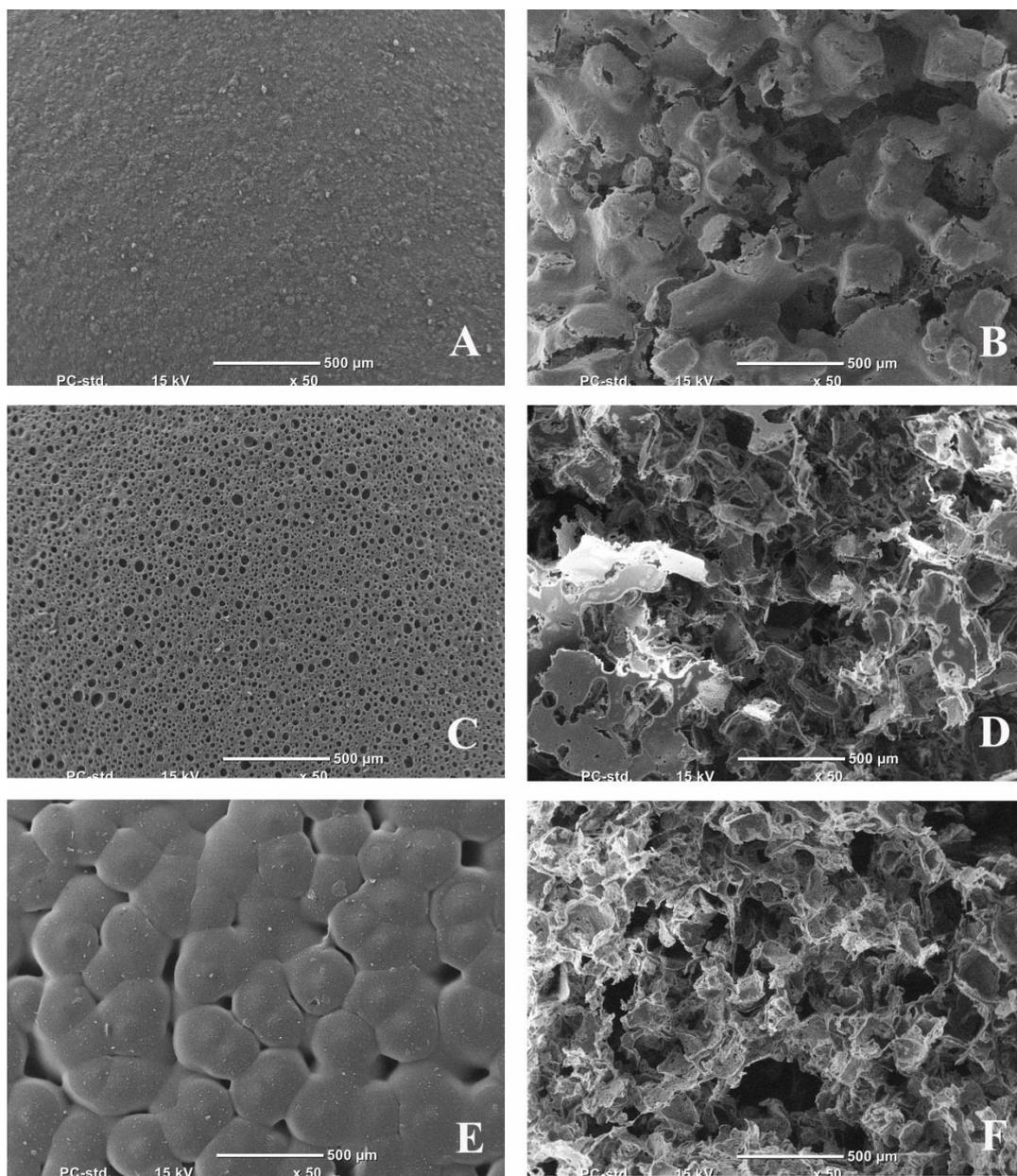


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura dos polímeros estudados. A e B PHBV; C e D blenda 75:25; E e F PCL. A, C e E polímeros densos. B, D e F polímeros porosos. Barra de escala = 500 µm.

A análise dos polímeros por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelou uma superfície irregular ao longo das amostras densas e confirmou a ausência de poros nestas amostras. O PHBV denso não apresentou porosidade aparente, mas as irregularidades na mistura 75/25 e PCL puro se assemelharam aos poros (Figura 1). Porém, essas irregularidades se restringem a porção superficial e tem dimensões muito diminutas. Nas amostras porosas, co-

mo era de se esperar, foram observados poros não homogeneamente distribuídos com diferentes diâmetros (Figura 1). Todas as amostras apresentaram irregularidades superficiais, cuja aparência apresentou alguma variação de composição para composição.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) constituem amplo objeto de pesquisa, sendo estudados acerca de padrões de adesão, crescimento e diferenciação celular. Todavia, estudos básicos acerca do metabolismo ainda mostram-se escassos, principalmente sobre biomateriais. Esse foi um dos objetivos com o uso da FT-Raman.

Ao longo do andamento do projeto, realizou-se o cultivo das CTMs, estas adquiridas e ambientadas no laboratório. Tais células foram mantidas em confluência para avaliar os primeiros sinais de diferenciação dessas, mesmo sem utilizar qualquer fator adicionado no meio. A morfologia observada foi compatível com o descrito na literatura internacional. Observou-se células alongadas que, quando em maior densidade, retraem os prolongamentos. Figuras 2 e 3, respectivamente com 24 e 48h de cultivo em condições de confluência. Figura 4 com células induzidas à diferenciação óssea em semiconfluência, confluência e coradas com alizarina para evidenciar expressão de cálcio.

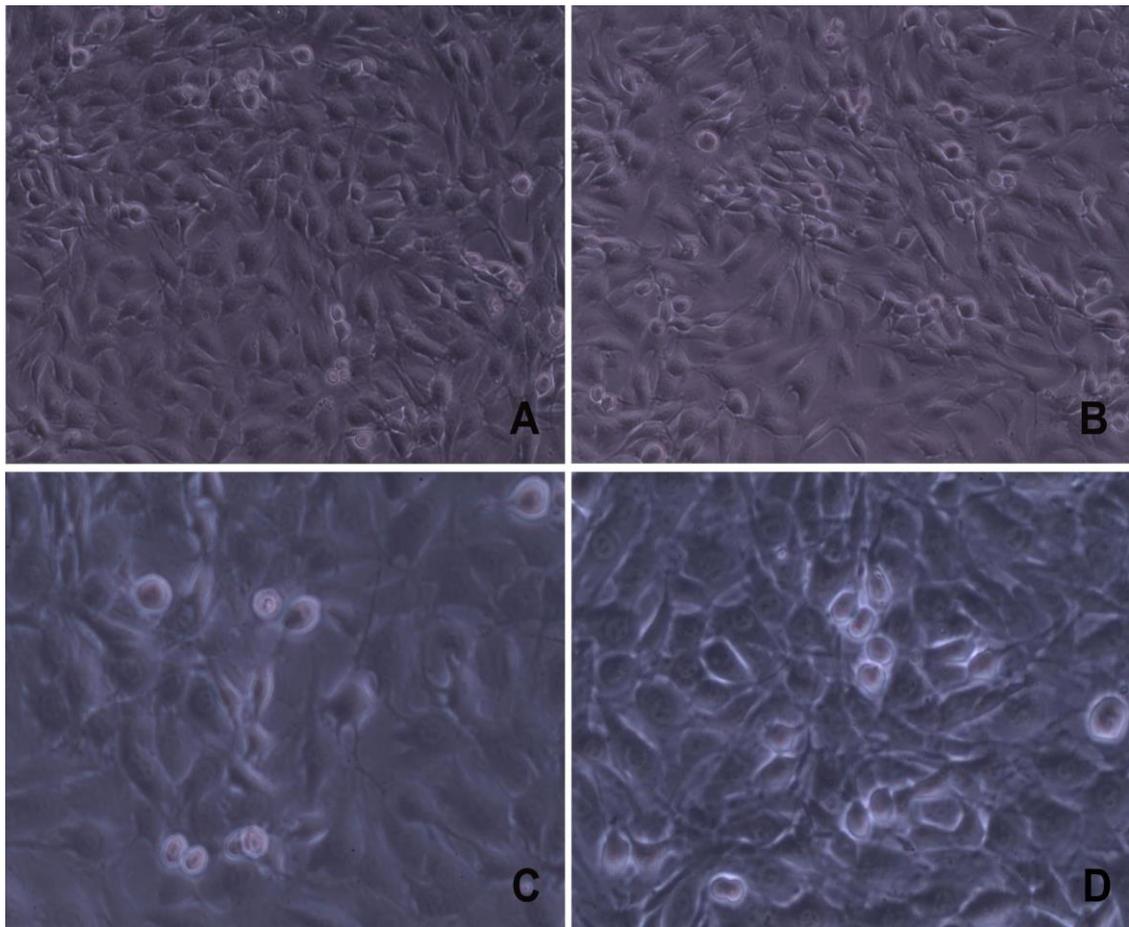


Figura 2. CTMs cultivadas por 24h em condições de confluência. Imagens obtidas com objetiva de 10x (A e B) e 20x (C e D).

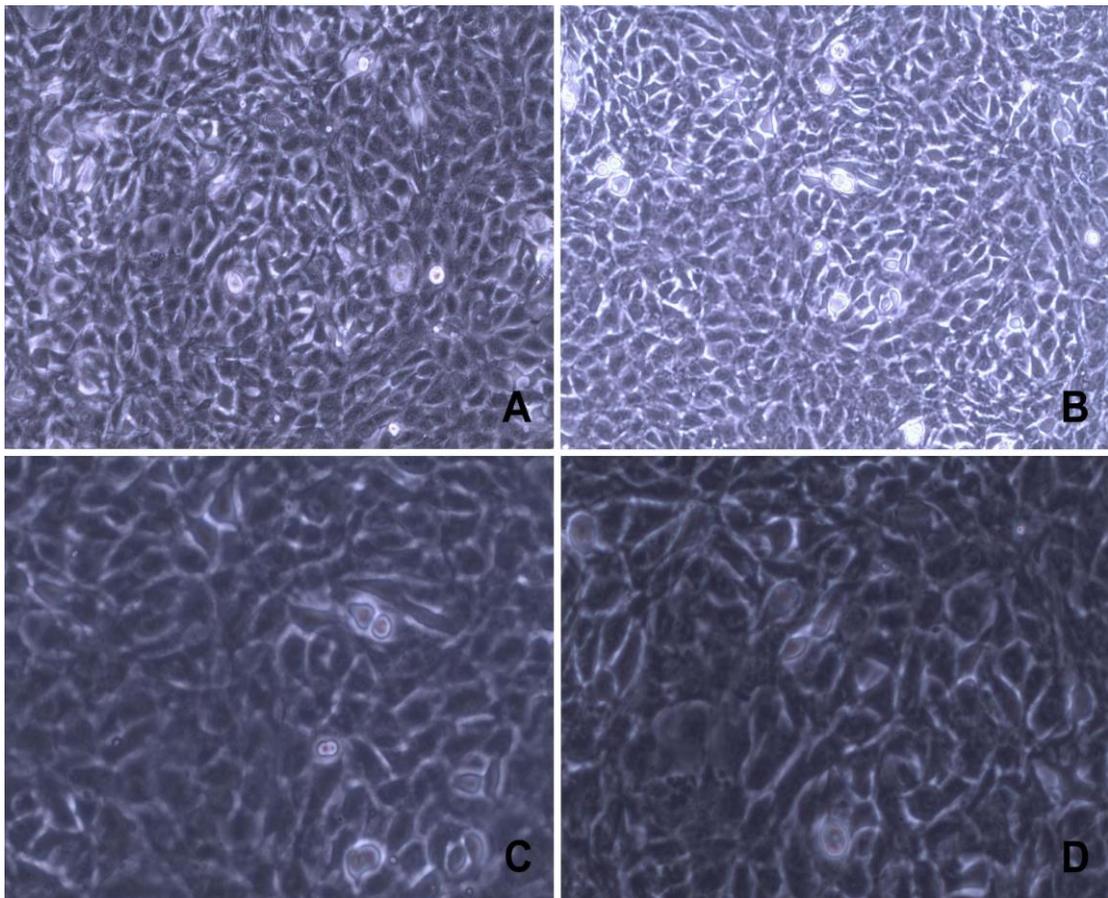


Figura 3. CTMs cultivadas por 48h em condições de confluência. Imagens obtidas com objetiva de 10x (A e B) e 20x (C e D).

Foi induzida a diferenciação osteogênica nas CTMs baseada no protocolo descrito por Meireles & Nardi (2003).

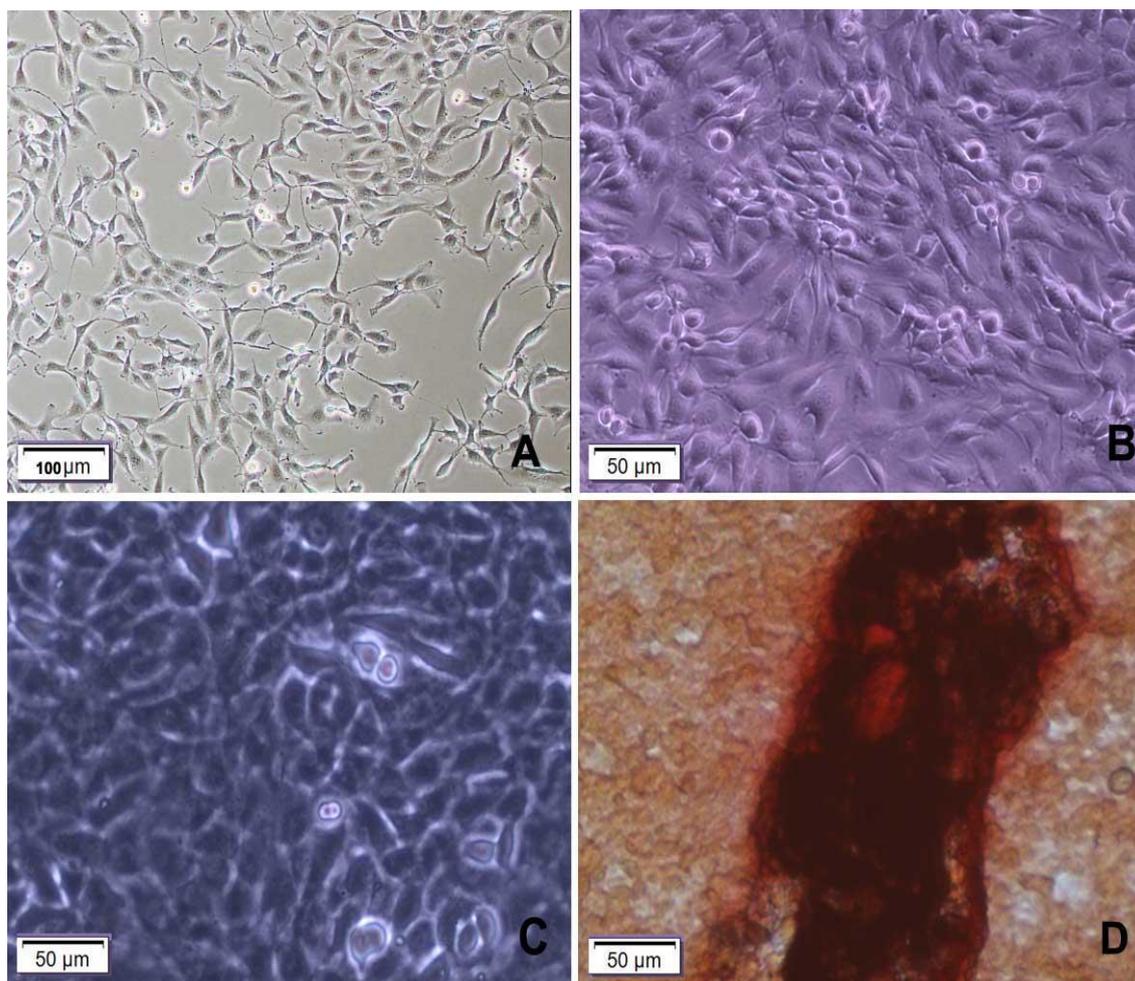


Figura 4. Indução da diferenciação óssea de CTMs cultivadas em semiconfluência (A) confluência (B), no início da formação de agregados celulares (C) e corados com vermelho de alizarina (que evidencia/cora cálcio) após duas semanas de cultivo e diferenciação (D). A mancha vermelha presente em D externa região com expressão de cálcio, isto é, células ósseas. De A até C contraste de fase sem coloração.

As CTMs são células-tronco multipotentes que têm uma grande capacidade de auto-renovação, mantendo sua multipotência. Eles podem se diferenciar em múltiplos fenótipos de células maduras *in vitro*, incluindo adipócitos, osteócitos e condrócitos (Meireles & Nardi ,2003; Meirelles et al., 2006; Machado e Santos Jr, 2013). *In vitro*, quando não confluentes, as CTMs exibem morfologia semelhante a células fibroblásticas, se mostram bem aderidas à placa de cultura. Esses dados são condizentes com os observados em nossas condições de cultura.

Curtis e Wilkenson (1997), apontam que os substratos de crescimento causam impactos em fases iniciais de adesão e espalhamento das células e conseqüentemente causam alterações

na morfologia celular. Então, era de se esperar variações no comportamento celular induzido pelos materiais poliméricos. No trabalho realizado por Rodrigues et al (2012) onde células fibroblásticas e CTMs foram comparadas quando cultivadas em biomateriais poliméricos, pequenas quantidades de CTM foram observadas sobre os substratos de cultura, sendo as células fibroblásticas mais eficientes no que diz respeito a adesão e crescimento inicial sobre os polímeros estudados. As CTMs comparadas com fibroblastos demonstraram capacidade de adesão e divisão mais lenta (Meirelles et al., 2006; Abdallah, Kassem, 2008).

As células-tronco adultas são classificadas como multipotentes, pois se diferenciam em células do tecido de onde derivam. As CTMs se diferenciam em um número limitado de células especializadas (Zago & Covas, 2007), mas não se restringem em formar células apenas do tecido do qual se originam, podendo diferenciar-se em células de outros tecidos, sendo células ósseas, cartilaginosas e adiposas, característica que as tornam muito especiais para a engenharia de tecidos (Machado & Santos Jr, 2013). Pesquisadores tiveram grande progresso no que diz respeito ao controle de diferenciação e proliferação *in vitro* e também no isolamento destas células de diferentes fontes (Lechner & Huss, 2006). CTMs da medula óssea tem importante potencial de diferenciação e facilidade para isolamento e cultivo (Cardoso & Arruda, 2009).

Fatores externos podem afetar profundamente o processo da regeneração, mas os tecidos agem de acordo com regras biológicas que controlam a proliferação e a diferenciação celular assim como a produção de matriz, que poderão ocorrer independentemente de interferências externas, embora influenciadas por elas (Zago & Covas, 2007; Machado & Santos Jr, 2013).

In vitro as CTMs exibem morfologia semelhante a células fibroblásticas, se aderem bem a substratos plásticos podendo ser expandidas diversas vezes mantendo seu padrão de diferenciação (Meirelles, 2006). Embora seu uso clínico não seja mais aconselhável quando expandidas por mais de 40 gerações (Deans & Moseley, 2000). Esses parâmetros são semelhantes aos encontrado em nosso trabalho.

4.1. FT-Raman

Com o objetivo de verificar o potencial da FT-Raman para a análise em componentes presentes no meio de cultura condicionado pelo metabolismo celular, utilizou-se dos meios de

cultura condicionado e recolhido nas seguintes condições experimentais: 1) CTMs cultivadas sobre as placas; 2) CTMs cultivadas sobre o PHBV denso e poroso; 3) CTMs cultivadas sobre a blenda PHBV/PCL (75:25) densa e porosa; 4) CTMs cultivadas sobre o PCL denso e poroso. Em todos os casos, as células estavam com o padrão de diferenciação osteogênico induzido. Utilizou-se do meio de cultura livre de células como controle.

O questionamento que norteia este estudo faz referência à possibilidade de identificação de moléculas específicas no meio de cultivo condicionado. Nestas condições, as moléculas nele presentes estariam em uma situação bem mais diluída que nos estudos experimentais previamente relatados, realizados quase sempre com amostras de tecidos obtidos por biópsia ou necropsia.

Para este projeto, utilizou-se, num primeiro momento, o módulo de varredura do FT-Raman para placas de 96 poços. Ele permite uma análise rápida de amostras líquidas no equipamento, de modo simultâneo e comparativo. Os resultados obtidos no módulo utilizado não apresentaram resolução que fosse suficiente para analisar diferenças metabólicas nas distintas condições experimentais. Esses resultados são apresentados nas figuras de 4 a 6.

Abaixo apresentam-se as leituras dos meios de cultura condicionados e também os meios sem células para comparação. Com a exclusão das leituras dos meios sem células das demais, praticamente não se verifica modo vibracional de estiramento de destaque. Como mostrada nas figuras 5 a 7, as curvas estão praticamente sobrepostas. Concluiu-se que esse modo de análise não tem resolução para atender nossos objetivos, nas condições propostas.

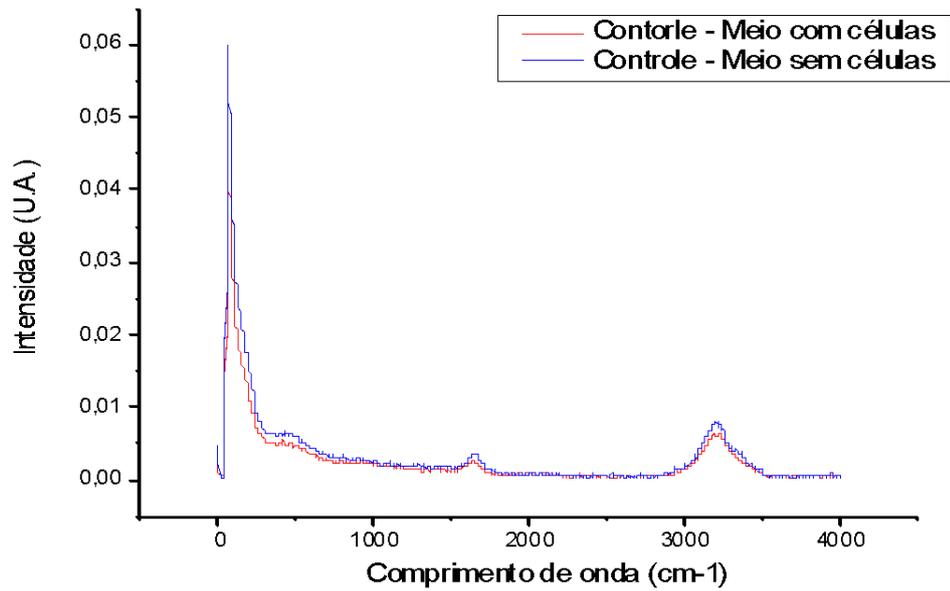
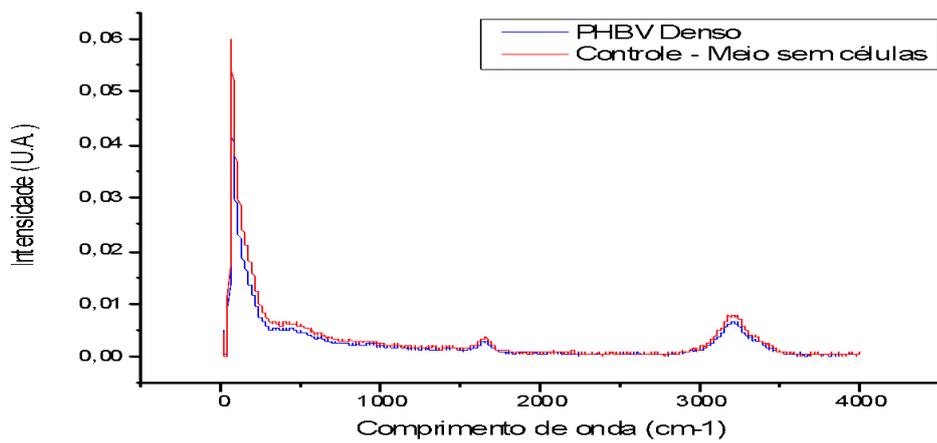


Figura 5. Análise do meio de cultura livre de células e com células cultivadas sem a presença de qualquer biomaterial por FT-Raman em módulo de varredura para placas de 96 poços.



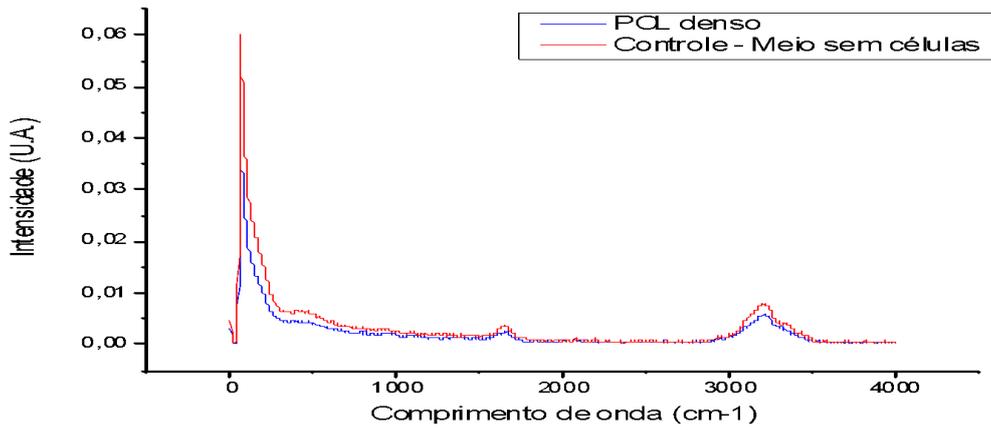
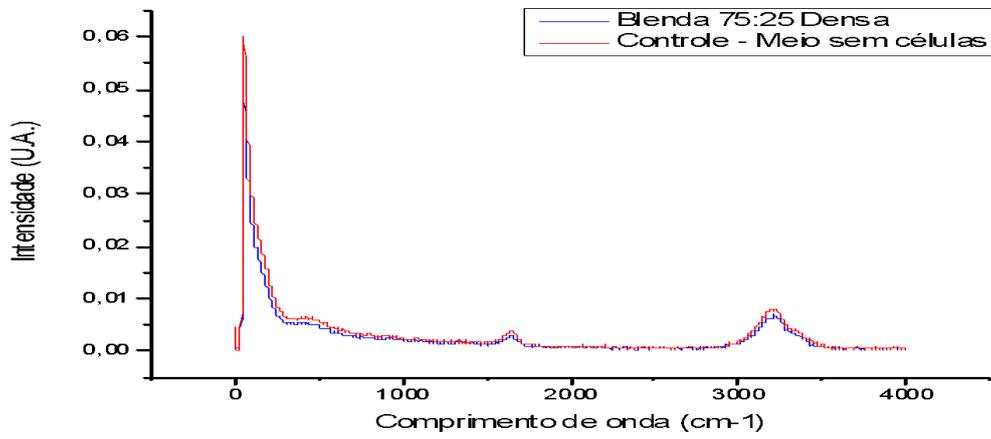


Figura 6. Análise do meio de cultura livre de células e do meio de cultura das células cultivadas sobre as membranas densas por FT-Raman em módulo de varredura para placas de 96 poços.

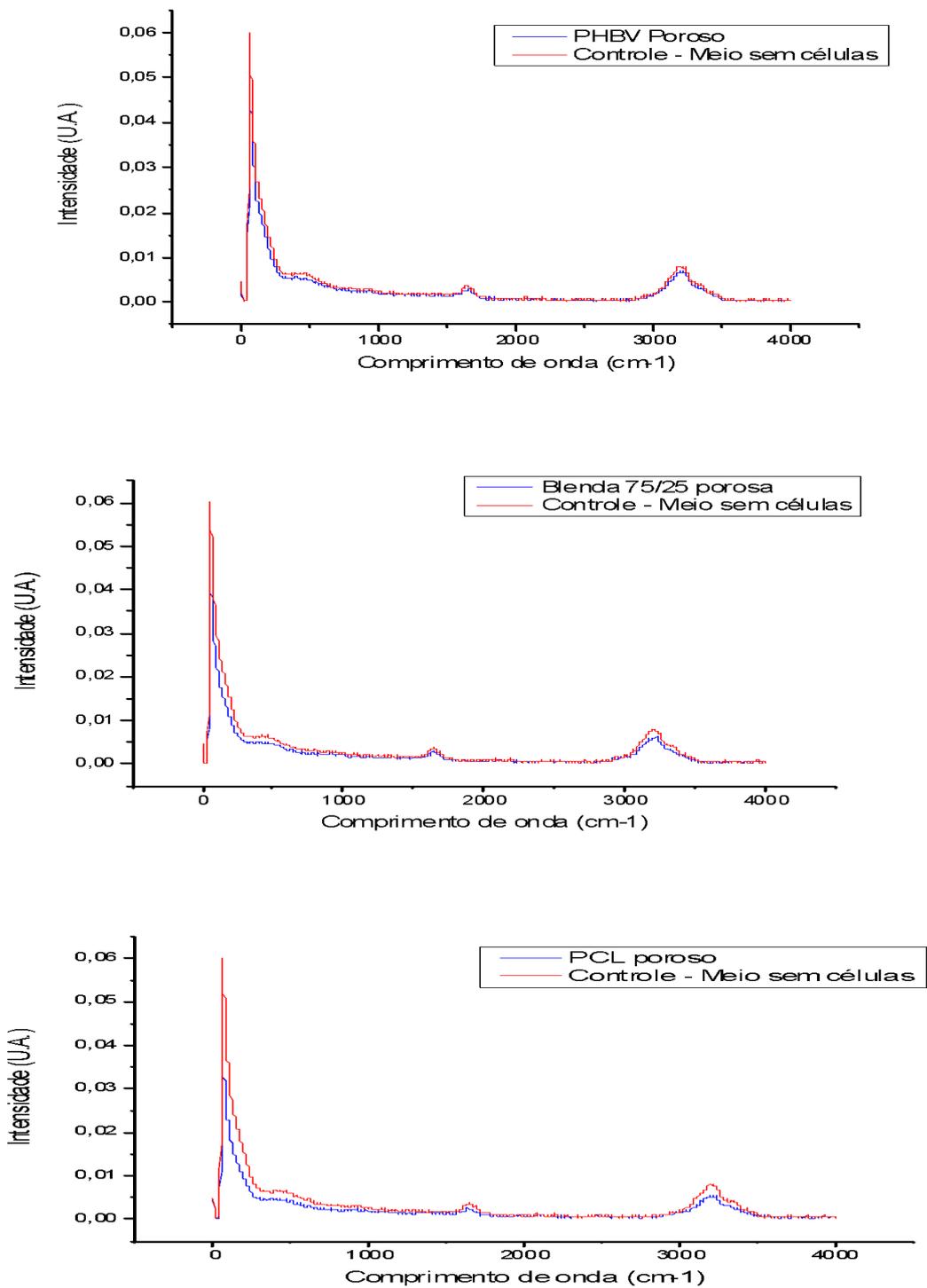


Figura 7. Análise do meio de cultura livre de células e do meio de cultura das células cultivadas sobre os polímeros porosos por FT-Raman em módulo de varredura para placas de 96 poços.

Num segundo momento, partiu-se então para o uso de outro módulo do espectrômetro Raman, em cubeta de quartzo. Ele é feito individualmente (por amostra), o que torna a análise bem mais lenta, porém potencialmente mais precisa. Com esse módulo verificou-se melhora na resolução das análises. Na figura 8 pode-se observar as análises do meio de cultura livre de células e condicionado. Quando comparadas com os espectros do módulo de análise anteriormente empregado, observa-se diferenças que poderiam ser averiguadas em estudos futuros.

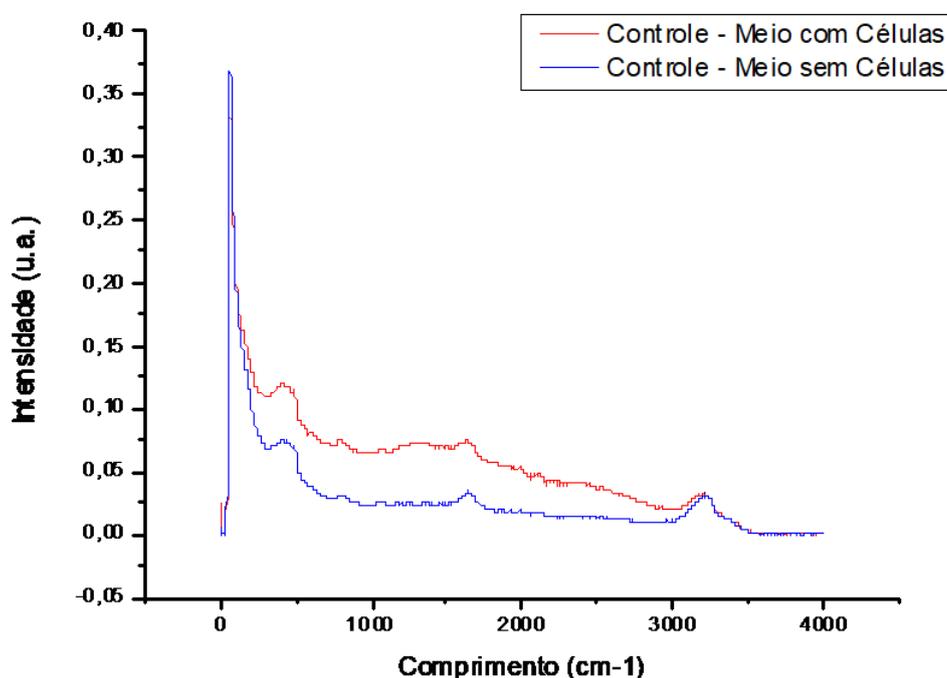


Figura 8. Análise do meio de cultura livre de células e com células cultivadas sem a presença de qualquer biomaterial em FT-Raman em módulo de leitura individual.

Para as análises dos meios de cultura condicionados das células sobre os polímeros, os dados são apresentados nas figuras 9 e 10, nas quais excluiu-se como linha de base a leitura dos meios sem células. Desta forma, tinha-se apenas o objeto de estudo para averiguação. Como revisto por Movasaghi e colaboradores (2007) os modos vibracionais de estiramento de interesse biológico se iniciam em 415cm^{-1} . Então, os espectros expressos nos gráficos têm seu início a partir de 410cm^{-1} .

Dada análise dos padrões espectrais expressos por modo vibracionais de estiramento distintos, verificou-se a expressão de lipídeos tais como colesterol, com comprimentos variando de 416 cm^{-1} a 435 cm^{-1} (Krafft et al., 2005), com exceção da amostra de SFB-controle que, em seu primeiro modo vibracional (408 cm^{-1}), expressou fosfatidilinositol (Krafft et al., 2005). Esse mesmo grupo foi o único a expressar o modo em 1070 cm^{-1} que evidencia triglicerídeos (Silveira Jr et al., 2002).

Outros modos vibracionais de estiramento em número de onda de 1626 cm^{-1} que corresponde a forma Beta de polipeptídeos (Shaw, Mantsch, 1999). Além disso, em todas as amostras a ocorrência de pico na faixa de 788 cm^{-1} e 800 cm^{-1} expressam DNA e estruturas geométricas típicas à interações de íons fosfato (Notingher et al., 2004). Os modos vibracionais expressos na faixa entre 1640 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} evidenciam amida e proteínas de estruturas irregulares (Agarwal et al., 2006; Malini et al., 2006). Ligações de hidrogênio com oxigênio e nitrogênio podem ser evidenciadas pelos modos vibracionais expressos em número de onda $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ (Eckel et al., 2001).

Em relação ao colesterol, trabalhos previamente publicados evidenciaram que, por FT-Raman, pode-se estudar a quantidade e distribuição do colesterol (Van de Poll et al., 2001). Outros estudos também utilizaram dessa ferramenta para prever concentrações de distintos parâmetros em soro e soro ultrafiltrado, onde obtiveram expressões de colesterol, triglicerídeos, glicose, lipoproteínas, entre outros compostos (Rohleder et al., 2004). Não observamos variações nesse nível nesse estudo. As diferentes amostras poliméricas estudadas não expressaram variações quando comparadas entre si.

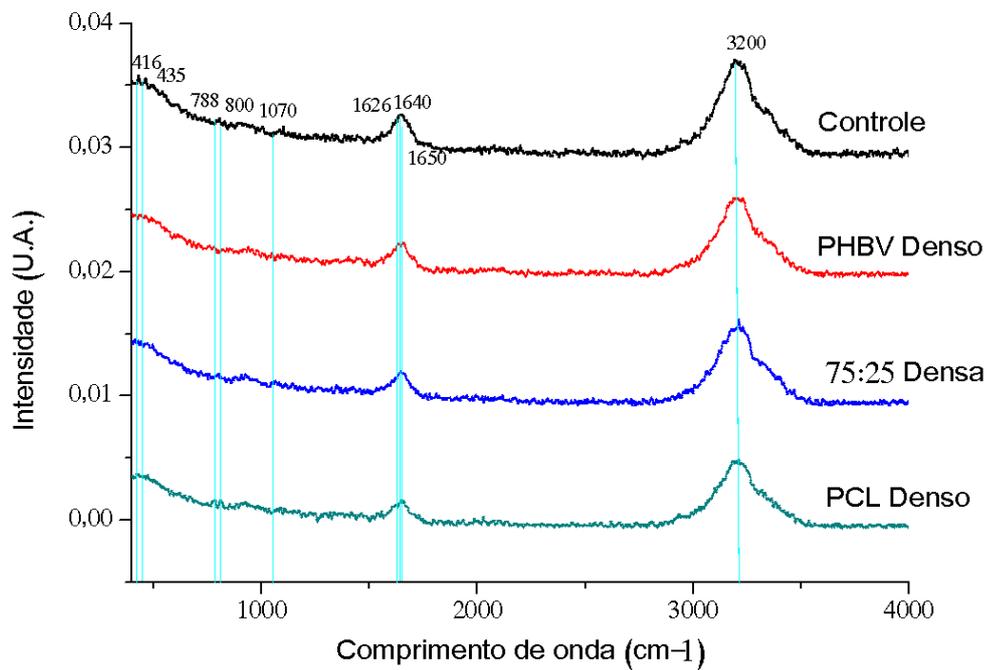


Figura 9. Análise do meio de cultura das células cultivadas sobre os polímeros densos por FT-Raman em módulo de leitura individual. Expressão de lipídeos tais como colesterol entre 416 cm^{-1} a 435 cm^{-1} , fosfatidilinositol em 408 cm^{-1} e de triglicérides em 1070 cm^{-1} na amostra de SFB-controle. Expressão de forma beta de polipeptídeos em 1626 cm^{-1} , DNA em picos na faixa de 788 cm^{-1} e 800 cm^{-1} . Proteínas de estruturas irregulares expressas entre 1640 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} . Ligações de hidrogênio com oxigênio e nitrogênio em $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$.

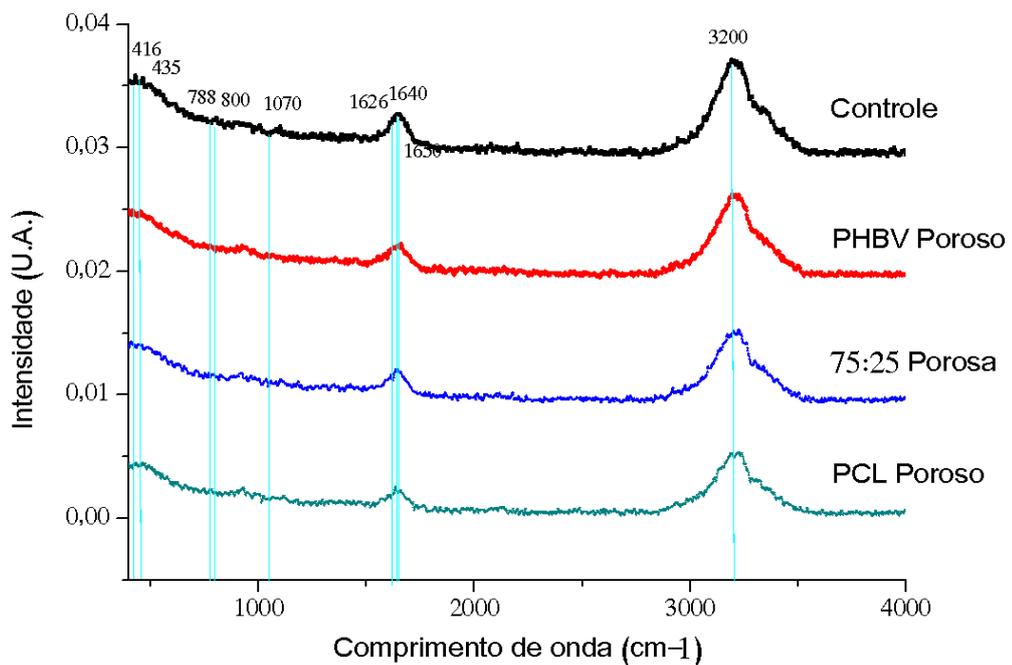


Figura 10. Análise do meio de cultura das células cultivadas sobre os polímeros porosos por FT-Raman em módulo de leitura individual. Expressão de lipídeos tais como colesterol entre 416 cm^{-1} a 435 cm^{-1} , fosfatidilinositol em 408 cm^{-1} e de triglicerídeos em 1070 cm^{-1} na amostra de SFB-controle. Expressão de forma beta de polipeptídeos em 1626 cm^{-1} , DNA em picos na faixa de 788 cm^{-1} e 800 cm^{-1} . Proteínas de estruturas irregulares expressas entre 1640 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} . Ligações de hidrogênio com oxigênio e nitrogênio em $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$.

Estudos comparativos entre diferentes condições de cultura – algumas já utilizadas em protocolos experimentais clínicos – de CTMs para seu isolamento e expansão *in vitro*, revelaram que, além da qualidade do soro fetal bovino, dentre outros parâmetros, incluindo meio basal, a concentração de glicose, estabilidade de glutamina e qualidade da superfície do plástico (tendo destaque na proliferação de CTMs, os frascos tipo Falcon) (Sigmond & Goldman, 1978) favorecem a proliferação das CTMs. Além disso, o emprego de fator de crescimento fibroblástico (bFGF) serve de suplemento à proliferação também, atuando na capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, o que favorece a diferenciação para a linhagem osteogênica e limitação do potencial neurogênico (Van Den Bos *et al.*, 1997; Solchaga *et al.*, 2005).

As CTMs residem, fisiologicamente, sob condições de hipóxia dentro da medula óssea, com níveis de oxigênio variando entre 4% e 7% (Grant & Smith, 1963; Kofoed *et al.*, 1985). Em discordância com os estudos anteriormente citados, algumas análises sugerem que culturas de CTMs, em condições de hipóxia, têm a proliferação e diferenciação afetadas, sendo que, sob níveis normais de oxigênio (normoxia), essas células apresentam senescência prematura e uma redução nas duplicações da população em comparação com células cultivadas sob hipóxia (Lennon *et al.*, 2001.; Mousavi-Harami *et al.*, 2004; Grayson *et al.*, 2006, 2007.; Santos *et al.*, 2010).

A diferenciação osteogênica é inibida sob hipóxia, enquanto a condrogênese ocorre sob ambas as condições de oxigênio, sendo mais estável em hipóxia (Tuncay *et al.*, 1994; Lennon *et al.*, 2001; Warren *et al.*, 2001; Malda *et al.*, 2004; Salim *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Malladi *et al.*, 2006; D'Ippolito *et al.*, 2006; Markway *et al.*, 2010). Estes fenômenos podem estar associados com o metabolismo energético das células subjacentes, o qual estabelece relação entre a glicólise e a fosforilação oxidativa, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (Martin *et al.*, 2004; Mousavi-Harami *et al.*, 2004). O entendimento metabólico e energético das CTMs contribui para a geração de condições de

crescimento adequadas destas, o que possibilita maior rendimento celular para emprego em medicina regenerativa ou mesmo engenharia tecidual (Pattappa *et al.*, 2010).

A diferenciação osteogênica possui um marcador precoce presente nas periferias da matriz óssea neoformada e importante à iniciação do processo de mineralização óssea, a osteopontina, responsável também pela prevenção à precipitação dos cristais de fosfato de cálcio na matriz colagênica de forma prematura (Hell *et al.*, 2011). Mais tardiamente, no processo de diferenciação celular, encontra-se a osteocalcina, atuante no controle da formação de cristais de hidroxiapatita (Doi *et al.*, 1992), bem como no avanço do processo de mineralização (Roach, 1994).

A triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4) estimulam a expressão de genes nos osteoblastos para a produção principalmente de osteocalcina (Varga, 1997; Gouveia, 2001; Varga, 2004;) e colágeno (Klaushofer *et al.*, 1995), importantes para a síntese e mineralização da matriz óssea (HUANG *et al.*, 2000). No entanto, não há pesquisas sobre a influência de T3 e T4 na expressão de mRNA para as proteínas da matriz óssea durante o processo de diferenciação osteogênica das CTMs (Hell *et al.*, 2011).

Poucos estudos avaliaram mudanças no metabolismo energético de CTMs durante a diferenciação osteogênica ou mesmo condrogênica. Há relatos de aumento no consumo de oxigênio durante a diferenciação osteogênica e diferenciação adipogênica para CTMs provindas da medula óssea e mesmo do tecido adiposo, havendo também maior taxa de glicólise para a diferenciação condrogênica (Wang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com as observações dos padrões espectrais expressos por picos em distintos comprimentos à luz do emprego da FT-Raman, pôde-se verificar a expressão de lipídeos tais como colesterol e fosfatidilinositol, bem como triglicerídeos; forma beta de polipeptídeos; ligações de hidrogênio com oxigênio e nitrogênio; amida e proteínas de estruturas irregulares, além da expressão de DNA.

Como supracitado, um dos objetivos deste estudo foi testar se a FT-Raman poderia ser útil na análise do meio de cultura condicionado por células em cultura. Dados na literatura

indicam essa possibilidade. Na presente avaliação, a resolução da técnica é limitada, moléculas diferentes podem ter modos vibracionais de estiramento próximos ou mesmo iguais. Isso dificulta a análise. Além disso, no meio de cultura as moléculas estão em uma situação de diluição bem maior que nos estudos realizados com amostras de tecidos e anteriormente citados, isto é, quando em observação junto às membranas, as células ósseas não se dispõem em densidade suficiente para maior acurácia da técnica para a análise proposta no presente estudo, além do meio possuir composição diversa. Também não observou-se variações nas leituras entre as amostras estudadas. A FT-Raman não atendeu às expectativas nas condições estudadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, B.M.;Kassem, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Therapy*, 15, 109-16, 2008.
- Agarwal, R., Tandon, P., and Gupta, V.D. (2006) Phonon dispersion in poly(dimethylsilane). *Journal of Organometallic Chemistry*, 691: 2902–2908.
- Anderson, A. *The Raman Effect: Application*. New York: Marcel Dekken, 1973.
- Afseth, N.K.; Wolda, J.P.; Segtnan, V.H. The potential of Raman spectroscopy for characterization of the acid unsaturation of salmon. *Anal. Chim. Acta* 572:85-92, 2006.
- Atala, A. Engineering organs. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 575-592, 2009.
- Barbanti, S.H., Zavaglia C.A.C., Duek E.A.R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, 13-21, 2005.
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. *Stem Cells* 22:675–682.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol* 7:14.
- Brockes J.P.; Kumar A. Plasticity and Reprogramming of Differentiated Cells in Amphibian Regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 3, p. 566-574, 2002.

- Bydlowski, Sergio P. *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 31, n. supl 1, p. 25-35, 2009.
- Cardoso, G.B.C.; Arruda A.C.F. O papel das células tronco na engenharia de tecidos. *Ciências & Cognição*, 14 (3): 214-219, 2009.
- Casarin, S.A.; Malmonge, S. M.; Kobayashi, M.; Agnelli, J.A.M. Study on *in Vitro* Degradation of Bioabsorbable Polymers Poly(Hydroxybutyrate-Co-Valerate) - (PHBV) and Poly(Caprolactone) - (PCL). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2, 207-215, 2011
- Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH. 2008. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:960–968.
- Choo-Smith, L.P.; Edwards, H.G.; Endtz, H.P. et al. Medical applications of Raman Spectroscopy: From proof of principal to clinical implementation. *Biopolymers* 67(1):1-9, 2002.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7841– 7845.
- Curtis, A.; Wilkenson, C. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18,1573–83,1997.
- Dean, R.T., Jessup, W., and Roberts, C.R. Effect of exogenous amines on mammalian cells, with particular reference to membrane flow. *Biochem J* 217, 27, 1984.
- Deans, R. J.; Moseley, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.
- DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D *et al.* Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999;107:275–281.
- Doi Y, Horigushi T, Kim SH, Moriwaki Y, Wakamatsu N, Adachi M, *et al.* Effects of non-collagenous proteins of the formation of apatite in Ca-β-glycerophosphate solution. *Arch Oral Biol.* 1992;37:15-21.

- Domm C, Schunke M, Steinhagen J, Freitag S, Kurz B. 2004. Influence of various alginate brands on the redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high and low oxygen tension. *Tissue Eng* 10:1796–1805.
- Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. 2010. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol* 223:27–35.
- Eckel, R., Huo, H., Guan, H.-W., Hu, X., Che, X., and Huang, W.-D. (2001) Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue. *Vibrational Spectroscopy*, 27: 165–173.
- Follmar KE, Decroos FC, Prichard HL, Wang HT, Erdmann D, Olbrich KC. 2006. Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 12:3525–3533.
- Glacken, M.W. Catabolic control of mammalian cell culture. *Biotechnology* 6, 1041, 1988.
- Hell, R. C., Boeloni, J. N., Ocarino, N. M., Silva, J. F., Goes, A. M., & Serakides, R. (2011). Efeito da triiodotironina na expressão das proteínas ósseas durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 55, 339-44.
- Hench, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, 19, 1419-1423, 1998.
- Hicok, K.C.; Du Laney, T.V.; Zhou, Y.S.; Halvorsen, Y.D.; Hitt, D.C.; Cooper, L.F. Gimble, J.M. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid *in vivo*. *Tissue Engineering*,10, 371-380, 2004.
- Huang BK, Golden LA, Tarjan G, Madison LD, Stern PH. Insulin -like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2000;15:188-97.
- Grant JL, Smith B. 1963. Bone marrow gas tensions, bone marrow blood flow, and erythropoiesis in man. *Ann Intern Med* 58:801–809.
- Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. 2006. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 207:331– 339.

- Hassell, T., Gleave, S., and Butler, M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol* 30, 29, 1991.
- Heywood HK, Lee DA. 2008. Monolayer expansion induces an oxidative metabolism and ROS in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 373:224–229.
- Junqueira, LC.; Carneiro, J. *Biologia celular e molecular*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2012
- Kim J, Kang JW, Park JH, Choi Y, Choi KS, Park KD, Baek DH, Seong SK, Min HK, Kim HS. 2009. Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch Pharm Res* 32:117–126.
- Kirouac DC, Zandstra PW. 2008. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell* 3:369–381.
- Klaushofer K, Varga F, Glantschnig H, Fratzl-Zelman N, Czerwenka E, Leis HJ, *et al*. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J Nutr*. 1995;125:1996S-2003S.
- Kofoed H, Sjontoft E, Siemssen SO, Olesen HP. 1985. Bone marrow circulation after osteotomy. Blood flow, pO₂, pCO₂, and pressure studied in dogs. *Acta Orthop Scand* 56:400–403.
- Kong, K.; Kendall, C; Stone, N. Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 89, 121-134, 2015.
- Krafft, C., Neudert, L., Simat, T., and Salzer, R. (2005) Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochimica Acta, Part A*, 61: 1529–1535.
- Lechner, S.; Huss, R. Bone engineering: combining smart biomaterials and the application of stem cells. *Artificial Organs*, 30, 770–774, 2006.
- Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. 2001. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* 187:345–355.

- Liu F, Malaval L, Aubin EJ. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J Cell Sci.* 2003;116:1787-96.
- Ljuggren, J., and HÄGGSTRÖM, L. Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. *Biotechnol Bioeng* 44, 808, 1994.
- Lu ,L.X., Wang, Y.Y., Mao, X.,Xiao, Z.D., Huang, N.P. The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrowderived mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials*, 7, 015002, 2012.
- Ma, P.X. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, 7, 30-40, 2004.
- Machado, L.; Santos Jr., A.R. Stem cells and cell therapy: From basic sciences to clinical perspectives. *Journal Biomedical Science Engineering*, 6, 683-692, 2013.
- Malda J, van Blitterswijk CA, van Geffen M, Martens DE, Tramper J, Riesle J. 2004. Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 12:306–313.
- Malini, R., Venkatakrishma, K., Kurien, J., et al. (2006) Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study. *Biopolymers*, 81 (3): 179–193.
- Malladi P,Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. 2006. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1139–C1146.
- Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. 2010. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant* 19:29–42.
- Martin JA, Klingelhutz AJ, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. 2004. Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59:324–337.
- Meirelles, Lindolfo da Silva; NARDI, Nance Beyer. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British journal of haematology*, v. 123, n. 4, p. 702-711, 2003

- Meirelles, L.S. *et al.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v.119, p.2204-2213, 2006.
- Mimeault M.; Batra S.K. Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*, 24, 23192345, 2006.
- Mischen BT, Follmar KE, Moyer KE, Buehrer B, Olbrich KC, Levin LS, Klitzman B, Erdmann D. 2008. Metabolic and functional characterization of human adipose-derived stem cells in tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 122:725–738.
- Monteiro, B. S.; Neto, N. M. A.; Del Carlo, R. J.. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, v. 40, n. 1, 2010.
- Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. 2004. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: Consequences for tissue engineering. *Iowa Orthop J* 24:15–20.
- Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I.U. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 42:493-541, 2007.
- Mylotte, L. A.; Duffy, A.M.; Murphy M.; O'Brien, T.; Samali, A.; Barry, F.; Szegezdi, E.. Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *StemCells* 2008; 26:1325–1336.
- Naumann, D. FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Appl. Spectrosc. Rev.* 36(2-3):239-298, 2001.
- Notingher, I., Green, C., and Dyer, C. (2004) Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy. *Journal of the Royal Society Interface*, 1: 79–90.
- Pattappa, G.; Heywood, H. K.; Bruijn, J. D.; Lee, D. A.. The Metabolism of Human Mesenchymal Stem Cells During Proliferation and Differentiation. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*. 2562 – 20570. 2010.

- Rajpurohit, R.; Koch, C.J.; Tao, Z.; Teixeira, C.M.; Shapiro, I.M. 1996. Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: Relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol* 168:424–432.
- Raman, C.V.; Krishnan, K.S. A new type of secondary radiation. *Nature* 121:501-502, 1928.
- Raniero, L.; Canevari, R.A.; Ramalho, L.N.Z. et al. In and ex vivo breast disease study by Raman spectroscopy. *Theor. Chem. Acc.* 130(4-6):1239-1247, 2011.
- Rodrigues, A.A.; Batista, N.A.; Bavaresco, V.P.; Baranauskas, V.; Ceragioli, H.J.; Peterlevitz, A.C.; Santos Jr, A.R.; Belangero, W.D. Polyvinyl alcohol associated with carbon nanotube scaffolds for osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. *Carbon*, 50, 450-459, 2012a.
- Rohleder, D., Kiefer, W., and Petrich, W. (2004) Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy. *Analyst*, 129: 906–911.
- Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, Giaccia AJ, Longaker MT. 2004. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 279:40007–40016.
- Santos, F.; Andrade, P. Z.; Boura, J. S.; Abecasis, M. M.; Silva, C. L.; Cabral, J. M. S.. *Ex Vivo Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: A More Effective Cell Proliferation Kinetics and Metabolism Under Hypoxia.* *Journal of Cellular Physiology.* 27 – 35. 2010.
- Santos Jr, A.R. Bioresorbable polymers for tissue engineering. In: Daniel Eberlin. (Org.). *Tissue engineering.* Rijeka: In-Teh, 2010, p. 235-246.
- Schneider, M., Marison, I.W., and von Stockar, U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol* 49, 161, 1996.
- Schop, D.; Janssen, F. W.; Van Rijn, L. D. S.; Hugo Fernandes, H.; Bloem, R. M.; Bruijn, J. D.; Van Dijkhuizen-Radersma, R.. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering: Part. A.* Vol. 15, Nº 8, 2009.
- Schwindt, T. T., G. F. Barnabé, and L. E. A. M. Mello. "Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco." *J Bras Neurocirurg* 16.1 (2005): 13-9.

- Shaw, R.A. and Mantsch, H.H. (1999) Vibrational biospectroscopy: From plants to animals to humans. A historical perspective. *Journal of Molecular Structure*, 480– 481: 1–13.
- Short, M.A.; Lui, H.; McLean, D.; Zeng, H.; Alajlan, A.; and Chen, X.K. Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *J. Biomed. Optics*, 11, 34004-34013, 2006.
- Sigmond R.S., Goldman M. Corona discharge physics and applications. *Nato Adv Study Inst Ser B* 1978;89:1– 64.
- SILVEIRA JÚNIOR, L. Correlação entre a técnica de Espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artéria coronária humana. 2001. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Silveira, L., Sathaiah, S., Zangaro, R.A., et al. (2002) Correlation between nearinfrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. *Lasers in Surgery and Medicine*, 30: 290–297.
- Singh, R; Riess, F. Raman and the story of Nobel Prize. *Curr. Sci.*, 75, 965-971, 1998.
- Smith JR, Pochampally R, Perry A *et al.* Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *STEM CELLS* 2004;22:823–831.
- Sotiropoulou, P. A.; Perez, S. A.; Salagianni, M.; Baxevanis, C. N.; Papamichail, M.. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2006; 24:462–471.
- Solchaga LA, Penick K, Porter JD *et al.* FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 203:398–409.
- Sultana, N.; Wang, M. PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and *in vitro* biological evaluation. *Biofabrication*, 4, 015003, 2012, Epub 2012.

- Tuncay OC, Ho D, Barker MK. 1994. Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 105:457–463.
- Van de Poll, S. W. E., Romer, T. J., Volger, O. L., et al. (2001) Raman spectroscopic evaluation of the effects of diet and lipid-lowering therapy on atherosclerotic plaque development in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21: 1630–1635.
- van den Bos C, Mosca JD, Winkles J *et al.* Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors. *Hum Cell* 1997;10:45–50.
- Varga F, Rumpler M, Luegmayr E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Klaushofer K. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/c -fun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:404-11.
- Varga F, Spitzer S, Klaushofer K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:382-7.
- Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Applied Chemistry*, 84,377-410, 2012.
- Wagers A. J., Weissman I. L.. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116: 639-48, 2004.
- Wang D. W., Fermor B., Gimble J. M., Awad H. A., Guilak F. 2005. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 204:184– 191.
- Warren SM, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Bouletreau PJ, Longaker MT. 2001. Hypoxia regulates osteoblast gene expression. *J Surg Res* 99: 147–155.
- Zago, M.A. Covas, D.T. Células-tronco: Origens e Propriedades. In: Zago, M.A. Covas, D.T. (eds). *Células-tronco: A nova fronteira da medicina*. Cap. 1, Rio de Janeiro: Atheneu, pp.3-20, 2007.

