



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências da Saúde

Avaliação do efeito de dendrímeros com diferentes grupos funcionais à superfície na diferenciação de células estaminais mesenquimais

Mara Isabel Jesus Gonçalves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Helena Maria Pires Gaspar Tomás
Co-orientador: Prof. Doutor Ilídio Joaquim Sobreira Correia

Covilhã, 18 Outubro de 2011

Agradecimentos

Esta dissertação representa todo um conjunto de resultados conquistados ao longo de diversos anos de trabalho e de obstáculos. Todo este trabalho não teria sido possível se não fosse a contribuição de diversas pessoas, que durante este longo percurso sempre me acompanharam e apoiaram tanto nos momentos bons, como nos menos bons. Desde já, quero demonstrar o meu mais sincero reconhecimento a todos os que, de alguma forma, contribuíram para o culminar desta etapa.

Agradeço aos meus pais por todo o amor, apoio, carinho e sacrifícios incondicionais, para que eu pudesse atingir esta etapa da minha vida. Um profundo e sincero obrigada, por instruírem para a pessoa que hoje sou. Também quero agradecer ao meu irmão, por todo o carinho, alegria e descontração que sempre tentou proporcionar.

Um agradecimento especial ao meu namorado, João, por todo o apoio, carinho, amor e paciência infundáveis, mesmo nas horas mais desesperadas.

À minha orientadora, Professora Doutora Helena Tomás, agradeço todo o apoio, supervisão e estímulo prestado durante este ano de formação. Também gostaria de agradecer ao Professor Doutor João Rodrigues, ao Centro de Química da Madeira (CQM), em particular ao *Molecular Materials Research Group* (MMRG), e à Universidade da Madeira por me terem acolhido e proporcionado os meios para a realização desta dissertação.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Ilídio Correia, pelo incentivo, interesse, e apoio prestados.

Ao Professor Xiangyang Sh! pelo apoio dado na modificação dos dendrímeros PAMAM!

Agradeço ao Hospital Dr. Nélio Mendonça (Funchal), em particular ao serviço de Ortopedia, pela obtenção do osso trabecular humano contendo medula óssea.

Como não poderia faltar, quero agradecer profundamente a todos os meus colegas e amigos, Doutor Alireza Nouri, Doutor Dan Domide, Daniel Lima, Doutor Luís Santos, Manuel Jardim e Rita Castro, que ao longo deste ano me proporcionaram momentos de alegria, descontração e reflexão. Um muito obrigado a todos vocês pela forma como me receberam, por todo o apoio incondicional, gentileza, carinho e conhecimento proporcionados.

Também quero agradecer, igualmente, às técnicas de laboratório Ana Paula Temtem e Ana Paula Andrade por toda a ajuda e assistência prestada.

Não posso deixar de agradecer o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projecto PEst-OE/QUI/UI0674/2011 (CQM, fundos do Governo Português) e da Rede Portuguesa de RMN (PTNMR-REDE/1517/RMN/2005-POCI2010/FEDER). O apoio por parte do CS Madeira é também reconhecido.

Um profundo e sincero OBRIGADA, a todos os que contribuíram, directa ou indirectamente, na minha formação.

Resumo

A evolução da ciência tem proporcionado novas oportunidades que resultaram num prolongamento e aumento da qualidade da vida humana. Uma dessas descobertas foi a utilização de células estaminais para terapia celular, com o intuito de ajudar a reparar, substituir ou regenerar tecidos ou órgãos. As células estaminais apresentam duas propriedades especiais: o potencial de se diferenciarem em múltiplas linhagens e a capacidade de se auto-renovarem. Existem dois tipos principais de células estaminais, as embrionárias e as adultas. Entre estas últimas, estão as células estaminais mesenquimais que são detentoras de um potencial multipotente, o que as torna muito atractivas para aplicações clínicas, além de serem livres de objecções éticas.

Os dendrímeros são macromoléculas esféricas, com uma estrutura bem definida e com uma superfície multivalente. Os dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) foram os primeiros a ser sintetizados, caracterizados e comercializados. Estes podem apresentar diferentes grupos funcionais à superfície que fazem variar as suas propriedades.

De facto, à semelhança do que acontece com outros nanomateriais, é cada vez mais comum a utilização de dendrímeros em associação com as células estaminais mesenquimais, com o intuito de se encontrarem novas abordagens terapêuticas e metodologias de diagnóstico. Posto isto, o objectivo principal desta tese foi verificar se a capacidade de diferenciação osteogénica e adipogénica destas células não era afectada na presença de dendrímeros PAMAM. Desta forma, procedeu-se ao estudo do efeito do tipo de funcionalização à superfície, do número de geração e da concentração de dendrímeros na diferenciação celular. Foi avaliada a citotoxicidade através do teste de redução da resazurina e a capacidade de diferenciação através de marcadores bioquímicos e histoquímicos clássicos comumente utilizados na caracterização de culturas de osteoblastos e adipócitos.

Constatou-se que a viabilidade celular é inferior quando as culturas se encontram em contacto com dendrímeros carregados positivamente, enquanto que com dendrímeros aniónicos ou neutros não sofre nenhuma alteração. Em termos da diferenciação, mostrou-se que esta não é directamente afectada pela exposição aos dendrímeros.

Palavras chave:

Células estaminais mesenquimais; diferenciação; dendrímeros poli(amidoamina); citotoxicidade.

Abstract

The evolution of science has provided new opportunities that resulted in prolonged and improved quality of life. One of these findings was the use of stem cells for cellular therapies, with the aim of repairing, substitute or regenerate tissues or organs. Stem cells present two major properties: the capacity of differentiation into multiple lineages and the capacity of self-renew. There are two types of stem cells, the embryonic and the adult. Among the latter are the mesenchymal stem cells which are multipotent and free of ethical issues, being thus attractive for clinical applications.

The dendrimers are spherical macromolecules with a very well defined structure and with a multivalent surface. The poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers were the first ones being synthesized, characterized and commercialized. They can present different surface groups which are responsible for their properties.

In fact, in similarity with what happens with other nanomaterials, the use of dendrimers in association with mesenchymal stem cells is becoming common for finding new diagnostic methodologies and therapeutic strategies. The main goal of this thesis was, then, to evaluate if the osteogenic and adipogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells was not affected by the presence of PAMAM dendrimers. For that purpose, the effect of the type of surface functional groups, generation number and concentration of dendrimers on cellular differentiation was studied. Cell viability was assessed by the resazurin reduction assay and the differentiation capacity through classic biochemical and histochemical parameters commonly used in the characterization of osteoblasts and adipocytes in culture.

Results have shown that cell viability was lower when the cultures were in contact with cationic dendrimers, whereas, with anionic and neutral dendrimers there was no change. On the other hand, cell differentiation was not directly affected by exposure to dendrimers.

Key words

Mesenchymal stem cells; Differentiation; Poly(amidoamine) dendrimers; Cytotoxicity.

Índice

| | | |
|--|------|----|
| Agradecimentos | iii | |
| Resumo | vi | |
| Abstract | viii | |
| Lista de Figuras | xiii | |
| Lista de Gráficos | xvii | |
| Lista de Tabelas..... | xx | |
| Lista de Acrónimos | xxii | |
| ▪ Introdução | | |
| 1. Células estaminais..... | 2 | |
| 2. Células estaminais mesenquimais..... | 5 | |
| 2.1.Diferenciação osteogénica | 8 | |
| 2.1.1.Morfologia e marcadores de diferenciação..... | 9 | |
| 2.1.2.Protocolos de diferenciação | 9 | |
| 2.2.Diferenciação adipogénica | 10 | |
| 2.2.1.Morfologia e marcadores de diferenciação..... | 11 | |
| 2.2.2.Protocolos de diferenciação | 11 | |
| 2.3.Aplicações terapêuticas | 12 | |
| 2.4.Potenciais efeitos secundários da terapia com MSCs..... | 13 | |
| 3. Dendrímeros | 14 | |
| 3.1.Síntese de dendrímeros | 15 | |
| 3.1.1.Método divergente | 16 | |
| 3.1.2.Método convergente | 16 | |
| 3.2.Propriedades dos dendrímeros..... | 16 | |
| 3.2.1.Propriedades físico-químicas | 17 | |
| 3.2.2.Propriedades biológicas | 17 | |
| 3.3.Aplicações biomédicas | 18 | |
| 4. Objectivos gerais da Tese | 19 | |
| ▪ Capítulo I: Modificação da superfície de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais | | 20 |
| 1. Introdução | 21 | |
| 2. Secção Experimental | 25 | |
| 2.1.Materiais e reagentes | 25 | |
| 2.2.Modificação da superfície de dendrímeros PAMAM..... | 25 | |
| 2.3.H ¹ NMR..... | 27 | |

| | |
|---|----|
| 2.4.Determinação experimental do conteúdo de aminas primárias dos dendrímeros | 27 |
| 3. Resultados e discussão..... | 28 |
| 3.1.H ¹ NMR | 28 |
| 3.2..... Determinação experimental da extensão da modificação efectuada na superfície dos dendrímeros | 33 |
| 4. Conclusão | 34 |
| | |
| ▪ Capítulo II: Avaliação do efeito de dendrímeros com diferentes grupos funcionais à superfície na diferenciação de MSCs em osteoblastos e adipócitos | 35 |
| 1. Introdução | 36 |
| 2. Materiais e métodos..... | 40 |
| 2.1.Células, materiais e reagentes | 40 |
| 2.2.Isolamento e cultura de hMSCs | 40 |
| 2.3.Preparação das soluções de dendrímeros..... | 40 |
| 2.4.Indução da diferenciação de hMSCs..... | 41 |
| 2.5.Caracterização do comportamento celular..... | 42 |
| 2.6.Análise estatística | 45 |
| 3. Resultados | 46 |
| 3.1.Diferenciação osteogénica | 46 |
| 3.1.1.Viabilidade celular | 46 |
| 3.2.Diferenciação adipogénica | 57 |
| 4. Discussão e conclusão..... | 63 |
| Referências bibliográficas..... | 67 |

Lista de Figuras

- Figura 1.** MSCs e HSCs na medula óssea e seu progresso celular [24]. 4
- Figura 2.** Breve historial sobre as MSCs [18]. 5
- Figura 3.** Representação esquemática de um dendrímero de geração 4 (G4). Nesta figura é possível visualizar o crescimento das gerações através das cores atribuídas, nomeadamente, a azul a geração 1 (G0), a vermelho a G1 e assim sucessivamente. 14
- Figura 4.** Síntese divergente e convergente de dendrímeros. Neste esquema é possível visualizar, de forma simplificada, as duas principais estratégias utilizadas na síntese de dendrímeros. Na primeira, a construção começa no núcleo em direcção à periferia; na segunda, a construção faz-se da periferia em direcção ao núcleo. 16
- Figura 5.** Dendrímeros PAMAM com diferentes grupos terminais. Alguns destes grupos são responsáveis por adicionar características funcionais ou reactivas, enquanto outros modificam somente a solubilidade. 22
- Figura 6.** Representação esquemática das reacções de síntese de modo a modificar a superfície dos dendrímeros PAMAM-NH₂ de G2, G5 e G7. 24
- Figura 7.** Espectro de ¹H NMR de (A) G2-NH₂, (B) G2-Ac, (C) G2-OH e (D) G2-COOH. 29
- Figura 8.** Espectro de ¹H NMR de (A) G5-NH₂, (B) G5-Ac, (C) G5-OH e (D) G5-COOH. 30
- Figura 9.** Espectro de ¹H NMR de (A) G7-NH₂, (B) G7-Ac, (C) G7-OH e (D) G7-COOH. 32
- Figura 10.** Culturas celulares efectuadas para detecção da actividade da enzima ALP na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21. 52

Figura 11. Culturas celulares efectuadas para detecção da enzima ALP na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21. 53

Figura 12. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de fosfato de cálcio, pelo método de von Kossa, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21. 54

Figura 13. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de fosfato de cálcio, pelo método de von Kossa, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21. 55

Figura 14. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de cálcio, através da coloração com alizarina vermelha, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21. 56

Figura 15. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de cálcio, através da coloração com alizarina vermelha, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D).

As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21. 57

Figura 16. Culturas celulares efectuadas para detecção de vesículas de lípidos, através da coloração com óleo vermelho O, na presença de dendrímeros PAMAM à concentração de 10 µg/mL com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo e positivo (A e B, respectivamente). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (C a E), -OH (F a H) e -COOH (I a K). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. As imagens foram obtidas num microscópio óptico, no dia 21. 60

Figura 17. Culturas celulares efectuadas para detecção de vesículas de lípidos, através da coloração com óleo vermelho O, na presença de dendrímeros PAMAM à concentração de 0,5 µg/mL com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo e positivo (A e B, respectivamente). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (C a E), -OH (F a H) e -COOH (I a K). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. As imagens foram obtidas num microscópio, no dia 21. 62

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Estudo da viabilidade celular em condições de diferenciação osteogénica, após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), com concentração de 10 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH..... 46

Gráfico 2. Estudo da viabilidade celular em condições de diferenciação osteogénica, após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), com concentração de 0,5 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH..... 47

Gráfico 3. Actividade da ALP das culturas celulares expostas a dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH. 48

Gráfico 4. Actividade da ALP das culturas celulares expostas a dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH. 49

Gráfico 5. Concentração de OC nas culturas celulares expostas aos dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH. 50

Gráfico 6. Concentração de OC nas culturas celulares expostas aos dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH. 51

Gráfico 7. Estudo da viabilidade celular sobre a diferenciação adipogénica após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), à concentração de 10 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH. 58

Gráfico 8. Estudo da viabilidade celular sobre a diferenciação adipogénica após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), à concentração de 0,5 µg/mL. (–)

Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH.
..... 59

Gráfico 9. Concentração de óleo vermelho nas culturas celulares expostas a dendrímeros, com diferentes grupos terminais e de diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH. 61

Gráfico 10. Concentração de óleo vermelho nas culturas celulares expostas a dendrímeros, com diferentes grupos terminais e de diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. (–) Controlo negativo; (–) Controlo positivo; (–) PAMAM-NH₂; (–) PAMAM-OH e (–) PAMAM-COOH. 62

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Vantagens e desvantagens de células estaminais embrionárias vs células estaminais adultas..... | 3 |
| Tabela 2. Testes fenotípicos utilizados para caracterizar as MSCs [18]. | 7 |
| Tabela 3. Dados relativos a diferentes gerações de dendrímeros PAMAM com terminações amina (-NH ₂ , comercialmente disponíveis): peso molecular, diâmetro e número de grupos à superfície. | 15 |
| Tabela 4. Volume de TEA e Ac ₂ O adicionados a cada reacção de síntese..... | 25 |
| Tabela 5. Volume de Gly acrescentado às reacções de síntese..... | 26 |
| Tabela 6. Volume de SAH adicionado às reacções de síntese | 27 |
| Tabela 7. Média do número de aminas primárias nos dendrímeros PAMAM e seus derivados. . | 33 |
| Tabela 8. Concentrações das soluções stock dos dendrímeros nativos e modificados. | 40 |

Lista de Acrónimos

| | | |
|---|-------------------|--|
| | AA | Antibiotic-Antimycotic / Antibiótico-antimicótico |
| | -Ac | Terminação acetilo |
| | Ac ₂ O | Anidrido acético |
| A | AFM | Atomic Force Microscopy / Microscopia de força atômica |
| | ALP | Alkaline phosphatase / Fosfatase alcalina |
| | Asc-2-P | Ácido ascórbico-2-fosfato |
| | BCA | Ácido bicinconínico |
| | bFGF-2 | basic Fibroblast Growth Factor / Factor de crescimento fibroblástico básico |
| B | BMPs | Proteínas morfogenéticas ósseas |
| | BMP-2 | Bone Morphogenetic Protein-2 / Proteína morfogenética óssea-2 |
| | BSP | Bone sialoprotein / Sialoproteína óssea |
| | cAMP | Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica |
| | C/EBP | CCAAT-enhancer-binding proteins / Proteínas estimuladoras de ligação à sequência CCAATT |
| | CE | Capillary Electrophoresis / Electroforese capilar |
| C | CD | Cluster of Differentiation |
| | CFU-Fs | Fibroblast colony-forming units / Unidades formadoras de colônias de fibroblastos |
| | Col1 | Colagénio tipo I |
| | Col1a1 | Cadeia α-1 do colagénio tipo I |
| | Col6a2 | Cadeia α-2 do colagénio tipo VI |
| | -COOH | Terminação carboxílica |
| D | DLS | Dynamic Light Scattering / Dispersão dinâmica da luz |
| | DMSO | Dimetilsulfóxido |
| | EDA | Etilenodiamina |
| E | EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid / Ácido etilenodiamino tetraacético |
| | ESI-MS | Electrospray Ionization Mass Spectrometry / |

| | | |
|---|--------------------|--|
| | | Ionização por electrospray acoplada à espectrometria de massa |
| | FABP4/aP2 | fatty acid binding protein 4/adipocyte P2 / Proteína de ligação aos ácidos gordos-4 |
| | FAB-MS | Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry / Ionização por bombardeamento com átomos rápidos acoplada à espectrometria de massa |
| F | FACS | Fluorescence-Activated Cell Sorting / Técnica de separação celular activada por fluorescência |
| | FBS | Foetal Bovine Serum / Soro bovino fetal |
| | FDA | Food and Drug Administration |
| | FTIR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy / Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier |
| | G | Geração |
| | Gly | Glicidol |
| G | GPC | Gel Permeation Chromatography / Cromatografia de permeação em gel |
| | GVHD | Graft-versus-host disease / Doença do enxerto contra o hospedeiro |
| | hMSCs | Human Mesenchymal Stem Cells / Células estaminais mesenquimais humanas |
| H | H ¹ NMR | Ressonância magnética nuclear de protão |
| | HPLC | High-performance liquid chromatography / Cromatografia líquida de alta eficiência |
| | HSCs | Hematopoietic Stem Cells / Células estaminais hematopoiéticas |
| | IBMX | Isobutilmetilxantina |
| I | ISCT | International Society for Cellular Therapy / Sociedade Internacional de Terapia Celular |
| | La | Laúrico |
| L | LDH | Desidrogenase láctica |
| | LPL | Lipoproteína lipase |
| | MACS | Magnetic-Activated Cell Sorting / Técnica de separação celular activada por magnetismo |
| M | MALDI-TOF-MS | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry / Espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização por desadsorção de matriz assistida a laser |
| | | Mesenchymal Stem Cells / |

| | | |
|---|------------------|--|
| | MSCs | Células estaminais mesenquimais |
| | MWCO | Molecular Weight cut-off |
| | -NH ₂ | Terminação amina |
| N | NMR-MS | Nuclear Magnetic Resonance-Mass Spectrometer / Ressonância magnética nuclear acoplada à espectrometria de massa |
| | | |
| O | -OH | Terminação hidroxilo |
| | Osx | Osterix |
| | OC | Osteocalcina |
| | ON | Osteonectina |
| | p | Passagem |
| P | PAGE | Polyacrylamide Gel Electrophoresis / Electroforese em gel de poliacrilamida |
| | PAMAM | Dendrímeros de poli(amidoamina) |
| | PBS | Phosphate buffered saline / Solução salina de tampão fosfato |
| | PEG | Polietilenoglicol |
| | PPAR γ 2 | peroxisome proliferator-activated receptor / Receptor ativador de proliferação de peroxissomas γ -2 |
| | PPI | Dendrímeros de propilenoimina |
| | | |
| R | RFU | Relative Fluorescence Units / Unidades de fluorescência relativa |
| | RGD | Arginina-glicina-aspartato |
| | RT-PCR | <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> |
| | Runx-2 | Runt-related transcription factor-2 |
| | SAH | Anidrido succínico |
| S | SANS | Small Angle Neutron Scattering / Dispersão de neutrões de pequenos ângulos |
| | SAXS | Small-Angle X-ray Scattering / Dispersão de raios-X de pequenos ângulos |
| | SEC | Size-Exclusion Chromatography / Cromatografia de exclusão molecular |
| | SEM | Scanning Electron Microscope / Microscopia electrónica de varrimento |
| | | |
| T | T3 | Triiodotrionina |
| | TEA | Trietilamina |
| | TGF- β 1 | Transforming Growth Factor- β 1 / Factor de transformação de crescimento beta-1 |
| | TNBS | Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico |

| | | |
|---|--------|--|
| | u.a. | Unidades arbitrárias |
| U | UPLC | Ultra Performance Liquid Chromatography / Cromatografia líquida de ultra eficiência |
| | UV-Vis | Ultraviolet-visible spectroscopy / Espectroscopia do ultravioleta-visível |

▪ **Introdução**

1. Células estaminais

A evolução da ciência tem dado origem a diversas descobertas que, de facto, alteraram a nossa forma de pensar e proporcionaram novas oportunidades para melhorar a qualidade de vida humana. Uma destas descobertas, ainda relativamente recente, diz respeito à existência de células estaminais [1]. Em menos de uma década, os cientistas foram capazes de isolar e expandir estas células em laboratório, reconhecendo de imediato o seu potencial de aplicação na medicina, nomeadamente na medicina regenerativa [1-3]. Face a situações de trauma, doença ou desgaste dos tecidos, o nosso organismo pode reagir de duas formas distintas: por regeneração ou por reparação. Por vezes, estas duas possibilidades podem ser confundidas, no entanto a regeneração resulta em novo tecido que é indistinguível do tecido original, tanto na sua organização estrutural como no conteúdo celular e função, já a reparação origina um elevado conteúdo de tecido fibroso, formação de cicatriz, organização estrutural limitada e funções comprometidas [4]. A terapia celular usando células estaminais surge neste contexto, com o intuito de ajudar a reparar, substituir ou regenerar tecidos ou órgãos [2, 5].

Por definição, as células estaminais são células precursoras imaturas dotadas de duas propriedades principais, ou seja, a capacidade de se auto-renovarem dando origem a mais células estaminais idênticas e de se diferenciarem ao longo de diferentes linhagens celulares quando expostas a condições apropriadas [2, 6-9]. Existem alguns parâmetros a ter em consideração quando se fala em células estaminais. Um deles é o potencial de diferenciação que irá permitir com que estas sejam classificadas de diferentes formas. As células totipotentes que resultam de óvulos fecundados logo a seguir à fertilização (fase de mórula), sendo células totalmente indiferenciadas que podem originar uma vasta gama de células do organismo, bem como anexos embrionários. As células pluripotentes que se podem diferenciar em células provenientes de qualquer das três camadas germinativas mas não originam anexos embrionários. As células multipotentes que podem, igualmente, dar origem a diferentes tipos celulares embora de entre um leque mais apertado. Por fim, as células unipotentes que se diferenciam somente num tipo celular, apresentando um potencial de diferenciação muito restrito [10-13]. Um outro parâmetro a considerar é a plasticidade que estas células parecem apresentar. De facto, embora envolvendo ainda alguma controvérsia, existem vários trabalhos publicados que mostram a capacidade das células estaminais não só em se diferenciar, mas também em reverter o seu estado de diferenciação e adquirir novas características fenotípicas [5, 6, 14-17].

As células estaminais podem ser divididas em duas categorias, embrionárias e adultas [3, 5-7, 13, 18, 19]. As células estaminais embrionárias derivam de embriões primitivos, normalmente da massa celular interna do blastócisto e apresentam a capacidade de gerarem qualquer célula diferenciada do organismo (são pluripotentes) [2, 3]. As características básicas de uma célula estaminal embrionária incluem a auto-renovação, a diferenciação em múltiplas linhagens *in vitro* e *in vivo*, um cariótipo normal e uma proliferação extensiva *in*

vitro sob condições controladas [12]. Por sua vez, as células estaminais adultas fazem parte de tecidos específicos do organismo adulto [2, 7], apresentando capacidade de se auto-renovarem e de se diferenciarem em diferentes linhagens celulares especializadas, permitindo a manutenção da integridade dos tecidos [12].

O potencial de diferenciação que as células estaminais embrionárias apresentam, em conjunto com a sua imortalidade, despertou o interesse da sua utilização como parte integral no tratamento clínico moderno, fazendo destas as predilectas para aplicações biomédicas [3]. No entanto, existe uma enorme controvérsia em redor da sua utilização, uma vez que é necessário recorrer à destruição de embriões para se conseguir obter estas células [16]. Com o intuito de eliminar estas preocupações, têm sido seguidas diversas estratégias no sentido de desenvolver novos métodos de obtenção de células estaminais humanas sem levar à destruição dos embriões. Assim, o uso de células estaminais provenientes de tecidos adultos é uma forma de contornar as questões éticas que podem surgir da utilização de células embrionárias em aplicações biomédicas [16].

Na Tabela 1 estão descritas algumas das vantagens e desvantagens da utilização de células estaminais adultas em relação às embrionárias [6].

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de células estaminais embrionárias vs células estaminais adultas.

| | Células estaminais embrionárias | Células estaminais adultas |
|---------------------|--|---|
| Vantagens | <ul style="list-style-type: none"> - Altamente expansíveis em cultura - Pluripotentes | <ul style="list-style-type: none"> - Fácil obtenção - Sem objecções éticas - Habilidade de expansão diferente - Uni-, multipotentes - Transplantação autóloga, sem necessidade de terapia imuno-supressiva - Aplicação clínica já realizada |
| Desvantagens | <ul style="list-style-type: none"> - Objecções éticas - Díficeis de isolar - Falta de marcadores específicos - Predisposição tumoral | <ul style="list-style-type: none"> - Falta de marcadores específicos |

As células estaminais adultas têm sido isoladas a partir de uma grande variedade de tecidos e, em geral, o seu potencial de diferenciação reflecte o seu ambiente local. Estas células, quando expostas a sinais apropriados, podem diferenciar-se em células especializadas [20]. O corpo humano possui um sistema endógeno responsável pela regeneração e reparação dos tecidos. Especula-se que nele estejam envolvidas as células estaminais que se encontram em tecidos adultos, existindo reservatórios de células regeneradoras prontas para serem recrutadas e diferenciadas em resposta a condições de doença/agressão dos tecidos [2, 20]. Exemplo disso, são as células estaminais que podem ser isoladas a partir da medula óssea.

Como é possível visualizar na Figura 1, a medula óssea apresenta na sua constituição células multipotentes que podem ser classificadas em células estaminais hematopoiéticas (HSCs) e células estaminais mesenquimais (MSCs). Apesar de, *in vitro*, os osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos demonstrarem ser originários das MSCs, a existência *in vivo* de um único progenitor para cada uma destas linhagens mesenquimais é uma pergunta que permanece sem resposta. As HSCs podem diferenciar-se em constituintes sanguíneos, como as plaquetas e os eritrócitos ou em células do sistema imunitário, como os monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos [21]. Actualmente, é escassa a informação sobre a biologia endógena da população de células estaminais adultas e o seu papel concreto na regeneração dos tecidos. O que é certo, é que estas células podem ser isoladas e expandidas em cultura com facilidade, passando por diversas gerações e mantendo sempre a sua capacidade de diferenciação. [2, 18, 22, 23].

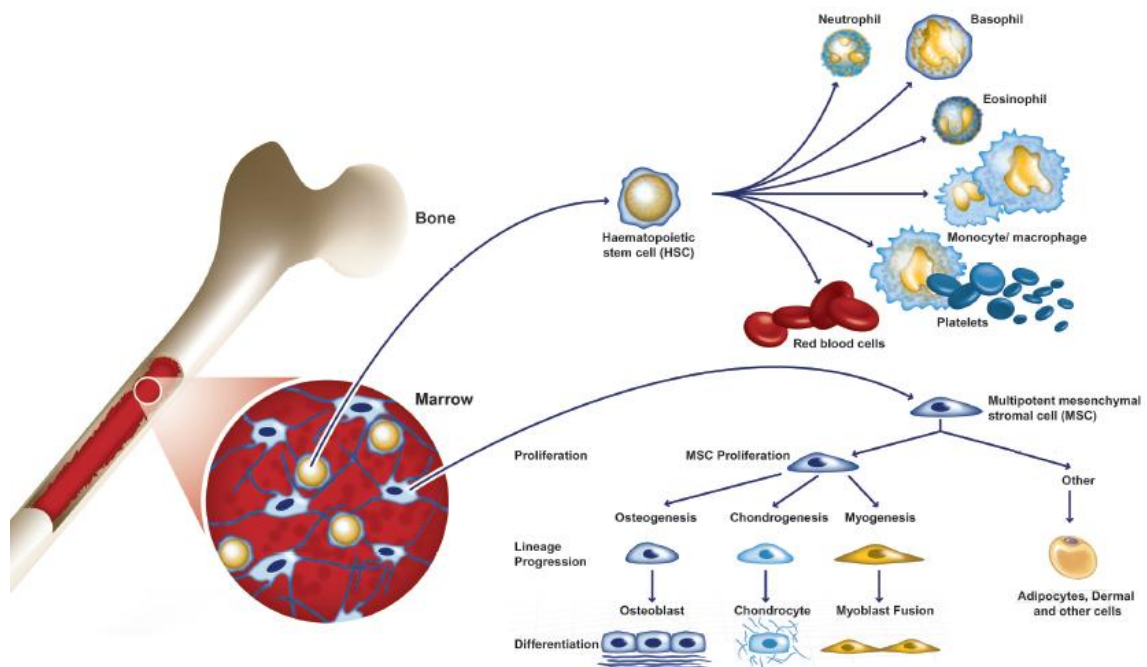


Figura 1. MSCs e HSCs na medula óssea e seu progresso celular [24].

2. Células estaminais mesenquimais

Foi no início do século XIX que surgiu a hipótese da existência de um precursor do estroma que originasse as células mesodérmicas da medula óssea [25]. Cohnheim [26] admitiu que os fibroblastos envolvidos no processo de cicatrização tinham origem na medula óssea. No princípio do século XX, Maximow [27] descreveu a relação existente entre os constituintes sanguíneos acabados de formar e a mesoderme durante o processo de embriogénese. Estas duas observações contribuíram para os primeiros indícios de que a medula óssea funciona como um reservatório de células que estão envolvidas no processo de cicatrização e na hematopoiese [18]. Becker e seus colaboradores (1963) [28] foram os primeiros a estudar as células estaminais. O seu estudo baseou-se na injeção de células precursoras da medula óssea em ratos que haviam sido irradiados, tendo-se verificado que os nódulos que se desenvolveram no fígado dos ratos eram proporcionais ao número de células injectadas. Este grupo concluiu que cada nódulo surgiu de uma única célula da medula. Mais tarde, descobriram que estas células eram detentoras de uma capacidade infinita de auto-renovação [2]. As MSCs foram identificadas e isoladas pela primeira vez por Friedenstein (1966) [29], seguindo-se variados trabalhos [30-36] com o intuito de estudar as propriedades destas células, tal como se pode visualizar no cronograma seguinte.

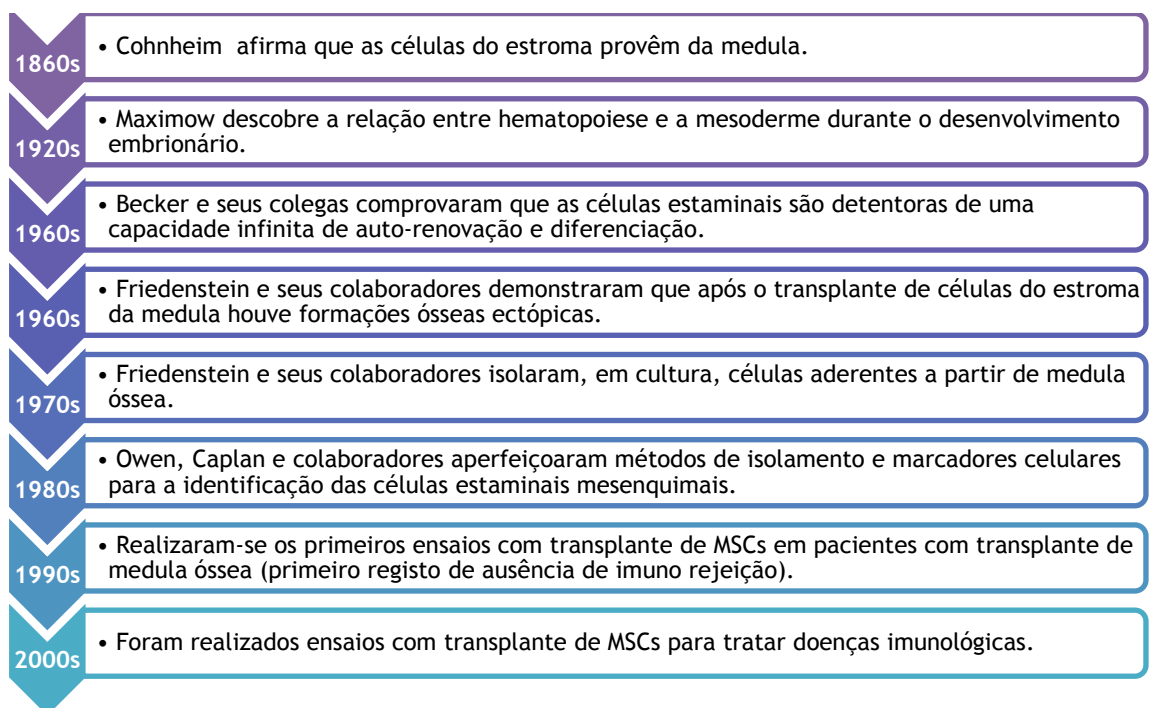


Figura 2. Breve historial sobre as MSCs [18].

O estudo de Friedenstein consistiu em incubar medula óssea em placas de cultura de plástico, removendo as células não aderentes após 4h. Foi obtida uma população celular heterogénea, com células aderentes que exibiam um fenótipo em forma de fuso e que se

multiplicavam rapidamente *in vitro*, originando unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-Fs) que demonstraram ser detentoras de um potencial multipotente, evidenciando possuir propriedades estaminais [2, 18, 22, 23].

As MSCs são excelentes candidatas para a terapia celular pois:

- i. são facilmente acessíveis;
- ii. são de simples isolamento;
- iii. têm capacidade proliferativa elevada;
- iv. são não imunogênicas e imunossupressivas.

Células similares foram isoladas a partir de tecidos mesenquimais diferentes incluindo, tendões, músculo esquelético, líquido e membrana sinovial, sangue periférico, coração, derme, pulmões, tecido adiposo, cartilagem, fígado, pâncreas, testículos, fluido amniótico, placenta, medula óssea, periosteio, cordão umbilical, e polpa dentária [2, 5, 10, 18, 21, 37-40].

Estas células têm a capacidade de se diferenciar em diferentes tecidos como, osso, gordura, cartilagem, tendões, tecido neuronal e músculo [2, 10, 20, 41]. Para além do seu potencial de diferenciação, estas desempenham um papel fundamental no suporte das HSCs na medula óssea [20]. As MSCs representam uma pequena fracção (0,001-0,01%), da população total de células nucleadas existentes na medula óssea [42]. Apesar da sua reduzida frequência, estas podem ser isoladas e expandidas com um elevado grau de eficiência, assim como diferenciadas em múltiplas linhagens celulares quando estimuladas por condições de cultura definidas. O grande interesse suscitado por estas células parte do enorme potencial que têm demonstrado em medicina regenerativa e na engenharia de tecidos. Os diversos estudos pré-clínicos e clínicos efectuados mostraram que se deve valorizar o potencial terapêutico das MSCs [20, 43, 44]. Alguns ensaios clínicos têm demonstrado que é possível efectuar o transplante de MSCs autólogas e alogénicas sem que ocorra o risco de rejeição imunitária [45, 46]. A capacidade imunossupressiva destas células também foi explorada no tratamento de um paciente de oito anos com a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), sendo este tratado com sucesso através do transplante de MSCs [47]. No entanto, apesar do seu valor terapêutico, ainda existem muitas questões por esclarecer [37]. Em primeiro lugar, a análise das suas características bioquímicas não traduz, necessariamente, a sua aplicabilidade *in vivo*. Consequentemente, é crítico mostrar que é possível direccionar e manipular a diferenciação das MSCs *in vivo* de modo a que estas expressem propriedades de cada tipo de tecido. Em segundo lugar, as descobertas feitas *in vitro* podem não mimetizar precisamente as vias de transdução de sinal que controlam o desenvolvimento das MSCs *in vivo*. Finalmente, é sempre importante lembrar que apesar dos roedores serem modelos excelentes estes não podem prever a resposta em modelos humanos. Apesar destas limitações, o estudo da diferenciação de MSCs tem revolucionado os conhecimentos na biologia celular [20, 37].

Devido à incoerência existente em relação aos termos e características que definem as células como MSCs, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) adoptou, em 2006, uma posição firme no que toca aos critérios mínimos para a sua identificação [48].

As MSCs necessitam, assim, de preencher três requisitos:

- i. Aderência ao substrato plástico em condições padrão de cultura;
- ii. Expressão/ausência de antígenos específicos;
- iii. Potencial multipotente de diferenciação *in vitro*.

Qualquer um destes critérios é aplicado somente em células estaminais mesenquimais humanas (hMSCs). Actualmente, a definição de um perfil fenotípico específico que permita caracterizar as MSCs continua a ser alvo de estudo. Na Tabela 2 é possível visualizar diversos parâmetros que são comumente considerados para as distinguir de outras células [18, 48].

Tabela 2. Testes fenotípicos utilizados para caracterizar as MSCs [18].

| Teste | Fenótipo conhecido | Método |
|-------------------------------|--|--|
| Formação de colónias | Formação de colónias após isolamento | Confirmação de CFU-F |
| Imunofenótipo | CD11-, CD14-, CD18-, CD31-, CD34-, CD40-, CD45-, CD56-, CD80-, CD86-, MHCII-, CD29+, CD44+, CD71+, CD73+, CD90+, CD105+, CD106+, CD120a+, CD124, CD166+, Stro-1+, ICAM-1+, MHC1+ | FACS |
| Multipotência <i>in vitro</i> | Diferenciação em múltiplas linhagens: - Osteogénica - Condrogénica - Adipogénica | Indução com meio de cultura específico |
| Formação ectópica de osso | Formação ectópica de osso na presença de minerais ósseos | Transplante subcutâneo |

De forma geral, as MSCs são isoladas a partir de aspirados de medula óssea. O método tradicional mais utilizado é o isolamento directo do explante, sendo este colocado numa placa de plástico com meio de cultura; as células distribuem-se e crescem aderindo ao substrato durante o período de cultura. Outro método também muito frequente é a utilização de uma centrifugação diferencial em gradiente utilizando soluções como o Percoll ou Ficoll, no qual a amostra de medula óssea é sujeita a um fraccionamento que permitirá a separação da população celular com base nas suas densidades, levando a um enriquecimento no número de células mononucleadas que contém as MSCs [2, 20, 21, 49, 50]. No entanto, ambas as técnicas são inespecíficas, daí serem também usadas outras técnicas complementares, como

a técnica de separação celular activada por magnetismo (*Magnetic-Activated Cell Sorting*, MACS) e a técnica de separação celular activada por fluorescência (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS), devido à sua maior resolução. No primeiro caso, o alvo são epítomos que são marcados com pequenas esferas magnéticas cobertas com anti-corpos, sendo aplicado de seguida um campo magnético externo de modo a separar as células marcadas positiva e negativamente. No segundo caso, uma população celular heterogénea é caracterizada e separada com base na intensidade de fluorescência que emite. O citómetro vai separar somente as células cuja dispersão de luz vá de encontro com os parâmetros estipulados [18, 21, 22, 38, 49, 50]. Apesar destas duas últimas técnicas oferecerem um isolamento mais eficaz, estas requerem equipamentos dispendiosos, fazendo assim com que as duas primeiras técnicas sejam as mais utilizadas [2, 20, 22, 38].

Após a extracção da fracção de células mononucleadas, estas são cultivadas em placas de cultura de plástico, aderindo ao substrato e adquirindo uma morfologia fusiforme [2, 20, 22, 38, 48]. Após uma fase de crescimento inicial demorada, as células dividem-se rapidamente, com um tempo de duplicação que depende do doador e da densidade celular inicial [22]. Normalmente, as culturas primárias são mantidas durante 12 dias com mudança de meio de cultura a cada 2-3 dias, o que permite a remoção das células hematopoiéticas não aderentes. As células aderentes crescem em monocamada e, ao atingirem cerca de 80% de confluência, realiza-se uma passagem de modo a expandir a cultura celular ou, alternativamente, efectua-se a sua criopreservação [38].

Actualmente, a capacidade de diferenciação *in vitro* das MSCs em osteoblastos, condrócitos e adipócitos tem vindo a ser estudada e caracterizada por diversos laboratórios [42, 51-59]. Em combinação com as vantagens de não apresentarem risco imunogénico, serem facilmente isoladas a partir de diferentes tecidos e expandidas *in vitro*, este facto permite que estas sejam uma fonte promissora de células para a medicina regenerativa e para a engenharia de tecidos [39].

2.1. Diferenciação osteogénica

De acordo com a organização mundial de saúde, a pretérita década foi denominada como “A década da articulação e do osso”. De facto, actualmente, tem-se verificado um aumento no número de casos de doenças ósseas, sendo estes normalmente tratados através de transplantes ósseos autólogos (isto é, com origem no próprio doente) [39, 53]. Contudo, os transplantes autólogos apresentam diversas desvantagens como a disponibilidade limitada e a morbilidade do sítio doador [2, 39]. Posto isto, é inevitável recorrer a alternativas distintas como por exemplo estratégias que permitam utilizar MSCs de modo a promover a regeneração óssea local e sistémica.

2.1.1. Morfologia e marcadores de diferenciação

Quando as MSC são induzidas, *in vitro*, a diferenciarem-se em osteoblastos (células capazes de sintetizar tecido ósseo), estas perdem a sua forma fibroblástica característica e adquirem uma forma cuboidal. Verifica-se uma maior produção de matriz extracelular, constituída principalmente por colagénio tipo I (Col1) e, num estado mais avançado, formam-se nódulos de mineralização que podem ser corados positivamente por técnicas histoquímicas adequadas como, por exemplo, as técnicas de von Kossa [60] (para a detecção de depósitos de fosfatos) e a da alizarina vermelha [61] (para a detecção de depósitos de cálcio). O conteúdo das culturas celulares em cálcio pode ainda ser determinado através de ensaios colorimétricos (espectrofotometria do visível). Outro marcador clássico da osteogénese é o aumento da actividade da fosfatase alcalina (ALP) que ocorre numa fase inicial do processo e que é, habitualmente, quantificado por determinação da velocidade de transformação do p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol (produto amarelo e passível de ser analisado espectrofotometricamente) [39].

Além dos parâmetros anteriormente referidos, é possível recorrer a marcadores génicos característicos da osteogénese. Um deles, o Runt-related transcription factor-2 (Runx-2), é o agente responsável pela expressão de genes ósseos específicos como os genes que codificam o osterix (Osx), a cadeia α -1 do colagénio tipo 1 (Col1a1), a osteocalcina (OC) e a sialoproteína óssea (BSP). Nem todos os marcadores de osteogénese ocorrem ao mesmo tempo. Como marcadores precoces da diferenciação osteogénica são conhecidos a actividade da ALP e a produção de Runx-2, Col1a1, factor de transformação de crescimento beta-1 (*Transforming Growth Factor-B1*, TGF-B1), osteonectina (ON) e proteína morfogenética óssea-2 (*Bone Morphogenetic Protein-2*, BMP-2). Por outro lado, a OC e a osteopontina (OPN) são normalmente expressas numa fase mais tardia [39, 62, 63].

2.1.2. Protocolos de diferenciação

De uma forma geral, os protocolos padrão utilizados para induzir a diferenciação osteogénica *in vitro* utilizam suplementos que são adicionados ao meio de cultura. Um dos métodos mais utilizados consiste em cultivar as MSCs na presença de dexametasona, β -glicerofosfato e ácido ascórbico. No entanto, é também possível utilizar outros aditivos como o TGF- β e proteínas da família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) [39]. Cada um destes suplementos é responsável por desencadear uma resposta por parte das MSCs.

A dexametasona pertence à família dos glucocorticóides, tendo-se revelado um elemento essencial na diferenciação destas células. Segundo o estudo desenvolvido por Walsh e seus colaboradores [64], provou-se que quantidades de glucocorticóides superiores às fisiológicas resultam na inibição da função osteoblástica. As MSCs foram cultivadas na presença e ausência de dexametasona com concentrações que variaram de 10 pM a 1 μ M, durante 28 dias. Este autor concluiu que a concentração crítica ideal de dexametasona era de

10 nM, a correspondente à fisiológica. Quando a concentração é superior (~100 nM) provoca a inibição da diferenciação osteogénica e leva à osteoporose induzida por glucocorticóides. Além disso, a proliferação celular também é negativamente afectada, devido à inibição da síntese de colagénio.

De modo a que ocorra a mineralização da matriz é necessária a presença de cálcio e fosfato, sendo estes obtidos a partir do β -glicerofosfato que é hidrolisado enzimaticamente através da ALP. Chung e seus colegas [65] demonstraram que a cultura de células fibroblásticas em meio com β -glicerofosfato leva à formação de minerais, aumenta a actividade da ALP, assim como a síntese de proteínas e fosfolípidos. A concentração recorrente neste tipo de diferenciação é na ordem dos 5 a 10 mM.

O ácido ascórbico desempenha um papel fundamental como cofactor na hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina no colagénio. Uma das dificuldades associadas ao ácido ascórbico é a sua instabilidade em solução, especialmente sob condições de cultura padrão (pH 7.5, 37°C, atmosfera com 5% CO₂). Por este motivo, o ácido ascórbico é adicionado fresco sempre que se mudam os meios de cultura ou, alternativamente, é utilizado um derivativo, o ácido ascórbico-2-fosfato (Asc-2-P) que se tem revelado estável sob condições padrão [66]. Estudos recentes demonstraram que a ausência de Asc-2-P leva à redução da expressão da ALP e inibição na acumulação de cálcio, por outro lado, a presença leva a um aumento da regulação dos genes relacionados com o ciclo celular e mitose [67]. Para este suplemento a concentração utilizada varia de 50 a 500 μ M [39].

Podem ser utilizados diversos protocolos com o intuito de induzir a diferenciação osteogénica *in vitro*. Alternativamente à adição directa no meio de cultura de proteínas capazes de induzir a diferenciação, é possível diferenciar as MSCs através de uma transfecção com plasmídeos contendo os genes codificantes dessas proteínas. Santos e colaboradores [68] mostraram ser possível a diferenciação de MSCs *in vitro* transfectando-as com o gene da BMP-2. Os autores mostraram, ainda, que não era necessário uma elevada eficiência de transfecção para a osteogénese ocorrer, havendo a contribuição para o processo de mecanismos de acção autócrina e parácrina.

2.2. Diferenciação adipogénica

Nos dias de hoje, a reparação de defeitos em tecidos moles pode ser necessária, como por exemplo, nos procedimentos de reconstrução mamária e no tratamento de queimaduras, ressecção tumoral e defeitos congénitos. A utilização de tecido adiposo autólogo não apresenta uma taxa muito elevada de sucesso, uma vez que este tecido é avascularizado, podendo então ser reabsorvido; por outro lado, não é adequada a utilização de um sistema de fluxo sanguíneo externo durante um longo período de tempo [39].

Tendo em conta o referido, a diferenciação de MSCs em células dos tecidos moles, como por exemplo em adipócitos, é uma estratégia que se mostra apelativa.

2.2.1. Morfologia e marcadores de diferenciação

A diferenciação adipogénica (ou seja, com vista à formação de adipócitos que são células responsáveis pela síntese e armazenamento da gordura no organismo) é um processo que é caracterizado por uma sequência de eventos [69]. Quando as MSCs são sujeitas à diferenciação adipogénica, estas perdem a sua forma fibroblástica e adquirem uma forma esférica, passando a expressar diversos tipos de proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, laminina e colagénio tipo I, III, IV, V e VI. Numa fase final, ocorre a acumulação intracelular de lípidos em vacúolos que podem ser corados positivamente com o corante óleo vermelho. A análise quantitativa dos lípidos pode ser obtida através da coloração dos vacúolos lipídicos com o óleo vermelho, posterior extracção do corante absorvido pelas células com isopropanol e doseamento por espectrofotometria. Outro marcador característico é o receptor activador de proliferação de peroxissomas γ -2 (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR γ 2) em combinação com proteínas estimuladoras de ligação à sequência CCAATT (*CCAAT-enhancer-binding proteins*, C/EBP) que são responsáveis pela indução e progressão da adipogénese.

Os marcadores precoces característicos da diferenciação adipogénica são a lipoproteína lipase (LPL) - enzima que hidroliza os triglicéridos nas lipoproteínas - e a cadeia α 2 do colagénio tipo VI (Col6a2). Por outro lado, a leptina (hormona produzida pelos adipócitos), a proteína de ligação aos ácidos gordos-4 (*fatty acid binding protein 4/adipocyte P2*, FABP4/aP2) e a adiponectina são normalmente expressas em etapas mais tardias do processo [39, 69].

2.2.2. Protocolos de diferenciação

A diferenciação adipogénica utiliza também diversos aditivos que são adicionados ao meio de cultura durante algumas semanas. Os mais utilizados são a dexametasona, a isobutilmetilxantina (IBMX), a insulina e a indometacina. Por outro lado, também é comum a utilização de triiodotrionina (T3), do ácido ascórbico-2-fosfato (Asc-2-P) e do factor de crescimento fibroblástico básico-2 (bFGF-2) [39].

A dexametasona irá ser responsável pela acumulação do PPAR γ e C/EBP, cruciais para a conversão adipogénica das células. O efeito positivo dos glucocorticóides na adipogénese pode ser acentuado pelo IBMX, pois este é o agente responsável pelo aumento da adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (cAMP). Este aditivo aumenta a expressão da PPAR γ 2 e LPL e diminui a expressão de marcadores osteogénicos. A insulina é utilizada de modo a aumentar a acumulação de triglicéridos através da estimulação da via Akt-TSC2-mTORC1. Por último, a indometacina é um fármaco anti-inflamatório não esteróide que inibe a ciclooxigenase bloqueando a diferenciação em osteoblastos e osteoclastos, enquanto promove o comprometimento para a linhagem adipogénica [39, 69, 70]. Tal como na diferenciação osteogénica, é possível utilizar diversos protocolos que permitam a indução da diferenciação

adipogénica, podendo variar, além dos aditivos anteriores, outros suplementos. É também possível recorrer a meios indutivos comercialmente disponíveis.

2.3. Aplicações terapêuticas

Como já referido anteriormente, tem sido sugerido que as MSCs fazem parte de um poderoso sistema de reparação de tecidos e que podem funcionar como agentes terapêuticos eficientes numa vasta diversidade de modelos experimentais [21]. Desde cedo sobressaiu a sua aplicabilidade na área da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa. Uma pesquisa rápida no site <http://clinicaltrials.gov>, efectuada a 3 de Outubro de 2011, revela um número de 191 estudos clínicos registados envolvendo MSCs, efectuados ou a efectuar, a nível mundial.

De uma forma particular, as MSCs têm sido administradas localmente (nos locais lesionados) com sucesso, em diversos modelos experimentais e humanos, como por exemplo, em defeitos ósseos e cartilagíneos, em fracturas mal-unidas, na osteogénese imperfeita, em feridas crónicas da pele e na promoção da neovascularização de tecidos isquémicos [2, 18, 21, 41].

Uma outra possibilidade é a administração sistémica de hMSCs, que se tem revelado uma abordagem com sucesso na diminuição dos níveis de glucose em ratos diabéticos, na reparação de danos ao nível dos rins e cérebro e no tratamento da osteogénese imperfeita e anemia aplásica severa [21, 22, 71]. Apesar das tentativas de administração sistémica de MSCs, uma das maiores limitações desta abordagem é o baixo número de células que realmente atingem o local desejado, aliado ao elevado número de células necessárias para administrar [18, 21].

Se o defeito a reparar é imenso a ponto de necessitar de transplante de todo um órgão e/ou tecido, a utilização de componentes de matrizes (scaffolds) para entrega de MSCs pode ser a abordagem mais apropriada. Este método encontra-se ainda em fase pré-clínica em humanos embora já existam estudos em modelos animais que têm demonstrado resultados promissores [21].

Uma outra potencial aplicação é a utilização de MSCs geneticamente modificadas de modo a entregar genes específicos num tecido ou organismo. Diversos modelos experimentais têm recorrido a MSCs para que expressem BMP-2 de modo a promover a reparação óssea e cartilagínea ou, também, para produção local de citocinas anti-inflamatórias de modo a combater doenças auto-imunes. As propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias das MSCs têm sido cruciais na utilização destas como ferramentas terapêuticas em estudos *in vivo* como, por exemplo, a GVHD e doenças auto-imunes [18, 21, 22, 72-74].

2.4. Potenciais efeitos secundários da terapia com MSCs

Segundo a Food and Drug Administration (FDA), é seguro proceder-se ao transplante de MSCs. Ao longo dos últimos dez anos, diversos ensaios clínicos com transplante de MSCs têm mostrado a ausência de efeitos adversos destas células sobre os seres humanos. Porém, estudos pré-clínicos recentes vieram evidenciar potenciais riscos a longo prazo associados à terapia com MSCs, que até então não haviam sido observados no curto período de tempo após a sua administração. Nestes riscos, incluem-se uma diferenciação celular distinta do inicialmente programado, bem como imunossupressão e estímulo de crescimento de tumores malignos. Estudos recentes em animais confirmam que as MSCs, quando administradas em ratos com glomerulonefrite aguda, podem implantar-se nos túbulos renais e diferenciarem-se de forma errada em adipócitos que impedem o funcionamento normal do rim. Estas podem também levar à formação de microembolias e, conseqüentemente, lesões pulmonares. No entanto, estes fenómenos só se verificaram em ratos imunocomprometidos, podendo não reflectir a resposta de hospedeiros imunocompetentes. Outra potencial complicação advém das propriedades imunossupressivas das MSCs que poderá afectar a imunovigilância a organismos patogénicos. O cancro é mais um dos possíveis efeitos adversos. Teoricamente, as MSCs podem ser cancerígenas através da sua transformação directa em células cancerígenas, da interferência no metabolismo dos agentes quimioterapêuticos e/ou da supressão da resposta imunitária anti-tumoral. Pacientes com elevado risco de malignidade ou de infecções oportunistas não são bons candidatos para terapia com MSCs [13, 18, 75]. É curioso, pois alguns investigadores estão a utilizar as características tumorais apresentadas pelas MSCs como abordagens terapêuticas através de modificações genéticas com fármacos citolíticos de modo a eliminar selectivamente o tecido cancerígeno [18, 76]. A utilização destas propriedades pode abrir novas oportunidades para a utilização de MSCs como agentes transportadores de fármacos no contexto do cancro.

3. Dendrímeros

A possibilidade de ajustar facilmente o tamanho, a topologia, a estrutura química e as propriedades dos polímeros através da síntese química levou, inevitavelmente, a uma difusão da sua utilização nas mais variadas aplicações científicas e tecnológicas, onde se incluem as aplicações biomédicas [77]. Enquanto os polímeros tradicionais possuem uma massa molecular indefinida (a eles estão associadas gamas de massas moleculares), os dendrímeros pertencem a uma classe de macromoléculas ramificadas, regulares, com características topológicas e estruturais únicas. O termo dendrímero foi inicialmente proposto por Tomalia em 1985 e deriva da palavra grega ‘dendron’, que significa ‘árvore’, sendo assim escolhida devido à sua disposição estrutural. Os dendrímeros são diferentes dos polímeros tradicionais uma vez que apresentam uma estrutura tridimensional hiper-ramificada, um baixo índice de polidispersão e elevada possibilidade de funcionalização [78-81]. Uma estrutura típica dendrítica é constituída por três diferentes partes topológicas:

- a. o núcleo central;
- b. o interior;
- c. a periferia

Os dendrímeros são constituídos por diversas camadas, chamadas de “gerações” (e representadas pela letra “G”), partindo do núcleo central até à periferia (ver Figura 3), classificando-se como nanomateriais por apresentarem dimensões à escala nanométrica.

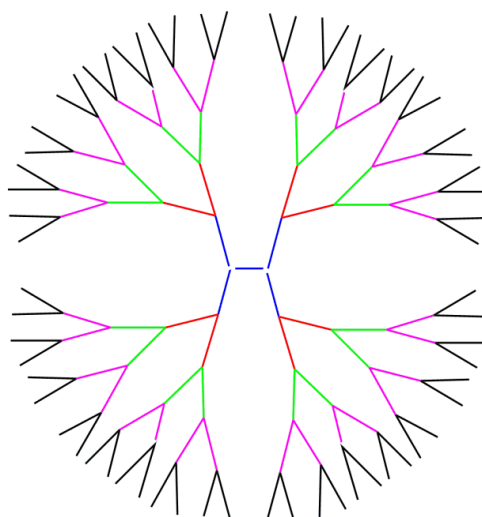


Figura 3. Representação esquemática de um dendrímero de geração 4 (G4). Nesta figura é possível visualizar o crescimento das gerações através das cores atribuídas, nomeadamente, a azul a geração 1 (G0), a vermelho a G1 e assim sucessivamente.

No núcleo central é possível encapsular diversas espécies químicas protegendo-as do ambiente exterior; o interior, que é constituído por unidades repetitivas, é responsável pela existência de espaços vazios permitindo um espaço flexível onde também podem ser

incorporadas diversas moléculas; a periferia ou grupos funcionais periféricos podem ser modificados permitindo uma interação com o ambiente externo e definindo assim as propriedades macroscópicas do dendrímero. Em contraste com os polímeros lineares, ramificados e reticulados, a estrutura tridimensional dos dendrímeros conduz a propriedades únicas e, assim, a uma ampla gama de potenciais aplicações [77, 78].

As macromoléculas dendríticas têm tendência a aumentar linearmente em diâmetro e a adoptar uma forma mais globular e simétrica conforme o aumento da geração. De forma geral, os dendrímeros de G0 até G3 apresentam uma estrutura aberta, flexível e assimétrica, com zonas internas desprotegidas, e devido à liberdade e mobilidade dos seus ramos é possível acomodar outras moléculas na sua superfície. Porém, os dendrímeros de G4 até G6 usufruem de uma estrutura globular e contêm espaços internos vazios mais protegidos do ambiente externo, podendo assim funcionar como transportadores de fármacos. Acima de G7, os dendrímeros assemelham-se a estruturas esféricas sólidas ou partículas cujo acesso interno é impossível, com superfícies altamente densas [77-79]. A maioria dos estudos têm sido realizados com dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM), uma vez que são comercializados desde a G0 à G10, com uma grande variedade de grupos funcionais terminais (ex: amina, hidroxilo e ácido carboxílico) e pesos moleculares (Tabela 3).

Tabela 3. Dados relativos a diferentes gerações de dendrímeros PAMAM com terminações amina (-NH₂, comercialmente disponíveis): peso molecular, diâmetro e número de grupos à superfície.

| Geração | Peso molecular (Da) | Diâmetro (Å) | Número de grupos à superfície |
|---------|---------------------|--------------|-------------------------------|
| 0 | 517 | 15 | 4 |
| 1 | 1430 | 22 | 8 |
| 2 | 3256 | 29 | 16 |
| 3 | 6909 | 36 | 32 |
| 4 | 14214 | 45 | 64 |
| 5 | 28826 | 54 | 128 |
| 6 | 58048 | 67 | 256 |
| 7 | 116493 | 81 | 512 |
| 8 | 233383 | 97 | 1024 |
| 9 | 467162 | 114 | 2048 |
| 10 | 934720 | 135 | 4096 |

3.1. Síntese de dendrímeros

Os dendrímeros são sintetizados através de reacções graduais totalmente controláveis. Existem duas estratégias principais que são utilizadas para sintetizar estruturas dendríticas, nomeadamente, a abordagem divergente e a abordagem convergente.

3.1.1. Método divergente

O método divergente foi introduzido por Tomalia, Newkome e colaboradores no início de 1980 [82, 83]. Neste método, a síntese dos dendrímeros ocorre através de uma abordagem de camada-a-camada que se inicia a partir do núcleo central em direcção à periferia, utilizando duas operações básicas: (1) o acoplamento das unidades repetitivas, e (2) a desprotecção ou modificação da terminação dos grupos periféricos de modo a criar novos grupos reactivos; este procedimento pode ser designado por ‘crescimento de uma geração’. A primeira geração é formada simplesmente pela ligação de uma unidade ramificada ao núcleo central; no caso da segunda geração, os grupos periféricos da primeira geração reagem com as unidades ramificadas seguintes e assim sucessivamente. A desprotecção ou modificação dos novos grupos funcionais anexados resulta na geração seguinte. O número de grupos funcionais periféricos aumenta exponencialmente com o aumento da geração.

3.1.2. Método convergente

Hawker e Fréchet foram os pioneiros na síntese convergente [84]. Este método consiste na construção de diversos ramos que posteriormente são acoplados ao núcleo central, sendo assim os dendrímeros construídos a partir da periferia em direcção ao núcleo. As vantagens deste método assentam no baixo número de reacções simultâneas que ocorre em cada passo, tornando menor a probabilidade de produtos defeituosos. Contudo, à medida que a geração aumenta, os grupos reactivos tornam-se menos acessíveis diminuindo assim a reactividade [77-81, 85-87].

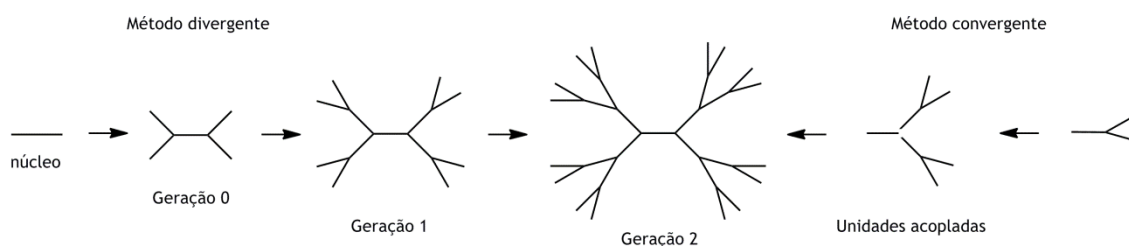


Figura 4. Síntese divergente e convergente de dendrímeros. Neste esquema é possível visualizar, de forma simplificada, as duas principais estratégias utilizadas na síntese de dendrímeros. Na primeira, a construção começa no núcleo em direcção à periferia; na segunda, a construção faz-se da periferia em direcção ao núcleo.

3.2. Propriedades dos dendrímeros

Ao longo dos últimos anos, tem-se verificado um interesse crescente na utilização de dendrímeros para fins terapêuticos e de diagnóstico [77, 85]. À medida que avança o conhecimento sobre as relações entre a arquitectura e composição dos dendrímeros com a sua biocompatibilidade, retenção e distribuição no organismo e eficácia terapêutica/como

agente de diagnóstico, é possível sintetizar dendrímeros ou sistemas derivados de dendrímeros com maior especificidade e funcionalidade [85]. Uma vez que cada passo da síntese é independente dos restantes, é possível introduzir características desejáveis nos dendrímeros através das unidades repetitivas que vão sendo adicionadas. Tais características incluem: regiões hidrofóbicas ou hidrofílicas, presença de grupos reactivos ou funcionais, propriedades quelantes, núcleos e revestimento diferentes, condutividade eléctrica, divergência hemisférica, afinidade bioespecífica, fotoactividade, ou ainda a adição de pontos de clivagem em locais específicos do dendrímero [77, 79, 88, 89].

3.2.1. Propriedades físico-químicas

Ao compararmos os dendrímeros com os polímeros tradicionais lineares, ramificados ou reticulados, podemos ver que eles apresentam propriedades físico-químicas únicas e atractivas do ponto de vista das aplicações, a salientar:

- a. Apresentam, de uma forma geral, uma elevada homogeneidade estrutural e química;
- b. As propriedades farmacocinéticas e a sua biodistribuição podem ser alteradas controlando o seu tamanho e conformação;
- c. Usufruem de uma multivalência e possibilidade de funcionalização selectiva, devido ao crescimento exponencial do número de grupos periféricos à medida que a geração aumenta, assim como pela adição de diversos grupos funcionais [85].

Apesar das suas vantagens, os dendrímeros defrontam-se com os mesmos obstáculos que os polímeros lineares encontram ao transitarem da prática laboratorial para a clínica. Para serem totalmente aceites, os dendrímeros devem poder ser sintetizados e funcionalizados com baixos custos de produção e, adicionalmente, passar por um rigoroso controlo de qualidade [77, 85].

3.2.2. Propriedades biológicas

De modo a utilizar os dendrímeros em aplicações biomédicas, estes devem satisfazer alguns requisitos mínimos, tal como apresentarem baixa toxicidade (ou ausência de toxicidade). Os dendrímeros de elevada geração apresentam uma estrutura com superfície densamente compacta e um espaço interior relativamente livre, que se encontra isolado do ambiente externo. Portanto, a citotoxicidade destes dendrímeros é predominantemente determinada pela natureza dos seus grupos periféricos. Para aplicações biomédicas, adicionalmente à baixa citotoxicidade, a superfície dos dendrímeros deve apresentar uma elevada solubilidade aquosa [78]. Os dendrímeros têm-se tornado excelentes candidatos como agentes transportadores de fármacos e genes, tendo sido feitos estudos para relacionar o tamanho do dendrímero, carga e composição com propriedades biológicas relevantes, como

são a interação com as bicamadas lipídicas, a citotoxicidade, a internalização celular, a retenção sanguínea, a biodistribuição e a filtração renal [85].

Durante os últimos anos, têm sido realizados diversos estudos sistemáticos com o propósito de compreender as relações entre a composição, arquitectura e propriedades dos dendrímeros com vista a melhorar a sua biocompatibilidade [85].

3.3. Aplicações biomédicas

Os dendrímeros têm sido empregues numa enorme diversidade de aplicações biomédicas, a destacar [77, 79, 87, 90]:

- a. Como transportadores de fármacos e genes. Através da ligação dos fármacos aos dendrímeros é possível aumentar a sua solubilidade aquosa, o seu tempo de circulação, direccioná-los para determinados tecidos, ultrapassar barreiras biológicas e diminuir o metabolismo do fármaco;
- b. Como agentes para criar ou aumentar o contraste em imagiologia médica. A obtenção de uma imagem *in vivo* de tecidos e órgãos é uma ferramenta de extrema importância em biomedicina, além de se tratar de um método não invasivo e que proporciona informação abundante;
- c. *Scaffolds* para reparação/engenharia de tecidos. Embora a maioria das aplicações refiram os dendrímeros como compostos homogéneos e solúveis, também podem ser utilizados como estruturas insolúveis de apoio para entrega de moléculas.

Além das aplicações anteriormente referidas, dendrímeros do tipo PAMAM e propilenoimina (PPI), com diferentes grupos terminais, têm sido utilizados/estudados em ressonância magnética, modelação/mimetização de proteínas/enzimas, estudos neuroendocrinológicos, catálise, sensores, baterias, óptica, electrónica, produtos de cuidado pessoal e cosmética e, ainda, agentes de descontaminação e anti-virais [78, 80, 85]. Um exemplo de aplicação dos dendrímeros que está, já, disponível no mercado, é o produto VivaGel® que actua como agente anti-microbiano e anti-viral em produtos para a saúde sexual [91].

4. Objectivos gerais da Tese

Neste capítulo, começou-se por mostrar a importância das células mesenquimais estaminais em áreas como a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos, passando-se, depois, a uma descrição das propriedades e aplicações dos dendrímeros na área biomédica. De facto, à semelhança do que acontece com outros nanomateriais, é cada vez mais frequente a utilização de dendrímeros em associação com as MSCs, no sentido de se encontrarem novas abordagens terapêuticas e metodologias de diagnóstico. Neste contexto, é importante avaliar a influência dos dendrímeros nas propriedades das MSCs e, em particular, verificar se a capacidade de diferenciação destas células não é afectada na presença desses materiais - é este o principal objectivo desta tese de mestrado. Recentemente, têm sido feitos estudos desta natureza com MSCs mas que envolvem outros nanomateriais que não os dendrímeros [92-95]. Que seja do conhecimento da autora desta tese, até ao momento, não existem trabalhos publicados que tenham feito esta avaliação para os dendrímeros e, em particular, para os dendrímeros PAMAM.

Em maior detalhe, esta tese teve como objectivos:

- a) Modificar dendrímeros PAMAM contendo grupos amino ($-NH_2$) à superfície (várias gerações), utilizando métodos de síntese química adequados, por forma a obter dendrímeros com diferentes grupos funcionais na periferia (nomeadamente, grupos acetilo, hidroxilo e ácido carboxílico; as novas moléculas assim obtidas foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear e o grau (extensão) de funcionalização obtido foi determinado;
- b) Avaliar, *in vitro*, o efeito dos dendrímeros PAMAM na viabilidade (para o efeito, foi usado o método de redução da resazurina) e capacidade de diferenciação osteogénica e adipogénica das MSCs (tal foi realizado através de marcadores bioquímicos e histoquímicos clássicos usados na caracterização de culturas de osteoblastos e adipócitos); neste âmbito, foi estudado o efeito do tipo de funcionalização à superfície, do número de geração e da concentração dos dendrímeros.

▪ **Capítulo I**

**Modificação da superfície de dendrímeros PAMAM com
diferentes grupos funcionais**

1. Introdução

O termo dendrímero pode-se referir a uma estrutura geométrica ou a moléculas individuais com uma arquitectura tipo árvore que consiste em diversas unidades ramificadas conectadas de forma simétrica à volta de um núcleo central [96]. Muitas das aplicações biomédicas dos dendrímeros envolvem a ligação covalente de outras moléculas à superfície do dendrímero ou a sua inclusão dentro da estrutura ramificada. Estas moléculas podem funcionar como ligandos com afinidade específica para determinadas estruturas biológicas, ligandos radioactivos ou fluorescentes (agentes de detecção) ou constituírem compostos farmacologicamente activos [79]. Estes ligandos visam melhorar as propriedades dos dendrímeros em aplicações biológicas, tais como aumentar a sua eficiência como agentes de transfecção, diminuir a sua citotoxicidade, melhorar a sua internalização, bem como ajudar o seu direccionamento estruturas biológicas ou as células alvo, quaisquer que sejam as condições, *in vitro* ou *in vivo* [78].

Os dendrímeros PAMAM pertencem a uma família de nanopartículas sintéticas, altamente ramificadas, com peso molecular reduzido, que crescem a partir de uma molécula central, a etilenodiamina (EDA) [97]. Estes possuem aminas primárias na extremidade de cada ramo e aminas terciárias em cada ponto de ramificação [97, 98]. O elevado nível de controlo sobre a arquitectura, tamanho, forma, comprimento dos ramos, densidade e grupos terminais tornam os dendrímeros PAMAM agentes ideais para aplicações biomédicas [99]. As propriedades desejadas podem ser obtidas através da modificação dos grupos terminais [78, 100]. Os dendrímeros PAMAM apresentam uma boa solubilidade aquosa e podem apresentar diferentes cargas. Quando em solução, podem ser policatiónicos ou polianiónicos, dependendo da sua estrutura, grupos terminais e parâmetros da solução, como o pH, solvente, temperatura e concentração [80, 96, 101]. A pH fisiológico (7.4), a maioria das aminas primárias encontra-se protonada e, a pH 4, também todas as aminas terciárias. O nível de protonação dos dendrímeros PAMAM pode ser modificado através da alteração do pH da solução que, por sua vez, irá afectar significativamente a sua estrutura [98, 102]. A pH elevado (pH>10) os dendrímeros PAMAM adoptam uma conformação mais globular, uma vez que a molécula se torna neutra. O pH baixo leva a conformações estendidas devido às repulsões electrostáticas entre as cargas positivas dos grupos amina [80].

Estes dendrímeros são considerados seguros e não imunogénicos e podem, ainda, funcionar como vectores poliméricos catiónicos com elevada eficiência para entrega de material genético nas células [88, 103, 104]. No que toca à citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM, normalmente, é considerada dependente da dose/concentração, exposição, duração, geração e da natureza dos seus grupos terminais (Figura 5) [99].

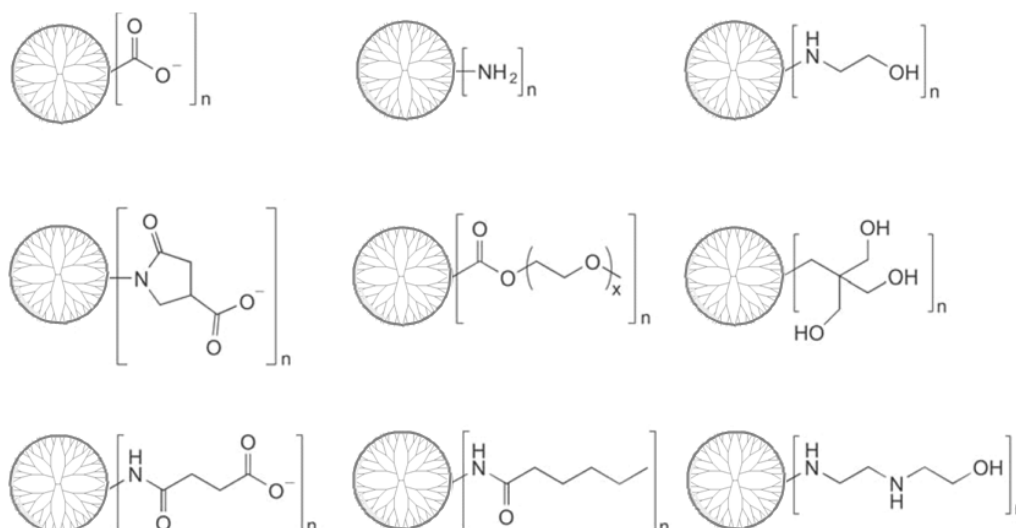


Figura 5. Dendrímeros PAMAM com diferentes grupos terminais. Alguns destes grupos são responsáveis por adicionar características funcionais ou reactivas, enquanto outros modificam somente a solubilidade.

Segundo o trabalho desenvolvido por Domanski [105] e por Dobrovolskaia [106], os dendrímeros catiónicos com grupos de superfície carregados positivamente desestabilizam a membrana celular provocando a sua lise e também possuem um efeito hemolítico. Os dendrímeros aniônicos com grupos carboxilo não são citotóxicos e quando incubados com eritrócitos em plasma sanguíneo formam agregados celulares. Os dendrímeros de elevada geração (superiores a G5) são os mais citotóxicos. A carga e a distribuição de grupos funcionais desempenham um papel fundamental na determinação das propriedades físico-químicas do produto final e influenciam as interações com as entidades biológicas [78, 80].

A maior parte dos estudos com dendrímeros PAMAM tem como base parâmetros como o seu peso molecular teórico. Os parâmetros moleculares (ex: o número de aminas primárias e terciárias e a massa molecular) dos dendrímeros PAMAM e seus derivados são deduzidos a partir de estruturas teóricas, o que leva à possibilidade de inconsistência com amostras reais de polímeros que, naturalmente, apresentam defeitos estruturais [100]. Ao modificar a superfície do dendrímero, frequentemente, surgem novas estruturas conjugadas complexas fazendo com que sejam necessárias metodologias que permitam uma caracterização analítica.

A caracterização de dendrímeros é uma tarefa árdua, tendo sido usadas diversas técnicas para esse efeito, tais como: ressonância magnética nuclear acoplada à espectrometria de massa (*Nuclear Magnetic Resonance-Mass Spectrometer*, NMR-MS), cromatografia de permeação em gel (*Gel Permeation Chromatography*, GPC), cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography*, HPLC), cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC), ionização por bombardeamento com átomos rápidos acoplada à espectrometria de massa (*Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry*, FAB-MS), ionização por electrospray acoplada à

espectrometria de massa (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ESI-MS), espectroscopia do ultravioleta-visível (*Ultraviolet-visible spectroscopy*, UV-Vis), espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização por desadsorção de matriz assistida a laser (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF-MS), microscopia electrónica e de força atómica, dispersão de raios-X de pequenos ângulos (*Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS), dispersão de neutrões de pequenos ângulos (*Small Angle Neutron Scattering*, SANS), dispersão dinâmica da luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), titulação potenciométrica, cromatografia de exclusão molecular (*Size-Exclusion Chromatography*, SEC), electroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE) e electroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE) [80, 96, 103, 107]. A caracterização dos dendrímeros deve envolver vários métodos diferentes para ser o mais completa possível. Por exemplo, a aplicação de métodos de partição de fase como a cromatografia e a electroforese são úteis, mas não fornecem informação acerca da natureza dos defeitos. Os métodos de espectrometria de massa podem fornecer pesos moleculares precisos, mas não proporcionam informação quantitativa suficiente em relação à distribuição dos materiais. A Ressonância Magnética Nuclear é uma ferramenta crucial para a análise da qualidade e pureza dos dendrímeros, mas não consegue determinar a sua distribuição molecular [96].

Nesta fase do trabalho, o objectivo principal foi modificar a superfície de dendrímeros PAMAM de diferentes gerações com diferentes grupos funcionais, tendo como base o trabalho de Shi e colaboradores [100]. Nesta etapa, utilizaram-se dendrímeros PAMAM com terminações amina (PAMAM-NH₂), de gerações G2, G5 e G7, que funcionaram como materiais de partida, sendo posteriormente sintetizados dendrímeros PAMAM com grupos terminais acetilo (PAMAM-Ac), hidroxilo (PAMAM-OH) e ácido carboxílico (PAMAM-COOH) (Figura 6).

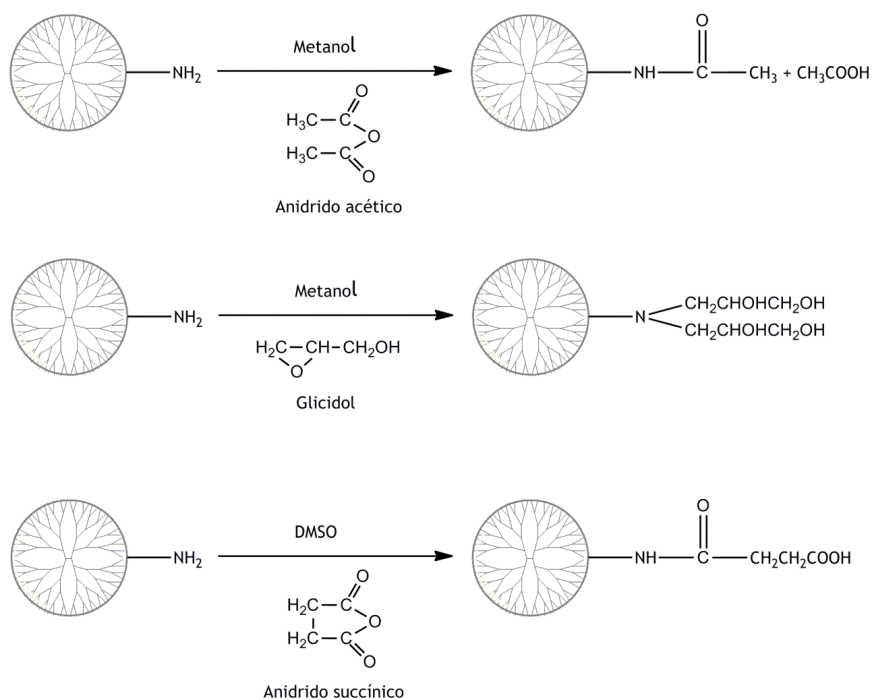


Figura 6. Representação esquemática das reacções de síntese de modo a modificar a superfície dos dendrímeros PAMAM- NH_2 de G2, G5 e G7.

Foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear de protão (H^1 NMR) para a caracterização dos dendrímeros obtidos e a extensão da modificação da superfície dos dendrímeros foi avaliada através da determinação experimental do conteúdo de aminas primárias por ligação ao ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS).

2. Secção Experimental

2.1. Materiais e reagentes

Os dendrímeros PAMAM geração 2, 5 e 7, com núcleos de EDA e terminação amina, foram adquiridos à Dendritech, Inc. (EUA), em solução de metanol. O anidrido acético (Ac_2O), a trietilamina (TEA), o anidrido succínico (SAH), o glicidol (Gly) e todos os restantes materiais e solventes foram comprados à SIGMA-ALDRICH. A água utilizada foi purificada através do sistema de purificação Mili-Q Direct 8. A membrana de diálise com um *cut-off* molecular (*Molecular Weight cut-off*, MWCO) de 100-500 e 12-14000 Daltons (Da), foi obtida da MEDICELL International e da Spectrum Laboratories, respectivamente.

2.2. Modificação da superfície de dendrímeros PAMAM

2.2.1. Introdução de grupos terminais acetilo (PAMAM-Ac)

Num balão de fundo redondo, foi dissolvida uma massa adequada de dendrímero PAMAM-NH₂ em 5 mL de metanol e, de seguida, após adição de TEA, a solução foi colocada sob agitação. Posteriormente, foi adicionado à mistura anterior, Ac_2O (razão molar de $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2 = 4:1$) em 5 mL de metanol. A reacção ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação, durante 24 h. O metanol foi então removido da mistura num evaporador rotativo, procedendo-se de seguida à diluição do produto em 5 mL de água ultra-pura e à diálise (para G2 membrana com MWCO 100-500 e para G5 e G7 membrana com MWCO 12-14000 Da) em água destilada (6 vezes, 2 L), durante 2 dias, de modo a remover o excedente de reagentes que não reagiram e os sub-produtos. A água foi depois removida do produto final e este colocado a -20°C .

Na Tabela 4, é possível ver quais as quantidades de TEA e Ac_2O correspondentes às massas de dendrímeros pesadas.

Tabela 4. Volume de TEA e Ac_2O adicionados a cada reacção de síntese.

| Dendrímero | Massa (mg) | TEA (μL) | Ac_2O (μL) |
|------------|------------|-----------------------|---|
| G2-Ac | 12,16 | 33,28 | 22,53 |
| G5-Ac | 7,13 | 16,80 | 11,40 |
| G7-Ac | 9,77 | 23,90 | 16,20 |

2.2.2. Introdução de grupos terminais hidroxilo (PAMAM-OH)

Num balão de fundo redondo, uma massa adequada de dendrímero PAMAM-NH₂ foi dissolvida em 5 mL de metanol, sendo depois a solução colocada sob agitação. Posteriormente, foi adicionado à mistura, Gly (razão molar de $\text{Gly}/\text{NH}_2 = 4:1$) em 5 mL de

metanol. A reacção ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação, durante 24 h. O metanol foi então removido da mistura num evaporador rotativo, procedendo-se de seguida à diluição do produto em 5 mL de água ultra-pura e à diálise (para G2 membrana com MWCO 100-500 e para G5 e G7 membrana com MWCO 12-14000 Da) em água destilada (6 vezes, 2 L), durante 2 dias, de modo a remover o excedente de reagentes que não reagiram e os sub-produtos. A água foi depois removida do produto final e este colocado a -20°C.

É possível visualizar, na Tabela 5, os volumes adicionados de Gly correspondentes à quantidade de dendrímero pesada.

Tabela 5. Volume de Gly acrescentado às reacções de síntese.

| Dendrímero | Massa (mg) | Gly (µL) |
|------------|------------|----------|
| G2-OH | 11,24 | 14,65 |
| G5-OH | 8,67 | 9,7 |
| G7-OH | 11,93 | 13,91 |

2.2.3. Introdução de grupos terminais ácido carboxílico (PAMAM-COOH)

• Dendrímeros G2-COOH

Num balão de fundo redondo, foram dissolvidas 10,02 mg de dendrímero PAMAM-NH₂ em 5 mL de metanol e a solução foi colocada sob agitação. Posteriormente, foi adicionado à mistura anterior 19,7 mg de SAH (razão molar de SAH/-NH₂ = 4:1) em 5 mL de metanol. A reacção ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação, durante 24 h. O metanol foi então removido da mistura num evaporador rotativo procedendo-se, de seguida, à diluição do produto em 5 mL de água ultra-pura e à diálise (MWCO 100-500 Da) em água destilada (6 vezes, 2 L), durante 2 dias, de modo a remover o excedente de reagentes que não reagiram e sub-produtos. A água foi depois removida do produto final e este colocado a -20°C.

• Dendrímeros G5-COOH e G7-COOH

Num balão de fundo redondo, foi dissolvida uma porção adequada de dendrímero PAMAM-NH₂ em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução foi colocada sob agitação. Posteriormente, foi adicionada à mistura anterior uma massa de SAH (razão molar de SAH/-NH₂ = 4:1) em 5 mL de DMSO. A reacção ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação, durante 24 h. À mistura foi adicionado 5 mL de água ultra-pura, realizando-se, depois, uma diálise (MWCO 12-14000 Da) em água destilada (6 vezes, 2 L), durante 2 dias, de modo a remover o excedente de reagentes que não reagiram e sub-produtos. A água foi depois removida do produto final e este colocado a -20°C.

De acordo com as massas pesadas de dendrímero, é possível visualizar na Tabela 6 o valor correspondente de SAH.

Tabela 6. Volume de SAH adicionado às reacções de síntese

| Dendrímero | Massa (mg) | SAH (μL) |
|------------|------------|-----------------------|
| G5-COOH | 11,42 | 19,36 |
| G7-COOH | 11,23 | 19,75 |

2.3. H^1 NMR

Os dendrímeros PAMAM e seus derivados foram caracterizados por H^1 NMR, utilizando água deuterada (D_2O) como solvente, num espectrómetro de NMR (Bruker Avance II de 400 MHz). Os desvios químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

2.4. Determinação experimental do conteúdo de aminas primárias dos dendrímeros

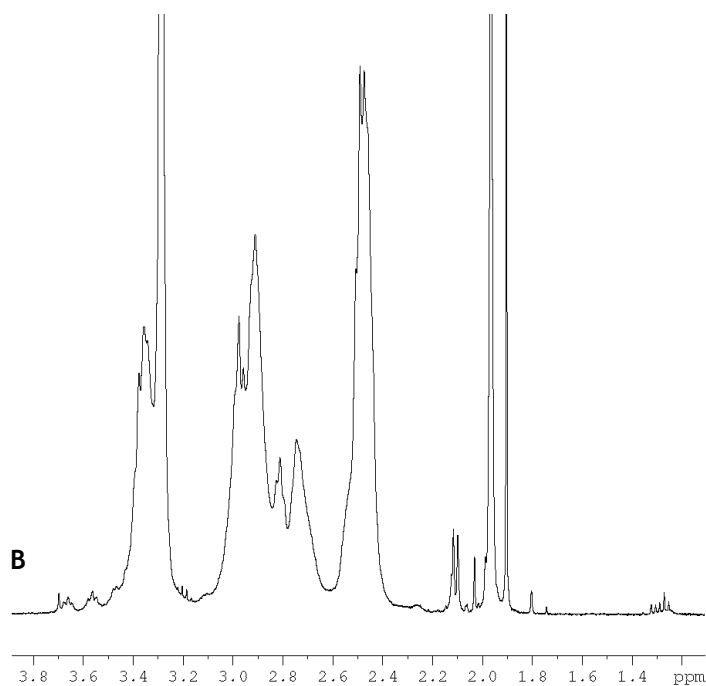
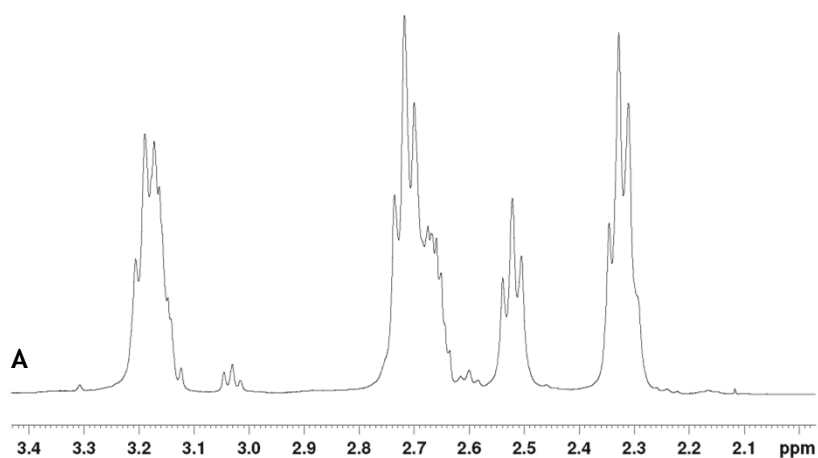
O número de aminas primárias dos dendrímeros foi determinado por espectrofotometria após a reacção dos grupos aminas livres com o TNBS, como descrito na literatura [108], e utilizando uma recta de calibração de glicina. As soluções padrão e as amostras foram diluídas em tampão de tetraborato de sódio 0,1 M, obtendo-se um volume final de 1mL. A cada padrão e amostra adicionou-se 25 μL de TNBS (0,03 M) diluído em água. Após a incubação no escuro, à temperatura ambiente, durante 25 min, a absorção foi medida a 420 nm num espectrofotómetro UV-VIS (GBC-Cintra 40).

Foram realizadas medições em triplicado e de forma independente.

3. Resultados e discussão

3.1. ^1H NMR

Com o intuito de confirmar a modificação da superfície dos dendrímeros PAMAM-NH₂, procedeu-se à caracterização por espectroscopia ^1H NMR, utilizando D₂O como solvente, obtendo-se os espectros expostos nas Figuras 7, 8 e 9. Os estudos por NMR proporcionaram informação qualitativa sobre os derivados dos dendrímeros sintetizados, sendo esta independente da geração. A única diferença a ter em consideração é que, com o aumento da geração, mais amplos foram os picos de NMR e menor a sua resolução [100].



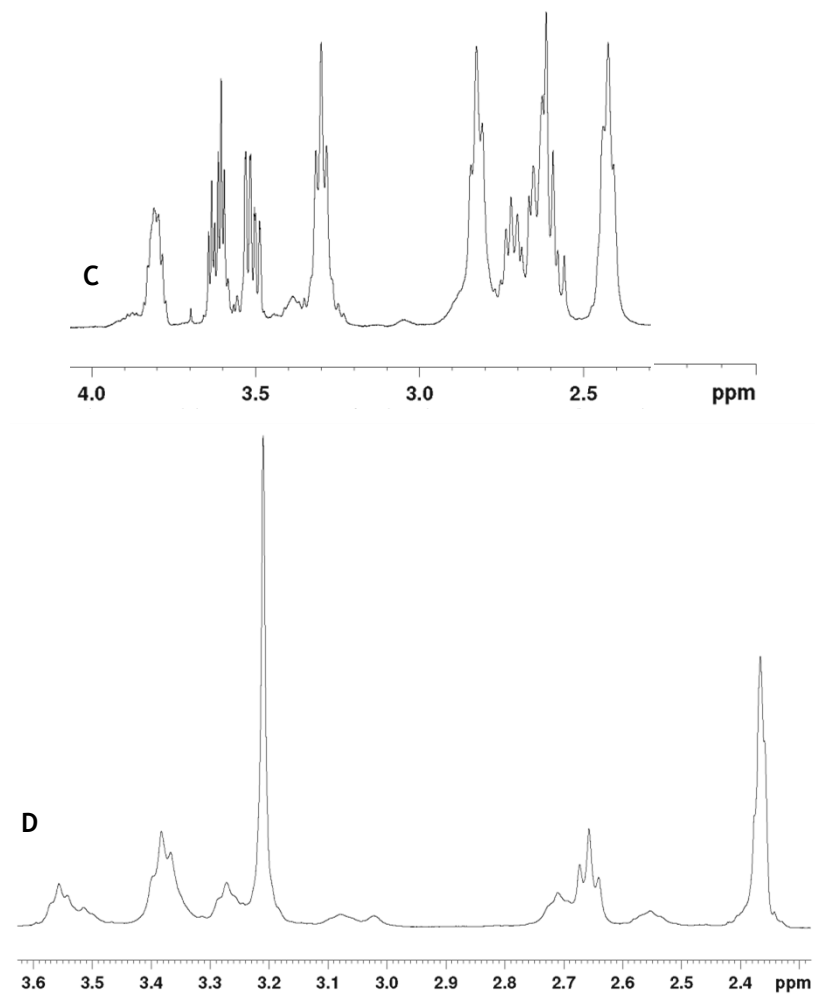
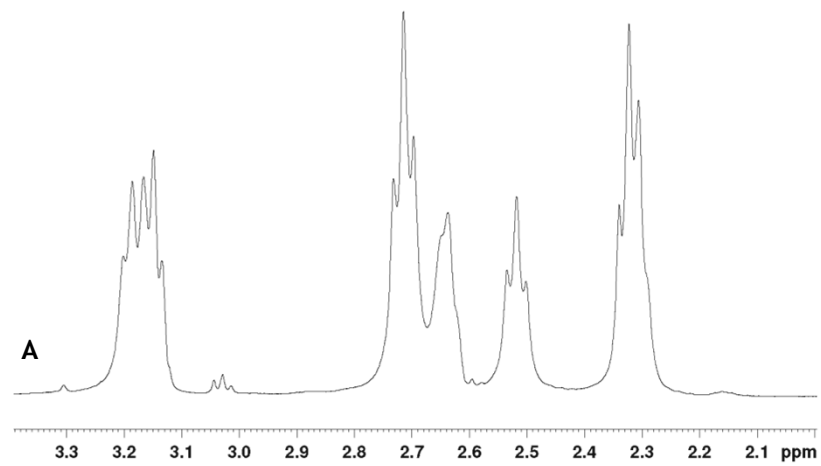


Figura 7. Espectro de ¹H NMR de (A) G2-NH₂, (B) G2-Ac, (C) G2-OH e (D) G2-COOH.



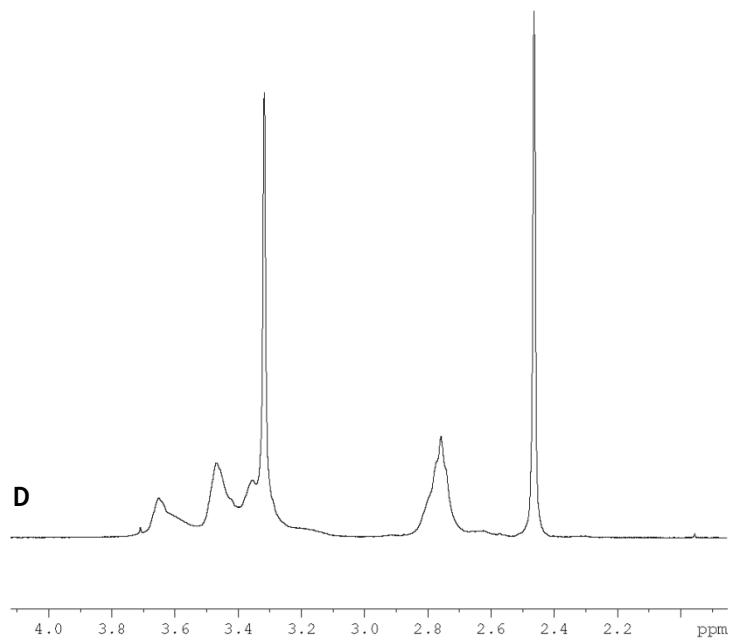
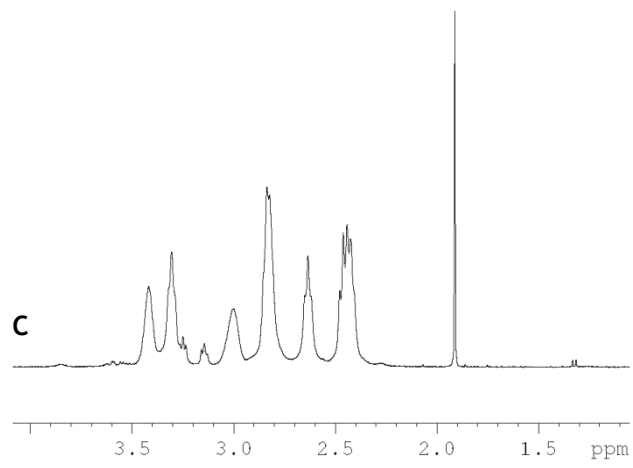
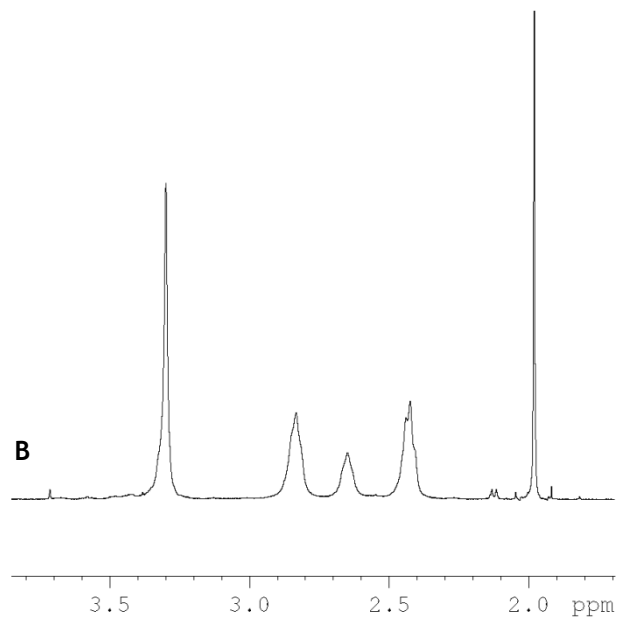
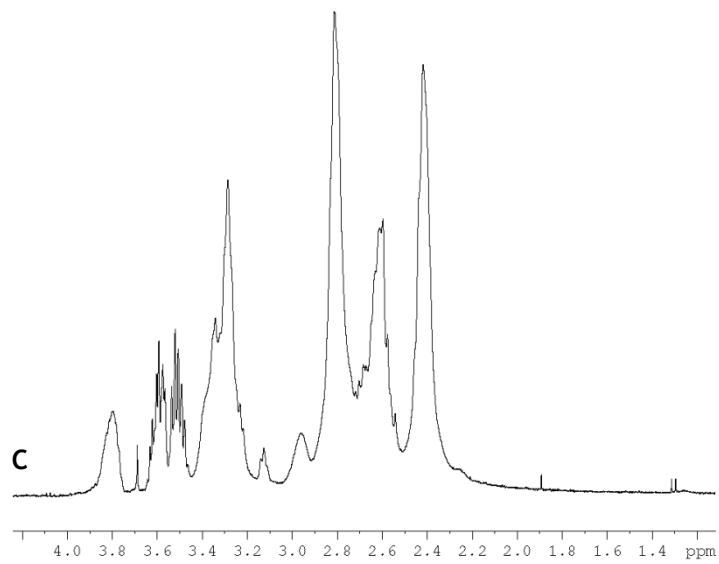
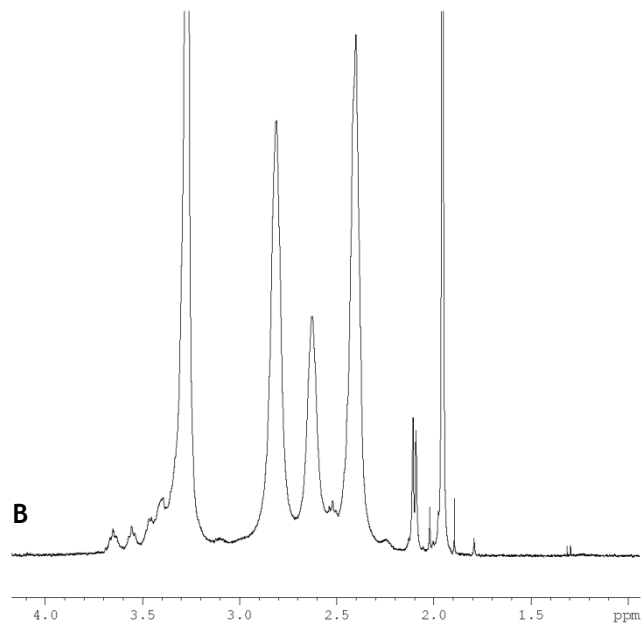
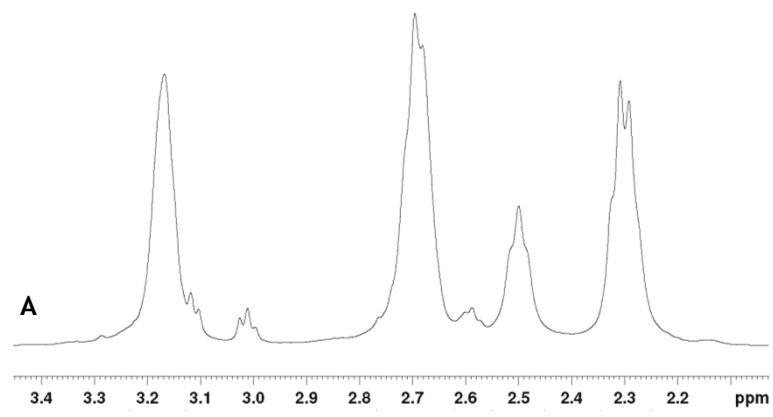


Figura 8. Espectro de ^1H NMR de (A) G5-NH₂, (B) G5-Ac, (C) G5-OH e (D) G5-COOH.



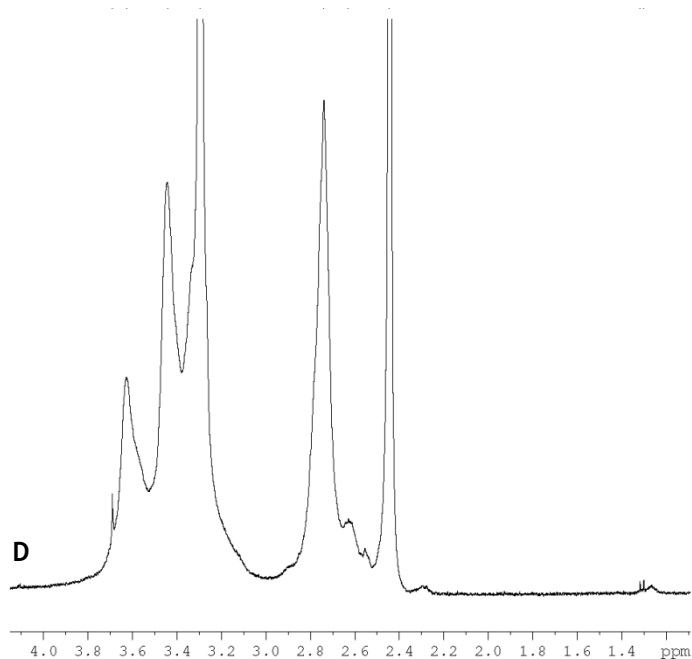


Figura 9. Espectro de ^1H NMR de (A) G7-NH₂, (B) G7-Ac, (C) G7-OH e (D) G7-COOH.

De acordo com estudos desenvolvidos por Santos e colaboradores [73, 88, 104], o espectro de ^1H NMR dos dendrímeros PAMAM-NH₂ (espectro (A) das figuras anteriores) revela múltiplos picos entre $\delta = 2,2\text{-}3,4$ ppm, o que vai de encontro com os espectros obtidos dos dendrímeros PAMAM-NH₂. Segundo os estudos desenvolvidos por Shi [96, 100, 109, 110], a presença de δ relacionados com o PAMAM-OH no espectro ^1H NMR (a 2.47, 3.40, 3.46, 3.66, 3.75 ppm) obtido por este grupo, vai de encontro aos picos das Figuras 7, 8 e 9 (C), confirmando desta forma a modificação da superfície. No que toca aos dendrímeros PAMAM-COOH, este mesmo investigador também demonstrou por ^1H NMR uma distribuição de picos (2.38, 2.69, 2.72, 3.23, 3.29, 3.40, 3.58 ppm) [109], estes picos encontram-se em conformidade com os adquiridos nos espectros anteriores (2.44, 2.63, 2.74, 3.30, 3.44, 3.63, 3.69 ppm) nas Figuras 7, 8 e 9 (D). Em concordância com o espectro obtido para os dendrímeros PAMAM-Ac, estão os estudos desenvolvidos por Patil [111]. Neste estudo, são reportados valores de δ (1.98, 2.40-2.50, 2.62-2.73, 2.82-2.92, 3.26-3.37 ppm) que vão de encontro aos apresentados nos espectros anteriores (1.98, 2.43, 2.65, 2.83, 3.30 ppm) nas Figuras 7, 8 e 9 (B).

Em qualquer um dos espectros obtidos anteriormente, por vezes os picos não são totalmente coincidentes com os valores já reportados devido à sobreposição dos picos que nem sempre permite uma distinção correcta. Posto isto, os dados obtidos vêm confirmar as estruturas dos dendrímeros modificados, apesar de não fornecerem informação acerca do grau de modificação.

3.2. Determinação experimental da extensão da modificação efectuada na superfície dos dendrímeros

A utilização do método do TNBS como reagente para determinação da concentração de amins tem-se revelado amplamente aceite desde que este foi introduzido, em 1960, por Satake [112]. Desde então, o procedimento normal foi submetido a modificações por Mokrasch [113], com o objectivo de quantificar as amins, aminoácidos e proteínas em misturas. Em ambos os métodos, a reacção de trinitrofenilação é seguida de uma etapa de interrupção da reacção, após a qual o conteúdo de amins é relacionado com a absorvância a 420 nm.

Ao contrário do que foi anteriormente descrito, Snyder [108] mostrou que o conteúdo de amins poderia ser relacionado directamente com a absorvância a 420 nm após um curto período de incubação da mistura reaccional (15-30 min) e a supressão da etapa de interrupção da reacção. Este método apresenta uma sensibilidade superior aos procedimentos anteriormente descritos. Neste trabalho usou-se esta última abordagem.

Como já referenciado, o TNBS fixa-se aos grupos amina livres dos dendrímeros, formando compostos corados que podem ser detectados a 420 nm. Após a leitura no espectrofotómetro, procedeu-se ao cálculo do número de amins primárias de cada uma das amostras através da equação da recta de calibração de glicina. Os resultados estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7. Média do número de amins primárias nos dendrímeros PAMAM e seus derivados.

| | | Número de amins primárias | |
|-------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| | | Valor teórico | Valor experimental |
| Dendrímeros | G2-NH ₂ | 8 | 8,98 ± 1,87 |
| | G2-Ac | | 0,96 ± 0,51 |
| | G2-COOH | 0 | 7,04 ± 1,50 |
| | G2-OH | | 1,59 ± 0,08 |
| | G5-NH ₂ | 128 | 106,12 ± 8,39 |
| | G5-Ac | | 16,85 ± 0,57 |
| | G5-COOH | 0 | 6,48 ± 2,92 |
| | G5-OH | | 58,58 ± 5,65 |
| | G7-NH ₂ | 512 | 456,25 ± 186,32 |
| | G7-Ac | | 71,97 ± 12,82 |
| | G7-COOH | 0 | 76,16 ± 5,45 |
| | G7-OH | | 54,43 ± 5,53 |

Ao analisarmos os resultados apresentados na tabela, verifica-se que o conteúdo de amins dos dendrímeros PAMAM-NH₂ de geração 2 vai de encontro aos valores teóricos. Para gerações mais elevadas, possivelmente devido a imperfeições na estrutura (levando a um menor número de ramificações do que o esperado teoricamente) ou que ao facto de nem

todos os grupos amina à superfície dos dendrímeros estarem expostos por forma a poder reagir (ou seja, alguns estão “enrolados” para o interior do dendrímero), o valor obtido experimentalmente para o número de amins primárias à superfície é menor do que o valor teórico. Por outro lado, quando se trata dos derivados é possível visualizar que a modificação da superfície não foi conseguida a 100%, uma vez que, neste caso, seria de esperar valores próximos de zero para o conteúdo de amins primárias livres.

4. Conclusão

Em suma, foram modificados dendrímeros PAMAM com terminações amina (PAMAM-NH₂; gerações G2, G5 e G7) por forma a ficar-se com grupos acetilo, hidroxilo e ácido carboxílico à superfície (PAMAM-Ac, -OH e -COOH). Estes novos dendrímeros foram caracterizados por ¹H NMR, por forma a confirmar a presença dos novos grupos funcionais à superfície, e o grau de modificação foi determinado através da medição do conteúdo de amins pelo método do TNBS. Embora os espectros de ¹H NMR tenham confirmado a presença dos novos grupos funcionais na superfície dos dendrímeros, a funcionalização não ocorreu a 100%.

▪ Capítulo II

Avaliação do efeito de dendrímeros com diferentes grupos funcionais à superfície na diferenciação de MSCs em osteoblastos e adipócitos

1. Introdução

Durante a última década, têm sido feitos esforços no sentido de desenvolver nanopartículas e nanodispositivos capazes, não só de actuar como sondas, como também de manipular células e biomoléculas à escala de escassos nanómetros [114]. Estes dispositivos podem estimular, responder e interagir com células e tecidos alvo a fim de induzir respostas fisiológicas desejadas, enquanto minimizam os efeitos adversos [114, 115]. As propriedades químicas e físicas dos materiais alteram-se notavelmente com o seu tamanho [115]. Estes avanços têm proporcionado oportunidades para analisar o processo envolvido no funcionamento da maquinaria celular, bem como as forças intervenientes e as interacções entre células, proteínas e ácidos nucleicos [114].

A transcrição e tradução dentro de um organismo celular ocorre dentro de uma escala sub-nanométrica. Com o aparecimento de tecnologias e técnicas que permitem criar materiais suficientemente pequenos para interagirem selectivamente com as moléculas biológicas, tal como os ácidos nucleicos e proteínas, novas oportunidades para estudar as actividades a nível celular começam a ser disponibilizadas [114-116]. As nanopartículas são materiais que apresentam dimensões numa escala de aproximadamente 1-1000 nm [117]. As partículas de tamanho nanométrico encontram-se na mesma dimensão que os anticorpos, receptores de membrana, ácidos nucleicos e proteínas, entre outras biomoléculas. Estas características biomiméticas, em conjunto com uma razão área de superfície/volume elevada e a possibilidade de modular as suas propriedades, torna as nanopartículas poderosas ferramentas para serem usadas em diagnóstico, imagem e terapia [115-117]. No entanto, as nanopartículas também podem apresentar efeitos indesejáveis e serem citotóxicas e/ou induzirem alterações no potencial de auto-renovação e de diferenciação das células estaminais [117]. As nanopartículas com um diâmetro de poucos nanómetros (2-10 nm, por exemplo, os dendrímeros), podem ser internalizadas pelas células estaminais. A superfície da nanopartícula desempenha um papel fundamental no controlo deste processo. Na maioria dos casos, a carga da superfície funciona como uma força motriz e define qual o processo de internalização [117].

A terapia com células estaminais é uma área de investigação que se encontra em constante evolução. As MSCs têm recebido uma atenção considerável no campo da terapia celular devido à capacidade de diferenciação em diversos tecidos de origem mesenquimatosa (por exemplo, osso, cartilagem, gordura, tendões, ligamentos e outros tecidos conectivos), tornando-as excelentes candidatas para terapias celulares e de substituição de tecidos [5, 115]. No entanto, existem ainda alguns obstáculos no que respeita ao direccionamento de células estaminais no interior do corpo humano, incluindo os problemas de alojamento e fixação das células no local desejado e na diferenciação das células estaminais em direcções tipos celulares específicos. As nanopartículas têm sido utilizadas com o intuito de ultrapassar estes desafios na aplicação terapêutica de células estaminais [115]. A actividade terapêutica, assim como a toxicidade dos nanomateriais, depende das interacções específicas com a

membrana celular e com os mecanismos de comunicação para o citosol e núcleo [118]. Apesar da ampla variedade de aplicações das nanopartículas no campo das células estaminais, existe uma grande falta de informação no respeitante ao impacto dos nanomateriais sintéticos na saúde humana e ambiental [115]. A biocompatibilidade das nanopartículas é um dos pré-requisitos para a sua aplicação em biomedicina mas, no entanto, a sua avaliação não é fácil devido à ausência de critérios para avaliar a potencial toxicidade [115, 118]. Os dados disponíveis de estudos de toxicidade de nanopartículas, particularmente em células estaminais, são limitados e os mecanismos moleculares da toxicidade das nanopartículas encontram-se pouco esclarecidos [115]. Diversos estudos demonstraram que a constituição da superfície da nanopartícula influencia o transporte dos dendrímeros através das barreiras endoteliais e epiteliais [115, 117]. As células estaminais utilizam diversos mecanismos para a absorção de nanopartículas, incluindo a fagocitose, pinocitose e endocitose mediada e não mediada por receptores. Perumal e seus colegas [119] testaram dendrímeros com diversos grupos funcionais à superfície em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) de modo a compreenderem quais os mecanismos de internalização celular subjacentes. Este estudo comprovou que os dendrímeros aniônicos são internalizados por cavéolas, enquanto os dendrímeros catiónicos e neutros são aparentemente internalizados por mecanismos de endocitose mediados por receptores.

Jevprasesphant e seus colegas [120] estudaram a influência da citotoxicidade de dendrímeros PAMAM conjugados com ácidos gordos e PEG, assim como o efeito da geração completa ou de meia geração na viabilidade das células Caco-2. Estes concluíram que a modificação da superfície desempenha um papel fundamental na resposta tóxica de dendrímeros de meia geração com terminação carboxílica, sendo estes menos tóxicos que os dendrímeros de geração completa com terminações amina. Também foi observado que os dendrímeros PAMAM podem levar à ruptura da membrana celular.

Também na sequência da avaliação do efeito da carga da superfície dos dendrímeros PAMAM na integridade e viabilidade celular, El-Sayed e seus colaboradores [121] testaram dendrímeros de diferentes gerações (G2-4 e G0,5-4,5) e com diferentes grupos terminais (-OH e -COOH, respectivamente) em mono-camadas de células Caco-2. Os dendrímeros PAMAM-COOH aniônicos causaram uma libertação de desidrogenase láctica (LDH) dependente do tempo de incubação, concentração e geração, factores não evidenciados pelos dendrímeros PAMAM-OH neutros. Mukherjee e colaboradores [122] fizeram uma avaliação toxicológica *in vitro* de dendrímeros PAMAM-NH₂ de diferentes gerações (G4, G5 e G6) em duas linhas celulares mamíferas (células HaCaT e SW480). Os dados adquiridos sugeriram uma adsorção significativa das proteínas do soro aos dendrímeros que aumenta com a geração do dendrímero. A citotoxicidade, neste estudo, revelou uma resposta tóxica dependente da estrutura dos dendrímeros para ambas as linhas celulares, sendo a G4 menos tóxica que a G6. No estudo desenvolvido por Winnicka [123], investigou-se o efeito de dendrímeros PAMAM-NH₂ e -OH, de G2 e G3, na viabilidade e indução da apoptose em células do cancro da mama

(MCF-7 e MDA-MB-231). Verificou-se que os dendrímeros não eram citotóxicos e que a reacção apoptótica era mínima.

No trabalho desenvolvido por Salgado e seus colaboradores [89], foram usadas nanopartículas à base de dendrímeros PAMAM e carboximetilquitosano (transportadoras de dexametasona) ao nível do sistema nervoso, verificando-se que a viabilidade das células não foi afectada após a exposição. Com base neste mesmo estudo, Oliveira e colegas [124] utilizaram as mesmas nanopartículas para promover a diferenciação celular a partir do interior da membrana celular, por acção da dexametasona transportada pelas nanopartículas, tendo sido capazes de promover a formação de osso *in vivo*, sem que as nanopartículas exibissem um perfil citotóxico. Bosnjakovic e seus colaboradores [125] desenvolveram um nanodispositivo para libertação controlada de eritromicina que consistiu na conjugação deste fármaco a dendrímeros PAMAM com diferentes grupos terminais (-OH e -NH₂). A citotoxicidade e propriedades anti-bacterianas foram testadas em macrófagos (RAW 264.7), tendo sido revelado um perfil citotóxico negativo.

Yang e Kao [126] demonstraram que os dendrímeros PAMAM G3.5 com terminações COOH não atenuam a viabilidade dos fibroblastos *in vitro*, enquanto os de G4 com terminações amina causam citotoxicidade que é dependente da relação concentração-tempo. Além disso, a conjugação de uma sequência de aminoácidos que promovem a adesão celular (RGD) aos dendrímeros PAMAM G4, demonstrou reduzir o potencial citotóxico. De entre os dendrímeros testados, o dendrímeros PAMAM-RGD G3,5 mostraram ser uma boa aposta para aplicação em sistemas de entrega de fármacos, uma vez que não afectaram a viabilidade dos fibroblastos. O grupo de Lee [127] sintetizou e caracterizou dendrímeros PAMAM-OH com o interior quaternizado (QPAMAM-OH) com o intuito de obter uma interacção mais eficiente com o DNA (obtenção de poliplexos). De modo a avaliar a citotoxicidade destes vectores, os investigadores incubaram-nos com células 293T e verificaram que os QPAMAM-OH apresentavam um nível de citotoxicidade inferior e exibiam uma carga neutra à superfície. Uma outra vantagem destes dendrímeros é que os grupos hidroxilo não reactivos podem ser explorados para posterior conjugação com ligandos. Os vários estudos descritos com dendrímeros mostram que os investigadores se preocupam, essencialmente, com dois aspectos principais, ou seja, saber se os materiais usados (dendrímeros) são citotóxicos e se realizam com eficiência a função pretendida. No entanto, tendo em atenção que, hoje em dia, e à semelhança do que acontece com outros nanomateriais, é cada vez mais comum a utilização de dendrímeros em associação com as MSCs, com a finalidade de se encontrarem novas abordagens terapêuticas e metodologias de diagnóstico, é importante avaliar a influência dos dendrímeros nas propriedades das MSCs e, em particular, verificar se a capacidade de diferenciação destas células não é afectada na presença desses materiais.

Posto isto, este trabalho teve como objectivo principal a avaliação, *in vitro*, do efeito dos dendrímeros PAMAM na viabilidade e capacidade de diferenciação osteogénica e adipogénica das MSCs. Neste âmbito, foi estudado o efeito do tipo de funcionalização à superfície, do número de geração e da concentração dos dendrímeros.

De forma mais pormenorizada, o trabalho teve como propósito:

- a. Avaliar a citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM, tendo sido utilizado o método da redução da resazurina;
- b. Avaliar a capacidade de diferenciação osteogénica e adipogénica das MSCs, o que foi realizado através de marcadores bioquímicos e histoquímicos clássicos frequentemente usados na caracterização de culturas de osteoblastos e adipócitos

2. Materiais e métodos

2.1. Células, materiais e reagentes

As MSCs foram obtidas a partir de amostras de osso trabecular humano recolhidas durante intervenções cirúrgicas efectuadas no Hospital Dr. Nélio Mendonça (Funchal), na sequência de situações traumáticas. Somente foi utilizado tecido ósseo que, de outra forma, teria sido descartado. Todo este processo teve o consentimento da Comissão de Ética Local, bom como dos pacientes envolvidos. Os dendrímeros PAMAM G2, G4 e G6 com centro de EDA e grupos terminais amina, hidroxilo e carboxilo (-NH₂, -OH e -COOH, respectivamente) em solução aquosa, foram adquiridos através da Dendritech, Inc. (EUA). Todos os outros reagentes, à excepção de indicação de outra proveniência, foram da marca Sigma-Aldrich.

2.2. Isolamento e cultura de hMSCs

A cultura primária de MSCs foi preparada a partir de amostras de osso trabecular humano contendo medula óssea. O isolamento das células foi realizado com base na capacidade de adesão das MSCs ao substrato de poliestireno das placas de cultura a partir do explante ósseo [42]. As células foram cultivadas em placas de Petri em *alfa-Minimum Essential Medium* (α -MEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (*Foetal Bovine Serum*, FBS) e 1 % de antibiótico-antimicótico (*antibiotic-antimycotic*, AA) a 37°C e 5% CO₂ / 95% ar atmosférico. De modo a remover as células não aderentes, o meio foi mudado no 4º dia de cultura, e posteriormente a cada 3 dias. Entre o 7º e 10º dia as células foram libertadas enzimaticamente recorrendo à utilização de uma solução de tripsina-EDTA, sendo de seguida sub-cultivadas e/ou criopreservadas. Foram utilizadas células de passagem 3 (p3) para todas experiências.

2.3. Preparação das soluções de dendrímeros

Os dendrímeros (Dendritech, Inc.) foram recebidos em solução aquosa com as concentrações indicadas na

Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações das soluções stock dos dendrímeros nativos e modificados.

| Dendrímeros | G2-NH ₂ | G2-OH | G1,5-COOH | G4-NH ₂ | G4-OH | G3,5-COOH | G6-NH ₂ | G6-OH | G5,5-COOH |
|----------------------|--------------------|-------|-----------|--------------------|-------|-----------|--------------------|-------|-----------|
| Concentração (mg/mL) | 76,4 | 262 | 500 | 140,4 | 120,4 | 157,8 | 64,6 | 74,1 | 108 |

2.3.1. Experiência 1: Concentração de dendrímeros - 10 µg/mL

As soluções de dendrímeros a serem testadas foram preparadas a partir das soluções originais, com uma concentração stock de 1 mg/mL em água ultra-pura. Sendo posteriormente adicionados 10 µL da solução stock ao meio de cultura em cada poço, completando um volume final de 1 mL e uma concentração final de 10 µg/mL.

2.3.2. Experiência 2: Concentração de dendrímeros - 0,5 µg/mL

As soluções de dendrímeros a serem testadas foram preparadas a partir das soluções de origem, com uma concentração stock de 0,05 mg/mL em água ultra-pura. Sendo posteriormente adicionados 10 µL da solução stock ao meio de cultura em cada poço, perfazendo um volume total de 1 mL e uma concentração final de 0,5 µg/mL.

2.4. Indução da diferenciação de hMSCs

2.4.1. Diferenciação osteogénica

As MSCs foram semeadas em placas de cultura de 24 poços a uma densidade de 6000 células/mL e cultivadas adicionando 1 mL/poço em meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de FBS e 1% de AA, durante 48 h, com o intuito de as células aderirem ao substrato. Findas as 48 h, o meio foi trocado por meio indutor de diferenciação osteogénica contendo dexametasona 1 nM, β -glicerofosfato 5 mM e ácido ascórbico 250 µM. As culturas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ / 95% ar atmosférico durante 21 dias. O meio de cultura foi mudado duas vezes por semana em conjunto com a adição dos dendrímeros aos poços. Para controlo negativo, foram utilizadas MSCs cultivadas em meio de cultura sem os suplementos de indução osteogénica; para controlo positivo, as MSCs foram cultivadas em meio de cultura indutor sem adição de dendrímeros.

2.4.2. Diferenciação adipogénica

As MSCs foram semeadas em placas de cultura de 24 poços a uma densidade de 1×10^4 células/mL e cultivadas adicionando 1 mL/poço em meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de FBS e 1% de AA, durante 48 h, com o intuito de as células aderirem ao substrato. Findas as 48 h, o meio foi trocado por meio indutor de diferenciação adipogénica contendo dexametasona 1 µM, indometacina 0,1 mM, isobutilmetilxantina 0,5 mM e insulina 10 µg/mL. As culturas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ / 95% ar atmosférico durante 21 dias. O meio de cultura foi mudado a cada dois dias sendo intercalado com meio de manutenção que continha somente insulina (dias 1-5, 9-13 e 17-21 com meio indutor e dias 7 e 15 com meio de manutenção) juntamente com a adição dos dendrímeros aos poços. Para

controlo negativo, foram utilizadas MSCs cultivadas em meio de cultura sem os suplementos de indução adipogénica; para controlo positivo, as MSCs foram cultivadas em meio de cultura indutor sem adição de dendrímeros.

2.5. Caracterização do comportamento celular

2.5.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada de forma indirecta utilizando o teste de redução da resazurina, ou seja, estabeleceu-se uma correlação entre a actividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura [128]. A viabilidade celular foi estudada em função do tipo de dendrímero e da sua concentração. Nos dias seleccionados para avaliação (dias 7, 14 e 21), as culturas foram incubadas com meio de cultura contendo resazurina 0,1 mg/mL, durante 3 h, a 37°C, em estufa de 5% CO₂/ar. Posteriormente, foi efectuada leitura da fluorescência da resorufina ($\lambda_{\text{excitação}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 590 \text{ nm}$) num leitor de microplacas (modelo Victor³ 1420, Perkin Elmer).

A viabilidade celular foi expressa em unidades de fluorescência relativa (*Relative Fluorescence Units*, RFU).

2.5.2. Diferenciação osteogénica

- Avaliação bioquímica

- Actividade da fosfatase alcalina (ALP)

A actividade da fosfatase alcalina foi avaliada através de um ensaio colorimétrico que envolve a hidrólise do p-nitrofenilfosfato dissódico pela ALP e determinação por espectrofotometria do p-nitrofenol formado [129].

Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com tampão PBS e submetidas a lise com Triton X-100, a 0,1% (v/v). De seguida, transferiram-se 20 μL do lisado celular para uma placa de 96 poços transparente e adicionou-se o substrato (solução de p-nitrofenilfosfato 2 mM em tampão alcalino, pH 10) e incubou-se a 37°C, durante 60 min. A reacção foi interrompida pela adição de NaOH 0,02M. A absorvância foi determinada a 405 nm num leitor de microplacas e comparada com os valores obtidos pela recta de calibração que foi gerada por diluições sucessivas de p-nitrofenol. As amostras foram efectuadas em quintuplicado e os resultados foram normalizados em relação à proteína total dos lisados celulares.

◦ **Quantificação da osteocalcina (OC)**

A quantidade de OC segregada para o meio de cultura foi medida utilizando um ensaio EIA disponível comercialmente (BT-460), específico para a osteocalcina humana (BTI, Stoughton, MA). O ensaio é baseado em dois anti-corpos monoclonais, que irão reconhecer quer a extremidade carboxilada (C-terminal da proteína), quer a descarboxilada (N-terminal da proteína) da OC humana.

Foram recolhidas amostras do meio de cultura (as culturas estiveram 24h em meio de cultura sem FBS) no dia 21 e colocadas a -20°C para posterior análise. As amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante. O nível mínimo de detecção da OC com este teste é de 0,5 ng/mL. As amostras foram analisadas em quadruplicado e comparadas com os valores padrão da OC humana.

● **Avaliação histoquímica**

◦ **Coloração para a presença da ALP**

As culturas celulares foram coradas histoquimicamente para detectar a presença da ALP [129]. O método utilizado baseou-se na hidrólise do naftilfosfato de sódio pela ALP e consequente precipitação do fosfato libertado por reacção com um sal diazónico, formando um produto corado. A reacção positiva é identificada por uma coloração amarela, castanha ou preta consoante a quantidade de enzima.

As culturas fixadas (usando glutaraldeído 1,5% v/v em PBS, 20 min) foram mantidas durante 60 min, no escuro, com uma solução preparada em tampão Tris 0,1 M, pH 10, contendo 2 mg/mL de naftilfosfato de sódio e 2 mg/mL de “fast blue RR salt”. A reacção foi interrompida por lavagem das culturas com água ultra-pura.

◦ **Coloração para a presença de depósitos de fosfato**

Os depósitos de fosfato presentes na matriz foram identificados pelo método de von Kossa [60]. Os depósitos de fosfato de cálcio dão origem a fosfato de prata através da reacção com o nitrato de prata, que é posteriormente reduzido pela radiação UV, com formação de prata metálica. A reacção positiva traduz-se no aparecimento de depósitos negros nas culturas celulares.

Após a fixação (usando glutaraldeído 1,5% v/v em PBS, 20 min), foi adicionada às culturas uma solução de nitrato de prata a 2,5% p/v, sendo as culturas submetidas a radiação UV durante 60 min. De seguida, as culturas foram lavadas com água ultra-pura e recobertas com solução de tiosulfato de sódio a 5% p/v, durante 2 min, sendo novamente lavadas com água ultra-pura.

◦ Coloração para a presença de depósitos de cálcio

A alizarina vermelha pode ser utilizada para identificar os depósitos de cálcio [61]. A alizarina vermelha irá complexar-se aos depósitos de cálcio originando uma coloração vermelha nas amostras.

Após a fixação (usando glutaraldeído 1,5% v/v em PBS, 20 min), as culturas foram cobertas com uma solução de alizarina vermelha a 1% p/v em NH_4OH a 0,28% v/v, pH 6,4, durante 2 min, sendo de seguida lavadas com água ultra-pura. Posteriormente, foram passadas por etanol ácido (<15 s) e lavadas novamente com água ultra-pura.

2.5.3. Diferenciação adipogénica

● Avaliação histoquímica e quantitativa

◦ Coloração e quantificação do óleo vermelho

Para verificar a existência de acumulação de lípidos, as células foram coradas histoquimicamente com o óleo vermelho [130].

Em seguida à fixação (com glutaraldeído 1,5% v/v em PBS, 20 min), as culturas foram cobertas com uma solução de óleo vermelho, preparada momentos antes da sua utilização, durante 60 min. A solução foi preparada misturando três partes de uma solução stock (0,5% p/v em isopropanol) com duas partes de água ultra-pura, deixando-se repousar cerca de 10 min e, de seguida, procedendo-se a uma filtração através de um filtro 0,2 μm . Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com água ultra-pura. Todo o processo anteriormente descrito é relativo à avaliação histoquímica da diferenciação adipogénica. No que toca à avaliação quantitativa, após a coloração das culturas, foi adicionado 250 μL de isopropanol a cada poço, e incubou-se durante 15 min, de modo a extrair o corante incorporado pelas células. Foram transferidos 100 μL do extracto para uma placa de 96 poços transparente e efectuada a quantificação a 490 nm. As amostras foram efectuadas em sextuplicado e os resultados comparados com a recta de calibração obtida através da diluição sucessiva da solução de óleo vermelho e expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.5.4. Microscopia óptica

As culturas celulares após fixação e coloração histoquímica foram observadas por microscopia óptica (Nikon Eclipse TE 2000E) para avaliação da expressão de parâmetros osteogénicos (presença de ALP; formação de depósitos de fosfato e de cálcio na matriz) e adipogénicos (presença de vesículas lipídicas).

2.6. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada no programa Excel, da Windows. Todos os resultados são apresentados como a média \pm desvio-padrão em relação à média.

3. Resultados

Nesta secção, apresentam-se e discutem-se os resultados relativos ao trabalho experimental realizado, tentando sempre relacioná-los com resultados de trabalhos já publicados.

3.1. Diferenciação osteogénica

3.1.1. Viabilidade celular

• Experiência 1

A viabilidade celular das MSCs, durante a diferenciação osteogénica, foi avaliada pelo teste da redução da resazurina em resorufina. Este método reproduz a actividade metabólica das células, podendo ser utilizado como uma medida indirecta da viabilidade celular. Foram efectuadas medições após 7, 14 e 21 dias de exposição aos dendrímeros. O Gráfico 1 apresenta o efeito na viabilidade celular dos dendrímeros nativos e modificados (gerações G2, G4, G6) presentes a uma concentração de 10 µg/mL.

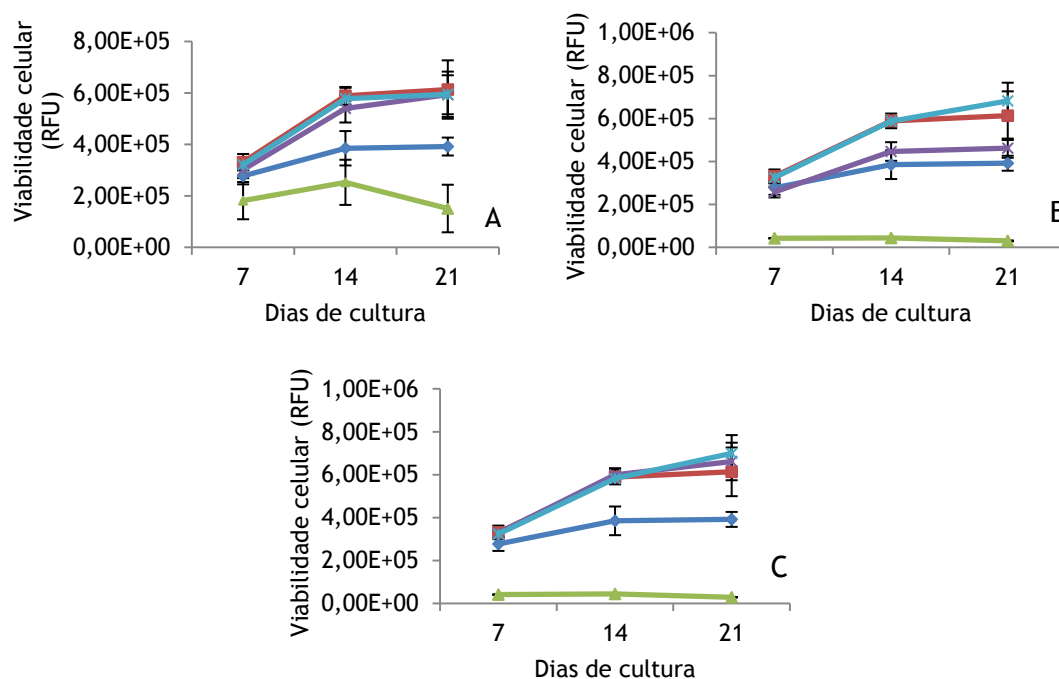


Gráfico 1. Estudo da viabilidade celular em condições de diferenciação osteogénica, após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), com concentração de 10 µg/mL.

(—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

Em primeiro lugar, é de salientar que o controlo positivo apresenta um aumento significativo na proliferação celular, em relação ao controlo negativo que não possui os

aditivos de indução osteogénica. De uma forma geral, quer em relação aos dendrímeros PAMAM G2, quer aos G4 e ainda os G6, verifica-se um aumento do nº de células ao longo do tempo de cultura. No entanto, quando se trata de avaliar o efeito dos grupos terminais, é possível observar que os dendrímeros PAMAM-NH₂ catiónicos demonstram uma citotoxicidade elevada e que se torna mais evidente com o passar dos dias. Das 3 gerações estudadas, a G2 é a menos citotóxica. Em relação aos dendrímeros PAMAM-OH neutros e -COOH aniónicos, verifica-se que possuem um comportamento muito semelhante ao controlo positivo, à excepção dos dendrímeros PAMAM-OH de G4 que se revelam um pouco mais citotóxicos. Posto isto, é possível concluir que como se encontra descrito na literatura, a citotoxicidade dos dendrímeros aumenta com a geração e que os grupos terminais também influenciam a viabilidade celular.

▪ Experiência 2

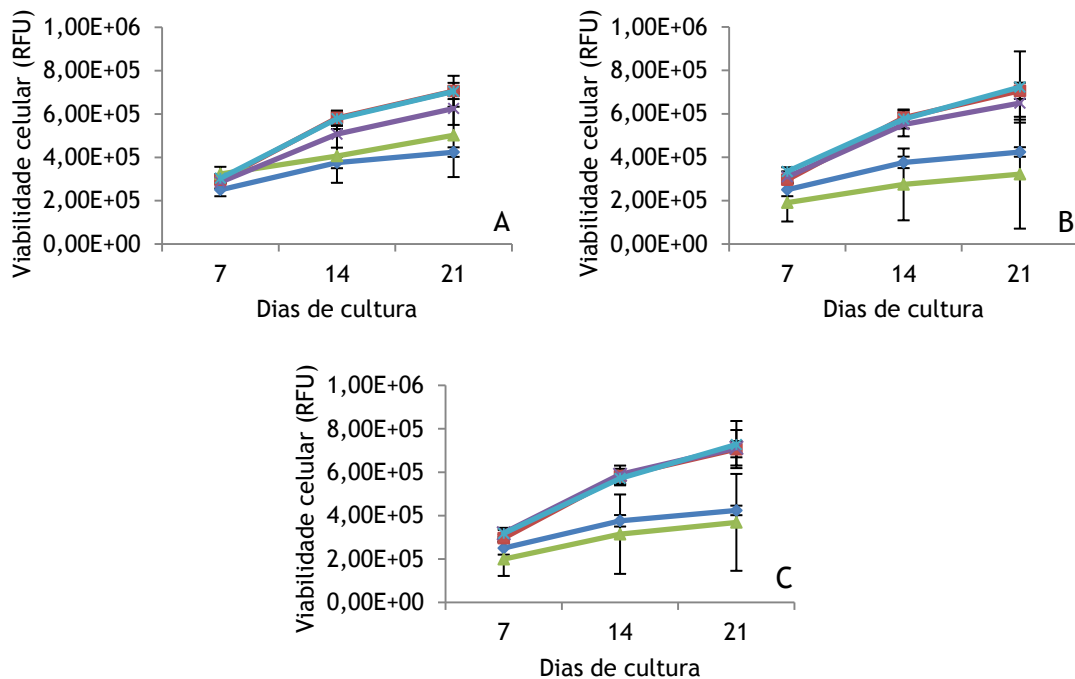


Gráfico 2. Estudo da viabilidade celular em condições de diferenciação osteogénica, após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), com concentração de 0,5 µg/mL.

(—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

No Gráfico 2 é possível visualizar os resultados obtidos em termos de viabilidade celular após a exposição aos dendrímeros a uma concentração de 0,5 µg/mL (20 vezes inferior à da experiência 1). Em primeiro lugar, também aqui é de salientar que o controlo positivo apresenta um aumento significativo na proliferação celular, em relação ao controlo negativo que não possui os aditivos de indução osteogénica. No panorama geral, é possível verificar, quer em relação aos dendrímeros PAMAM G2, quer aos G4 e ainda aos G6, um aumento do nº

de células ao longo do tempo de cultura. Além disso, ao avaliar o efeito dos grupos terminais, verifica-se que a citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM-OH e -COOH é insignificante, uma vez que a proliferação celular acompanha o ritmo do controlo positivo. Já no caso dos dendrímeros catiónicos PAMAM-NH₂ é possível verificar que o grau de citotoxicidade é superior. Os dendrímeros PAMAM-NH₂ de G2 são os que apresentam uma viabilidade celular mais elevada, estando mesmo acima da obtida para o controlo negativo. Tal facto vem confirmar o aumento da citotoxicidade com a geração.

Ao comparar ambas as experiências, é possível concluir que a uma concentração de dendrímero de 10 µg/mL a viabilidade celular é mais baixa, no caso das células expostas aos dendrímeros catiónicos. Por outro lado, quando se trata de uma concentração de 0,5 µg/mL, verifica-se um crescimento significativo da viabilidade celular quando comparada com a concentração anterior. No caso dos grupos terminais -OH e -COOH, a citotoxicidade é praticamente irrelevante, principalmente nos estudos efectuados com a concentração mais baixa de dendrímeros.

3.1.2. Actividade ALP

▪ Experiência 1

A actividade da ALP, considerada um marcador da osteogénese na fase inicial de diferenciação celular [39], foi avaliada através da hidrólise do p-nitrofenilfosfato dissódico e determinação do p-nitrofenol formado por espectrofotometria. Esta medição foi efectuada somente após 21 dias. O Gráfico 3 apresenta os resultados brutos obtidos em relação à actividade da ALP (expressos em nmol/min), assim como os resultados normalizados usando os dados de viabilidade celular (dividiu-se os valores de actividade da ALP pelos valores da viabilidade celular expressos em RFU; os valores finais são apresentados em unidades arbitrárias, u.a.) para concentrações de dendrímero iguais a 10 µg/mL. A actividade da ALP normalizada tem, pois, em consideração, a proliferação celular ocorrida em cultura.

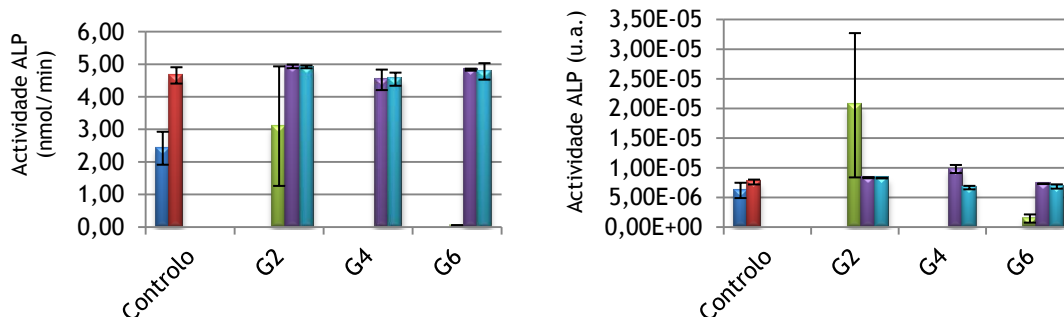


Gráfico 3. Actividade da ALP das culturas celulares expostas a dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

A observação dos gráficos mostra que, em termos de actividade de ALP, o controlo positivo apresenta valores superiores ao do controlo negativo, o que traduz o efeito da presença dos aditivos osteogénicos no meio de cultura. Em relação aos resultados da presença dos dendrímeros e das suas gerações, é evidente o efeito do decréscimo da viabilidade celular para as células que estiveram em contacto com os dendrímeros PAMAM-NH₂. Para as gerações G4 e G6, o número de células em cultura é extremamente baixo, daí a actividade da ALP ser nula (estava abaixo do limite de detecção do método usado), ao contrário do que se verifica para a G2, que apresenta uma actividade de ALP normalizada que não é significativamente diferente da apresentada pelos dendrímeros com terminações -OH ou -COOH. Ao analisarmos os resultados obtidos com os dendrímeros neutros e aniónicos, verifica-se que, independentemente da geração, a actividade da ALP normalizada se mantém elevada, no mesmo patamar que o controlo positivo.

• Experiência 2

O Gráfico 4 apresenta os resultados obtidos para a actividade da ALP em termos brutos (em nmol/min) e para a actividade da ALP normalizada usando os dados de viabilidade celular (em unidades arbitrárias, u.a.), desta vez para concentrações de dendrímero de 0,5 µg/mL.

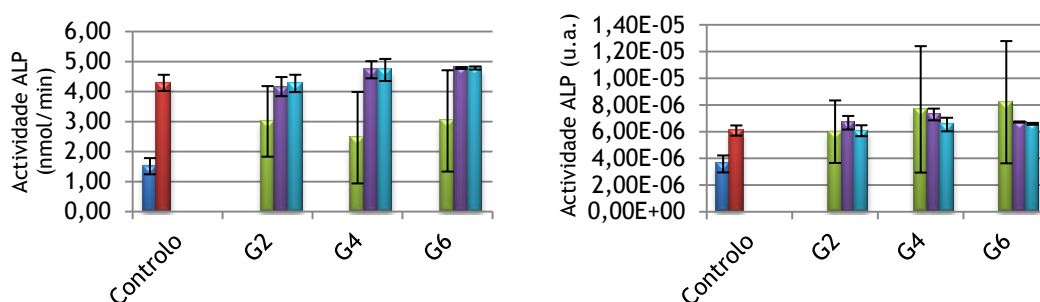


Gráfico 4. Actividade da ALP das culturas celulares expostas a dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

Por observação dos gráficos, é possível afirmar que a actividade da ALP se mostra extremamente elevada no controlo positivo, quando comparada com o controlo negativo, o que era de esperar. Por outro lado, os dendrímeros neutros e aniónicos não demonstram variações em relação ao controlo positivo, ao contrário dos dendrímeros catiónicos que revelam valores brutos de actividade de ALP mais baixos devido ao diminuto número de células em comparação com os restantes grupos. No entanto, após normalização dos valores de actividade da ALP, verifica-se que o estado de diferenciação das células expostas aos dendrímeros PAMAM-NH₂ não varia significativamente em relação ao controlo positivo e às células expostas aos outros tipos de dendrímeros.

Ao relacionar ambas as experiências verifica-se que a actividade enzimática da ALP não é afectada pela presença dos dendrímeros, somente de forma indirecta pela redução do número de células viáveis.

3.1.3. Quantificação da OC

▪ Experiência 1 e Experiência 2

A OC é uma proteína não-colagenosa da matriz somente sintetizada por osteoblastos maduros e que não se encontra presente em etapas precoces do processo de calcificação [16, 39]. A quantidade de OC segregada para o meio de cultura foi medida após 21 dias de cultura em células expostas a uma concentração de dendrímeros de 10 µg/mL (Gráfico 5) e 0,5 µg/mL (Gráfico 6).

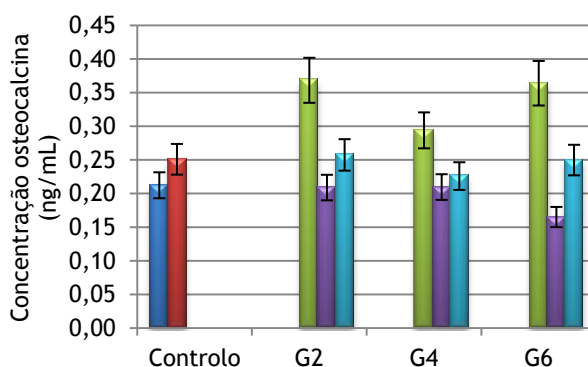


Gráfico 5. Concentração de OC nas culturas celulares expostas aos dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

Como referi anteriormente, o método usado na determinação de osteocalcina em cultura apresenta uma sensibilidade de 0,5 ng/mL, sendo a faixa de trabalho habitual de 1,0 a 50 ng/mL. Como se pode visualizar, quer no Gráfico 5, quer no Gráfico 6, nenhuma das culturas atingiu a faixa de trabalho ficando muito abaixo da sensibilidade do método. No entanto, na possibilidade de se poder fazer uma extrapolação, verifica-se que não há grandes diferenças do nível de osteocalcina presente nas culturas celulares feitas na ausência e na presença de dendrímeros.

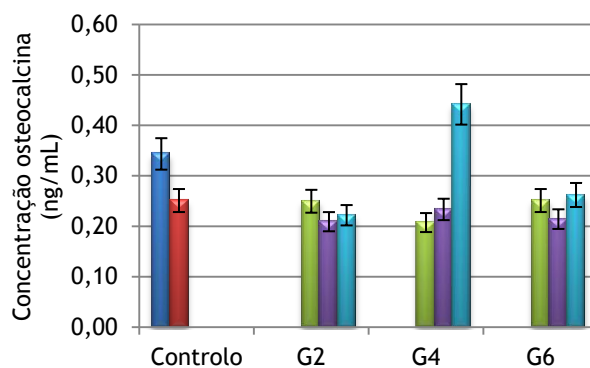


Gráfico 6. Concentração de OC nas culturas celulares expostas aos dendrímeros com diferentes grupos terminais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

3.1.4. Coloração para a presença da ALP

▪ Experiência 1 e Experiência 2

A presença de actividade da ALP foi detectada através de uma coloração histoquímica. As culturas, de uma forma geral, apresentaram uma reacção positiva para a actividade da ALP caracterizada por uma coloração amarela, castanha ou preta consoante o nível de actividade da enzima. Os resultados obtidos com células expostas a uma concentração de dendrímeros de 10 µg/mL estão apresentados na Figura 10 e, para uma concentração de dendrímeros de 0,5 µg/mL, na Figura 11.

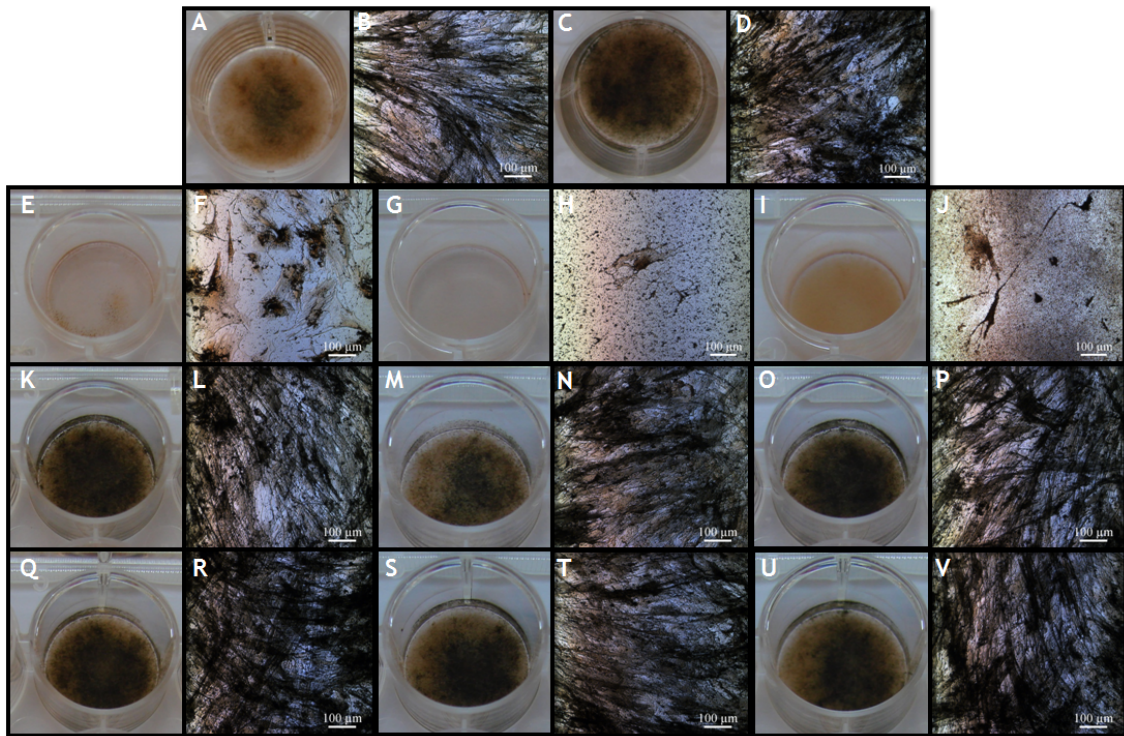


Figura 10. Culturas celulares efectuadas para detecção da actividade da enzima ALP na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais $-\text{NH}_2$ (E a J), $-\text{OH}$ (K a P) e $-\text{COOH}$ (Q a V). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21.

Da análise das figuras vemos uma nítida diferença entre o controlo negativo e o controlo positivo, o que traduz o efeito dos aditivos osteogénicos na diferenciação celular. As culturas que estiveram em contacto com os dendrímeros aniónicos e neutros apresentam uma coloração semelhante ao controlo positivo mostrando que estes não afectam a diferenciação celular. De facto, nos poços com dendrímeros PAMAM-OH e PAMAM-COOH, assim como do controlo positivo, é possível observar zonas de elevada coloração associadas com os agrupamentos celulares ou nódulos. Por outro lado, a citotoxicidade dos dendrímeros catiónicos que levou à diminuição do número de células viáveis em cultura é evidente, sendo a coloração muito ténue nestas situações.

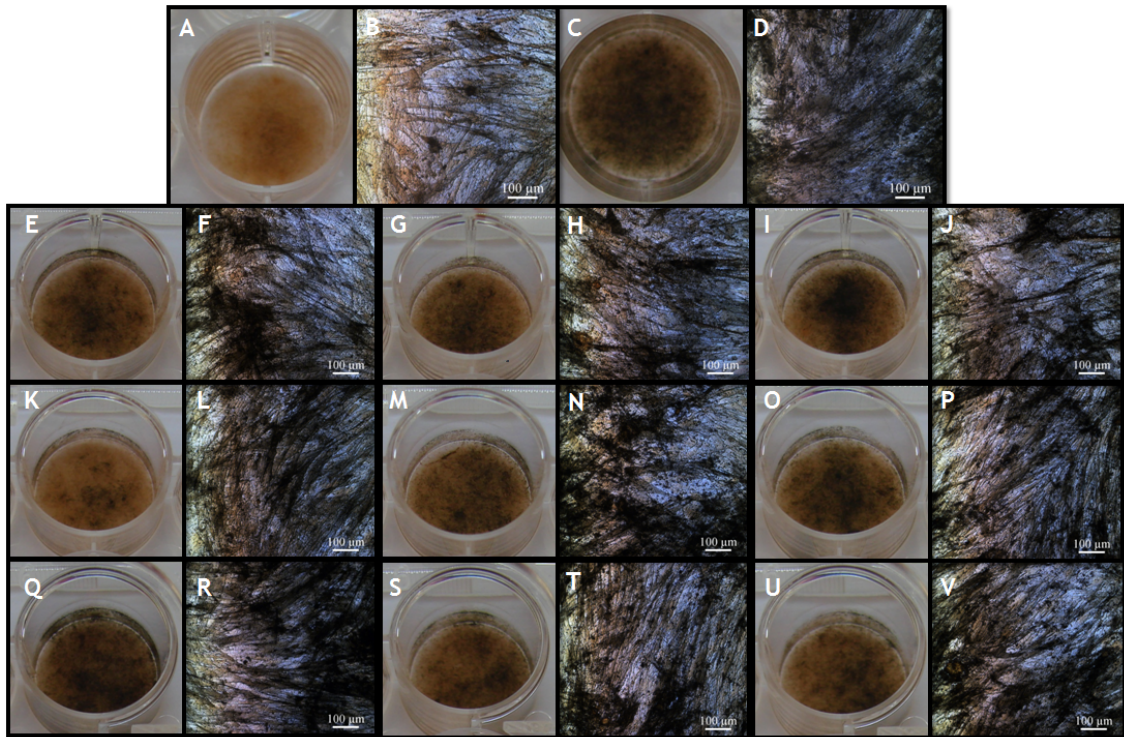


Figura 11. Culturas celulares efectuadas para detecção da enzima ALP na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21.

3.1.5. Coloração para a presença de depósitos de fosfato

• Experiência 1 e Experiência 2

A presença de depósitos de fosfato de cálcio na matriz extracelular foi avaliada histoquimicamente através da reacção de von Kossa. A reacção positiva traduz-se no aparecimento de depósitos negros nas culturas celulares. Os resultados obtidos com células expostas a uma concentração de dendrímeros de 10 µg/mL estão apresentados na Figura 9 e, para uma concentração de dendrímeros de 0,5 µg/mL, na Figura 10.

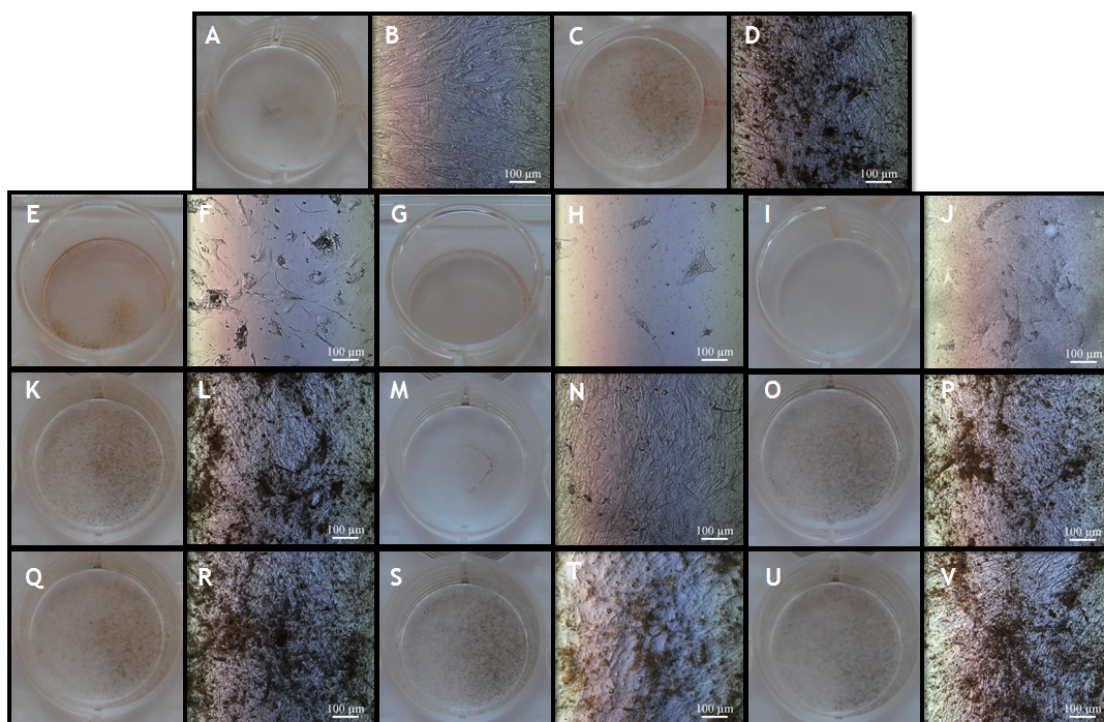


Figura 12. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de fosfato de cálcio, pelo método de von Kossa, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21.

Nas Figura 12 e 13 é possível visualizar a presença dos depósitos de fosfato de cálcio nas culturas. Como se pode ver, no controlo negativo a reacção foi negativa, ao contrário do que se vê no controlo positivo mostrando o efeito da adição dos aditivos osteogénicos ao meio de cultura. Nos poços que estiveram em contacto com os dendrímeros catiónicos à concentração mais elevada é possível verificar a ausência de células e por consequência, de depósitos de fosfato de cálcio. Por outro lado, nos restantes poços verifica-se uma reacção positiva, de extensão variável, indicando que, em termos gerais, a presença de dendrímeros não afecta negativamente a diferenciação osteogénica. Inexplicavelmente, para a concentração mais baixa de dendrímeros PAMAM-COOH e para todas as gerações estudadas, os resultados do teste de von Kossa mostraram uma quase inexistência de depósitos de fosfatos. Também o dendrímero PAMAM-OH, G4, à concentração de 10 µg/mL, pareceu afectar a mineralização da cultura.

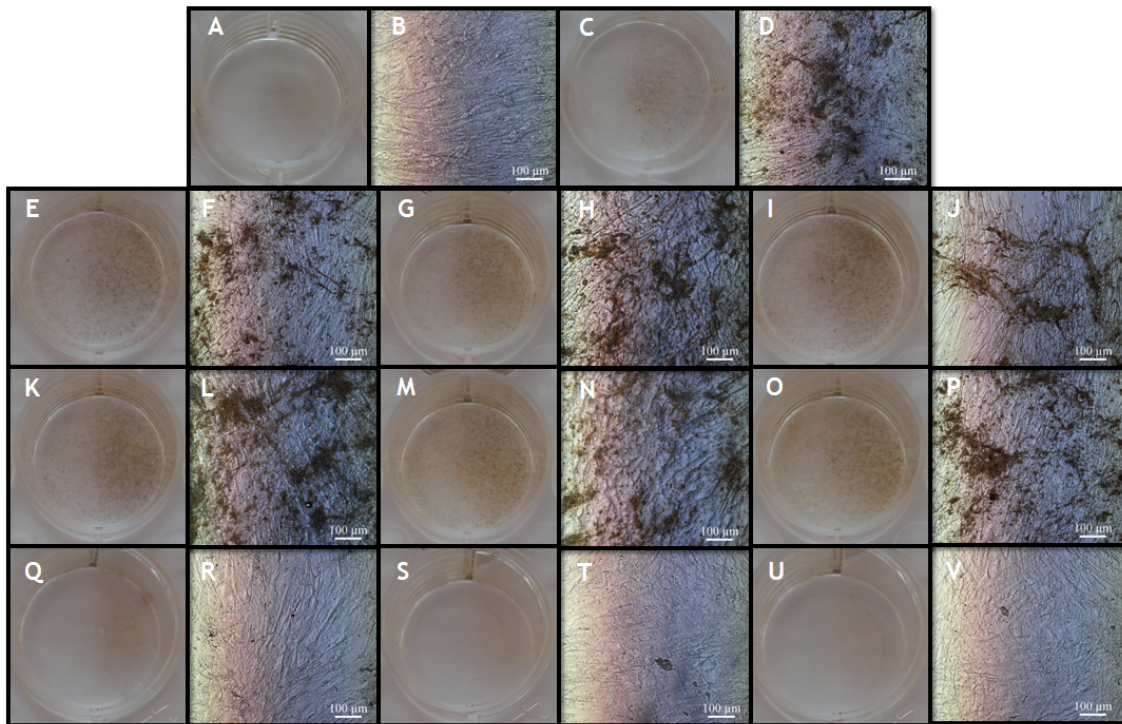


Figura 13. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de fosfato de cálcio, pelo método de von Kossa, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21.

3.1.6. Coloração para a presença de depósitos de cálcio

▪ Experiência 1 e Experiência 2

A alizarina vermelha pode ser utilizada para identificar os depósitos de cálcio em cultura. Esta irá complexar-se aos depósitos de cálcio originando uma coloração vermelha nas amostras.

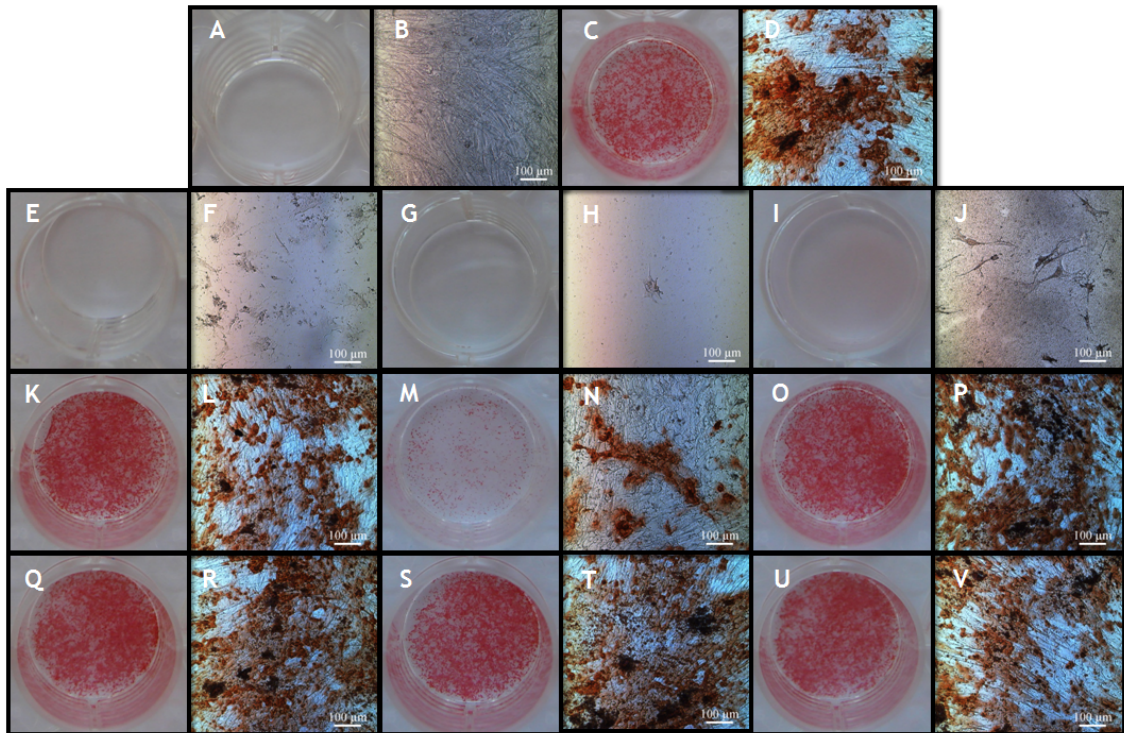


Figura 14. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de cálcio, através da coloração com alizarina vermelha, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21.

Nas Figura 14 e 15 constam os resultados obtidos da coloração com a alizarina vermelha, para detecção dos depósitos de cálcio. Em princípio, é de esperar que os resultados obtidos se assemelhem aos do teste de von Kossa uma vez que os minerais formados em cultura são fosfatos de cálcio. Como se pode visualizar, o controlo negativo não demonstra nenhuma reacção, ao contrário do controlo positivo que se encontra intensamente corado. Mais uma vez, esta observação deve-se ao efeito dos aditivos osteogénicos sobre a diferenciação celular. Nos poços que estiveram em contacto com os dendrímeros catiónicos não se observa nenhuma coloração devido à reduzida viabilidade celular. Por outro lado, nos poços que estiveram em contacto com os dendrímeros neutros e aniónicos a reacção é tão intensa quanto o controlo positivo, à excepção do dendrímero PAMAM-OH de geração G4, à concentração de 10 µg/mL, cuja reacção macroscópica não se revela tão intensa, ainda que ao nível microscópico seja possível verificar a existência de alguns depósitos de cálcio. Também o dendrímero PAMAM-COOH, G2, à concentração de 0,5 µg/mL pareceu afectar o processo de mineralização. Já as culturas realizadas na presença dos dendrímeros PAMAM-COOH, G4 e G6, à concentração de 0,5 µg/mL mostraram a presença de depósitos de cálcio, embora a coloração não seja muito intensa. No teste de von Kossa, estas culturas mostraram

ausência de depósitos de fosfatos, pelo que é possível que o teste da alizarina vermelha seja mais sensível que o de von Kossa na detecção de minerais em cultura.

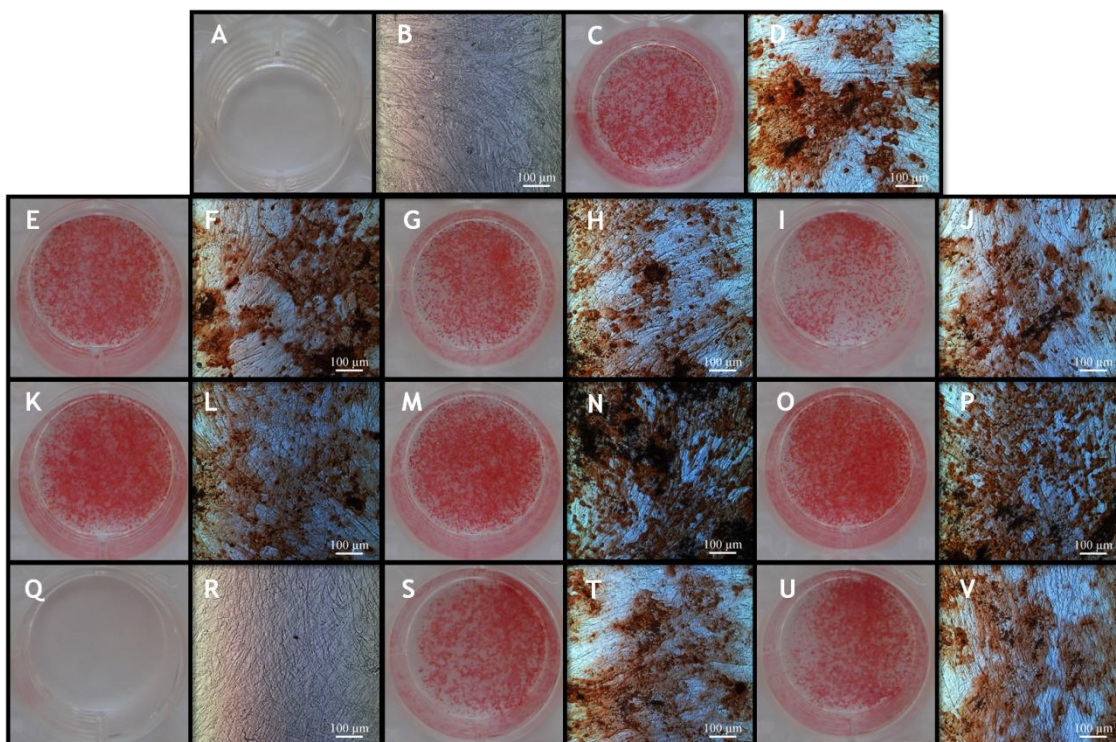


Figura 15. Culturas celulares efectuadas para detecção de depósitos de cálcio, através da coloração com alizarina vermelha, na presença de dendrímeros PAMAM com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo (A e B) e as seguintes ao controlo positivo (C e D). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (E a J), -OH (K a P) e -COOH (Q a V). As colunas referem-se à G2, G4 e G6, respectivamente. Nas imagens é possível visualizar o aspecto macroscópico das culturas, bem como as imagens obtidas por microscopia óptica, no dia 21.

3.2. Diferenciação adipogénica

3.2.1. Viabilidade celular

• Experiência 1

A viabilidade celular das MSCs durante a diferenciação adipogénica foi estimada usando o método aplicado anteriormente no caso da diferenciação osteogénica, ou seja, através do teste de redução da resazurina em resorufina. Este método avalia a actividade metabólica celular, podendo servir como parâmetro indirecto da proliferação celular. Foram efectuadas medições após 7, 14 e 21 dias de exposição aos dendrímeros. O Gráfico 7 apresenta o efeito dos dendrímeros nativos e modificados (vários grupos terminais e gerações) na viabilidade celular.

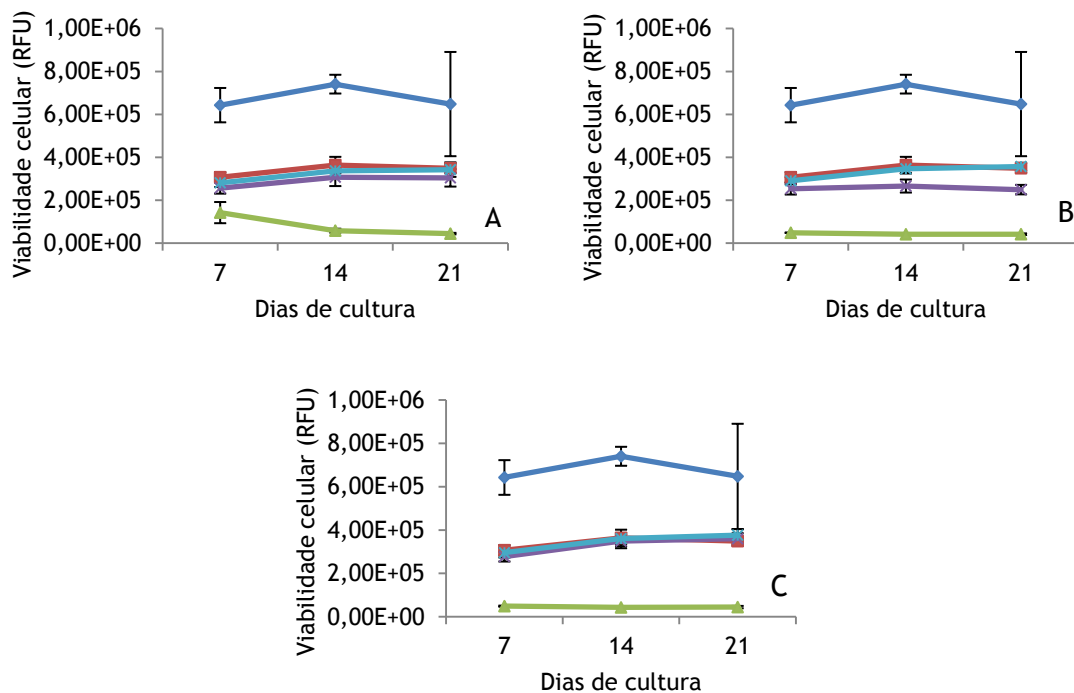


Gráfico 7. Estudo da viabilidade celular sobre a diferenciação adipogénica após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), à concentração de 10 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

No Gráfico 7 é possível observar os resultados obtidos da viabilidade celular após exposição aos dendrímeros a uma concentração de 10 µg/mL. É de salientar alguns aspectos importantes. O primeiro é que a viabilidade celular (contrariamente ao que aconteceu na diferenciação osteogénica) do controlo positivo apresenta valores mais baixos do que o controlo negativo. Tal facto deve-se, provavelmente, ao pH do meio de cultura do controlo positivo (~pH 6,4, devido à adição dos aditivos adipogénicos) que difere do pH do meio de cultura do controlo negativo (~pH 7,3). Em segundo lugar, é possível visualizar, uma vez mais, o efeito citotóxico dos dendrímeros catiónicos em relação aos neutros e aniónicos (que seguem de perto o comportamento do controle positivo). Por fim, verifica-se que não há, praticamente, proliferação celular ao longo do tempo de cultura. Isto pode dever-se ao facto das células terem entrado em diferenciação logo nos primeiros tempos de cultura, sendo sabido que as células que entram em diferenciação apresentam uma taxa de divisão celular muito baixa ou mesmo inexistente.

• Experiência 2

O Gráfico 8 mostra os resultados de viabilidade celular para experiências efectuadas a uma concentração de dendrímero mais baixa, ou seja, 0,5 µg/mL.

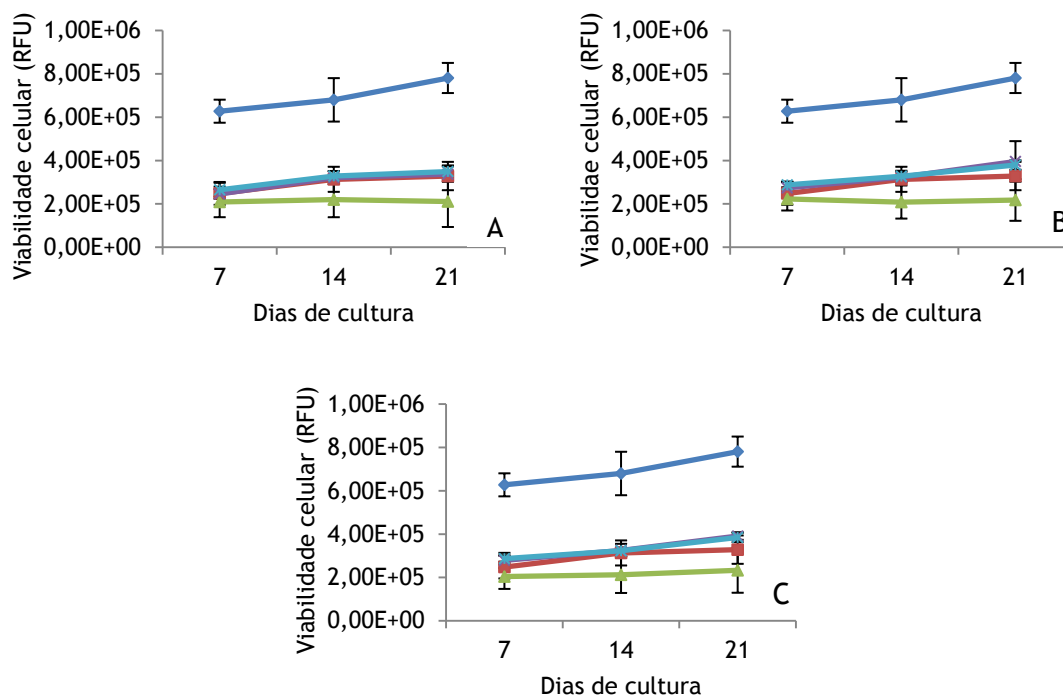


Gráfico 8. Estudo da viabilidade celular sobre a diferenciação adipogénica após exposição aos dendrímeros PAMAM de geração G2 (A), G4 (B) e G6 (C), à concentração de 0,5 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

Também aqui é possível verificar que o controlo negativo apresenta uma viabilidade celular muito superior às restantes culturas. Como já referido anteriormente, é provável que esta diferença se deva ao decréscimo do pH do meio de cultura por adição dos aditivos adipogénicos. Mais uma vez, os dendrímeros aniónicos e neutros apresentam resultados muito semelhantes ao controlo positivo, o que sugere que não são citotóxicos. No entanto, é possível verificar a citotoxicidade dos dendrímeros catiónicos.

Ao compararmos ambas as experiências, ao nível dos dendrímeros PAMAM-NH₂, conclui-se que a citotoxicidade é maior para maiores concentrações de dendrímero.

3.2.2. Coloração com óleo vermelho e sua quantificação

• Experiência 1

De modo a verificar a existência lípidos acumulados nas células, procedeu-se a uma coloração histoquímica das culturas com óleo vermelho O (Figura 16).

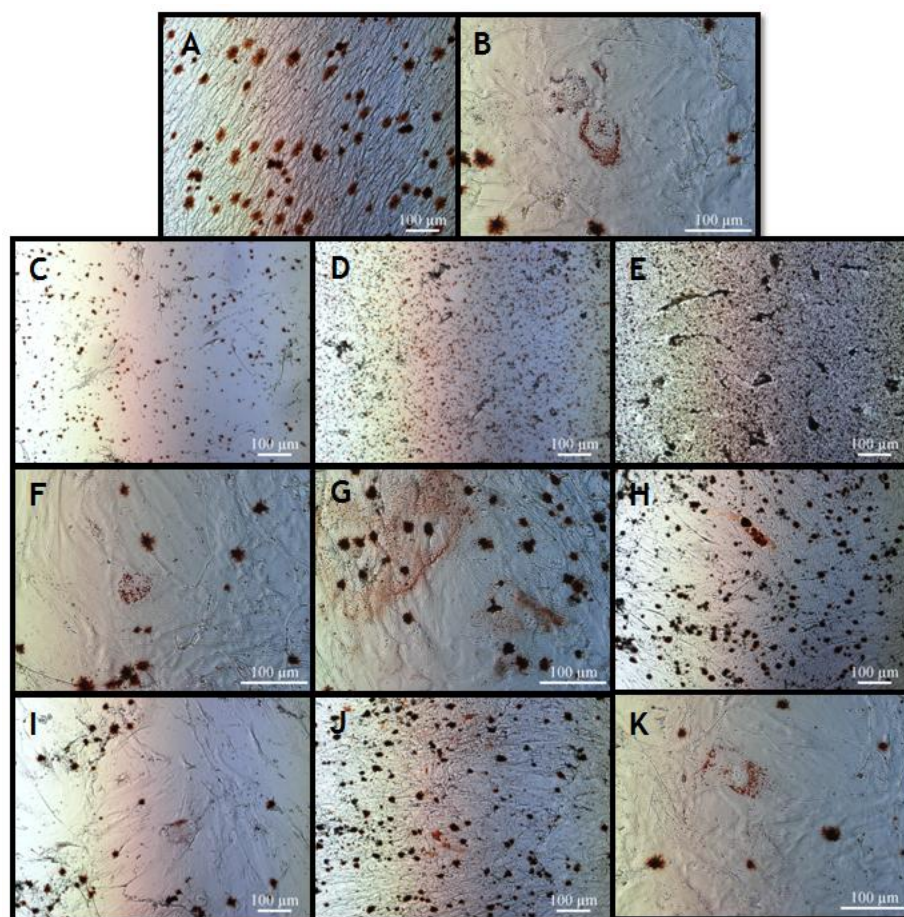


Figura 16. Culturas celulares efectuadas para detecção de vesículas de lípidos, através da coloração com óleo vermelho O, na presença de dendrímeros PAMAM à concentração de 10 µg/mL com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo e positivo (A e B, respectivamente). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (C a E), -OH (F a H) e -COOH (I a K). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. As imagens foram obtidas num microscópio óptico, no dia 21.

De forma geral, verifica-se que houve diferenciação em adipócitos em todas as culturas, inclusive no controle negativo. Neste, parece até que a extensão da diferenciação foi maior, uma vez que a imagem apresentada mostra uma maior quantidade de vesículas ricas em gorduras. No entanto, não se pode esquecer que a proliferação celular foi muito maior no controle negativo, do que no positivo e do que nas culturas efectuadas na presença de dendrímeros. Na verdade, é difícil comparar a extensão da adipogénese ocorrida nas amostras apenas através da informação histoquímica.

Assim, após a coloração das culturas, procedeu-se à quantificação do óleo incorporado obtendo-se os resultados expostos no Gráfico 9.

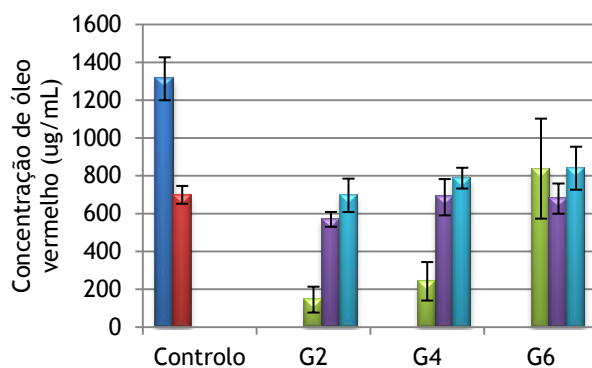


Gráfico 9. Concentração de óleo vermelho nas culturas celulares expostas a dendrímeros, com diferentes grupos terminais e de diferentes gerações, a uma concentração de 10 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

Segundo o gráfico, o controlo negativo apresenta uma maior concentração de óleo vermelho O, o que, como explicado anteriormente, se pode dever ao número muito maior de células em cultura. Por outro lado, não existem diferenças significativas na concentração de óleo presente nas amostras expostas aos dendrímeros PAMAM-OH e PAMAM-COOH e o controlo positivo. Já a concentração de óleo das amostras sujeitas aos dendrímeros PAMAM-NH₂ é mais baixa para as gerações G2 e G4 (o valor obtido para a geração G6 é inexplicavelmente elevado), o que se correlaciona com o menor número de células em cultura devido ao efeito citotóxico destes dendrímeros. Assim, tal como no caso da diferenciação osteogénica, parece que os dendrímeros não afectam a capacidade de diferenciação adipogénica das MSCs.

• Experiência 2

A Figura 17 mostra os resultados da coloração com o óleo vermelho O para uma concentração de dendrímeros de 0,5 µg/mL. As imagens expostas são complementadas com a informação quantitativa do Gráfico 10.

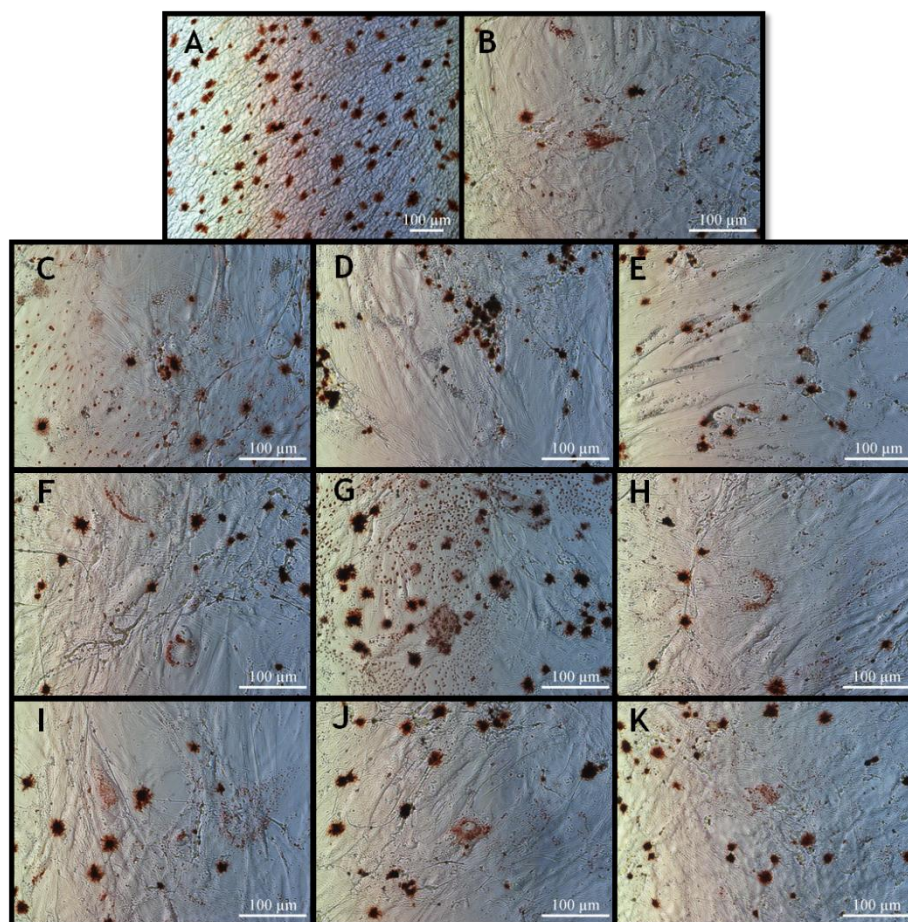


Figura 17. Culturas celulares efectuadas para detecção de vesículas de lípidos, através da coloração com óleo vermelho O, na presença de dendrímeros PAMAM à concentração de 0,5 µg/mL com diferentes grupos funcionais e diferentes gerações. As duas primeiras imagens referem-se ao controlo negativo e positivo (A e B, respectivamente). As linhas seguintes referem-se aos grupos terminais -NH₂ (C a E), -OH (F a H) e -COOH (I a K). As colunas referem-se às gerações G2, G4 e G6, respectivamente. As imagens foram obtidas num microscópio, no dia 21.

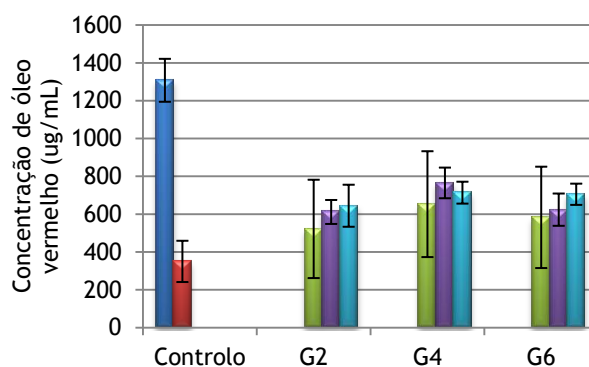


Gráfico 10. Concentração de óleo vermelho nas culturas celulares expostas a dendrímeros, com diferentes grupos terminais e de diferentes gerações, a uma concentração de 0,5 µg/mL. (—) Controlo negativo; (—) Controlo positivo; (—) PAMAM-NH₂; (—) PAMAM-OH e (—) PAMAM-COOH.

Também aqui é difícil retirar conclusões meramente dos testes histoquímicos, havendo necessidade de analisar a concentração de óleo vermelho O por extração do que ficou incorporado nas culturas celulares. Mais uma vez, à semelhança do que aconteceu na experiência 1, os resultados mostram valores muito elevados para o controlo negativo. A explicação é a mesma, prendendo-se com o número muito mais elevado de células presentes nesses poços. Por outro lado, não existem diferenças significativas entre a concentração de óleo presente nas amostras expostas aos dendrímeros PAMAM-OH, PAMAM-COOH e PAMAM-NH₂ e o controlo positivo. Comparativamente com os valores obtidos para concentrações de dendrímeros de 10 µg/mL, a concentração de óleo das amostras sujeitas aos dendrímeros PAMAM-NH₂ encontra-se próxima das obtidas nas amostras sujeitas aos dendrímeros neutros e aniónicos, traduzindo a menor citotoxicidade destes dendrímeros quando presentes em cultura a concentrações mais baixas (de realçar que os resultados obtidos para os dendrímeros PAMAM-NH₂ têm associados maiores valores de desvio padrão, podendo os valores reais situar-se bastante mais abaixo do que a média representada). Genericamente, mais uma vez, os resultados alcançados apontam para a não interferência dos dendrímeros na capacidade de diferenciação adipogénica das MSCs.

4. Discussão e conclusão

O trabalho experimental desenvolveu-se no sentido de alcançar o seguinte objectivo: estudar o efeito dos dendrímeros PAMAM, com diferentes grupos funcionais à superfície e de diferentes gerações, na diferenciação de MSCs.

As condições experimentais utilizadas na cultura primária (cultura de explantes de medula óssea em placas de poliestireno, em meio α -MEM suplementado com 10% FBS e 1% de AA) permitiram obter uma população celular com capacidade de adesão ao substrato plástico, com aparência fibroblástica e com uma elevada taxa de proliferação celular. O comportamento apresentado por esta cultura vai de encontro com os descritos na literatura [42, 49, 131-135]. As células foram utilizadas em p3 (passagem 3), uma vez que segundo a literatura as capacidades das MSCs começam a diminuir a partir de p6 (passagem 6) [4, 131, 136]. A subcultura de MSCs p3 foi mantida em meio α -MEM suplementado com 10% FBS, 1% de AA, contendo dexametasona 1 nM, β -glicerofosfato 5 mM e ácido ascórbico 250 µM, para a diferenciação osteogénica, e, para a diferenciação adipogénica, dexametasona 1 µM, indometacina 0,1 mM, isobutilmetilxantina 0,5 mM e insulina 10 µg/mL.

Como já referido no capítulo de introdução, o ácido ascórbico apresenta um papel importante na produção de matriz extracelular, num processo que é dependente da sua concentração [55]. O β -glicerofosfato é adicionado ao meio de cultura de modo a funcionar como uma fonte de fosfato orgânico, capaz de ser hidrolisado pela ALP durante o processo de mineralização da matriz [137]. A dexametasona pertence à família dos glucocorticóides e é comumente utilizada como substância indutora do fenótipo osteogénico. Esta é responsável

pelo aparecimento de marcadores fenotípicos osteogénicos como a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea [39, 56, 58, 138, 139], assim como de marcadores adipogénicos como o receptor PPAR γ 2 e CCAAT-C/EBP dependente da concentração a que se encontra em solução [39, 140]. O IBMX é utilizado com o intuito de aumentar os níveis de cAMP, PPAR γ 2 e LPL que são marcadores adipogénicos e diminuir a expressão de marcadores osteogénicos. A indometacina é utilizada como um bloqueador da diferenciação osteogénica e também se encontra associada à ligação aos receptores PPAR γ 2 [39]. Um dos fármacos mais utilizados como indutor da diferenciação adipogénica é a insulina, que aumenta e acelera a acumulação de triglicéridos [39, 69, 140].

Os dendrímeros são polímeros com características macromoleculares bem definidas, apresentam um tamanho na ordem dos poucos nanómetros e propriedades peculiares. Actualmente, os dendrímeros PAMAM são os mais utilizados pois foram dos primeiros a serem sintetizados, caracterizados e comercializados com diferentes grupos terminais e diferentes gerações [99]. Muitos grupos têm vindo a estudar a citotoxicidade destas nanopartículas *in vitro*, testando diferentes linhas celulares, diferentes tempos de incubação e diversos métodos de análise [80, 85, 88, 103, 105, 119, 141-145].

Neste trabalho, as MSCs foram cultivadas em meio indutor osteogénico e adipogénico e o comportamento celular avaliado quando colocadas em contacto com dendrímeros PAMAM com duas concentrações diferentes, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, ao longo de 21 dias de cultura. As culturas celulares foram avaliadas em relação à viabilidade celular (teste de redução da resazurina), parâmetros bioquímicos (actividade da ALP, concentração de OC, proteína total) e histoquímicos (coloração para a presença da ALP, depósitos de fosfato e de cálcio) osteogénicos e parâmetros adipogénicos (coloração e quantificação do óleo vermelho).

Em termos da diferenciação osteogénica, quer na primeira experiência como na segunda, o controlo positivo apresentou valores de proliferação muito superiores ao controlo negativo. A presença da dexametasona despoletou a proliferação das MSCs no controlo positivo e amostras expostas aos dendrímeros PAMAM. No entanto, em qualquer uma das experiências se verificou que as culturas que estavam em contacto com os dendrímeros PAMAM-NH $_2$ apresentavam uma viabilidade reduzida, ao contrário das culturas expostas aos dendrímeros neutros e aniónicos que apresentaram um comportamento semelhante ao controlo positivo. Tal facto é confirmado por diversos estudos que demonstram que a superfície catiónica destes dendrímeros é responsável pela ruptura da membrana celular e por propriedades hemolíticas [81].

Mukherjee e seus colaboradores [122] estudaram a citotoxicidade de dendrímeros PAMAM de G4, G5 e G6 em duas linhas celulares mamíferas (SW480 e HaCaT). Este grupo avaliou diversos parâmetros como a actividade metabólica, mitocondrial e lisossomal após 24 h de exposição aos dendrímeros. A citotoxicidade a longo termo foi avaliada, assim como o potencial zeta, o tamanho da partícula e a interacção com o FBS. Foi observado que existe uma tendência de uma resposta tóxica dependente da geração e interacção dos dendrímeros com o meio de cultura. Jevprasesphant e seus colaboradores [120] testaram a influência

citotóxica de diversos grupos terminais (PAMAM conjugado com ácido láurico (La), -PEG, -COOH e -NH₂) dos dendrímeros PAMAM de diferentes gerações (G2, G3 e G4) em células Caco-2. Os dendrímeros PAMAM-NH₂ apresentaram um elevado grau de citotoxicidade quando comparados com os PAMAM-COOH, revelando também um aumento da citotoxicidade com o aumento da geração e concentração. No entanto, os dendrímeros PAMAM-PEG e -La demonstraram uma decréscimo acentuado na citotoxicidade. Também Santos e seus colaboradores [88], utilizaram dendrímeros PAMAM modificados com ácidos gordos para transfecção de MSCs e verificaram baixos níveis de citotoxicidade. No seguimento deste estudo, o mesmo grupo também estudou dendrímeros PAMAM acoplados a péptidos com elevada afinidade de ligação a MSCs, os quais apresentaram baixa citotoxicidade aliada a uma eficiência de transfecção superior aos dendrímeros nativos [74]. No trabalho desenvolvido por Domanski e seus colegas [105], estes avaliaram a influência dos dendrímeros PAMAM nos eritrócitos. No estudo utilizaram dendrímeros PAMAM catiónicos de G2, G3 e G4 a diferentes concentrações (1 nM a 10 µM) e avaliaram a resposta celular através de microscopia óptica. A uma concentração de 1 nM os eritrócitos começaram a apresentar alterações na sua morfologia, perdendo a sua forma discóide. A uma concentração mais elevada de 10 nM, foram observadas células alongadas em forma de fuso e a 100 nM apresentavam uma morfologia em forma de foice. A partir de uma concentração de 10 µM surgiu a aglutinação celular. Concluíram, então, que existe uma dependência entre a hemólise e a geração/concentração dos dendrímeros. Além deste estudo, também Malik [143] e Dobrovolskaia [106] estudaram as propriedades hemolíticas dos dendrímeros PAMAM. Considerando agora os marcadores bioquímicos e histoquímicos indicadores da diferenciação osteogénica, verificamos que a diferenciação ocorreu com sucesso em qualquer uma das experiências. Ao nível da actividade da ALP, verifica-se que em ambas as experiências a actividade é superior no controlo positivo e que os dendrímeros aniónicos e neutros seguem a tendência do mesmo, ao contrário dos dendrímeros catiónicos em que a reduzida densidade celular faz com que os valores sejam praticamente nulos a concentrações de dendrímeros de 10 µg/mL, recuperando para valores próximos do controlo negativo a concentrações de dendrímeros de 0,5 µg/mL. Analisados em conjunto, os resultados dos estudos histoquímicos, nomeadamente as colorações da actividade da ALP, depósitos de fosfato (von Kossa) e de cálcio (Alizarina vermelha), mostraram que a presença dos vários tipos de dendrímeros não afectou o processo de diferenciação osteogénica.

Considerando a diferenciação adipogénica, todos os resultados da viabilidade celular foram inferiores aos do controlo negativo. Isto sugere que o meio de cultura indutor da diferenciação adipogénica foi um motivo de diminuição da densidade celular, pois o controlo positivo também foi afectado. Também nestas experiências, os dendrímeros catiónicos mostraram ser mais citotóxicos. O meio de cultura indutor adipogénico é constituído pelo meio basal de crescimento e pelos aditivos anteriormente referidos. Para cada um dos aditivos foram preparadas soluções stock com sucessivas diluições de modo a diminuir o teor de álcool na cultura celular. Por exemplo, a dexametasona foi preparada a uma concentração

inicial de 10 mM em etanol sendo posteriormente diluída (1:100) em meio de cultura não suplementado e, novamente, uma diluição para obtenção de uma concentração final no poço de 10 nM. O mesmo processo foi realizado para a indometacina (solúvel em etanol) e IBMX (solúvel em acetona). A insulina, como apresenta uma baixa solubilidade a pH neutro [146], foi solubilizada em ácido acético a uma concentração de 2 mg/mL. No entanto, ao contrário das restantes soluções, esta não foi alvo de diluição e o que se verificou é que quando adicionada ao meio de cultura este ficava mais amarelado. Posteriormente foi medido o pH do meio e verificou-se que rondava os 6.5, daí a coloração e baixa viabilidade celular obtida. Apesar desta influência, os resultados de viabilidade celular das culturas em contacto com os dendrímeros PAMAM-OH e -COOH apresentaram valores muito semelhantes ao controlo positivo, ao contrário dos dendrímeros catiónicos que, como foi referido anteriormente, levam à ruptura da membrana celular, sendo mais citotóxicos e originando uma baixa densidade celular. Em termos dos parâmetros adipogénicos, os testes qualitativos e quantitativos usando o óleo vermelho O mostraram, genericamente, que a presença de dendrímeros não afectou a capacidade de diferenciação. No entanto, a observação das imagens das culturas coradas mostrou que a extensão da diferenciação foi pequena (pequeno número de células apresentando vesículas coradas de vermelho), o que se pode ter devido a uma baixa densidade celular [147]. Segundo o que se encontra descrito na literatura [42, 148, 149], as culturas celulares devem atingir a confluência antes de se iniciar a diferenciação adipogénica, uma vez que a proliferação celular irá ser inibida.

Até à data, nenhum estudo foi efectuado com o intuito de avaliar o efeito dos dendrímeros PAMAM com diferentes grupos terminais à superfície na diferenciação de MSCs. Com este trabalho, demonstrou-se que os dendrímeros PAMAM com grupos terminais amina (-NH₂), hidroxilo (-OH) e carboxilo (-COOH) não influenciam de forma directa a capacidade de diferenciação das MSCs. Os dendrímeros catiónicos afectam, sim, a viabilidade das MSCs, quer em meio de cultura osteogénico, quer em meio de cultura adipogénico.

De uma perspectiva futura, para uma melhor compreensão e confirmação destes resultados, outras técnicas complementares como poderiam ser utilizadas como o *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR), microscopia electrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscope*, SEM) e microscopia de força atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM), com o intuito de fornecer informação mais detalhada ao nível da expressão de genes específicos da diferenciação osteogénica e adipogénica, imagem tridimensional e informação quantitativa sobre a composição dos depósitos existentes.

Referências bibliográficas

1. Alan T. Why Stem Cell Research. In: Robert L, John G, Brigid H, Douglas M, Roger P, Thomas ED, et al., editors. *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2009. p. xix.
2. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2008;2:169-83.
3. Hwang NS, Varghese S, Elisseeff J. Controlled differentiation of stem cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60:199-214.
4. Pittenger M, Mbalaviele G, Black M, Mosca J, Marshak D. Mesenchymal Stem Cells. In: Koller MR, Palsson BO, Masters JRW, editors. *Human Cell Culture: Springer Netherlands*; 2002. p. 189-207.
5. Ferrari M, Corradi A, Lazzaretti M, De'Cillà M, Losi C, Villa R, et al. Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications. *Veterinary research communications*. 2007;31:1-8.
6. Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation*. 2003;107:929-34.
7. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? *New England Journal of Medicine*. 2003;349:570-82.
8. Hogan B, Melton D, Pedersen R. *Essentials of stem cell biology*: Academic Press; 2009.
9. Ballas CB, Zielske SP, Gerson SL. Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *Journal of cellular biochemistry*. 2002;85:20-8.
10. Rosenbaum AJ, Grande DA, Dines JS. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis*. 2008;4:23-7.
11. Regateiro F, Soares J, Lobo Antunes J, Fevereiro P, Cabral RA, . Relatório sobre investigação de células estaminais. In: *Vida*. CNDÉpaCd, editor.2005.
12. Gerard K. Chapter 26 - Cell Differentiation in the Skeleton. In: Robert L, John G, Brigid H, Douglas M, Roger P, Thomas ED, et al., editors. *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2009. p. 223-6.
13. Sell S. Stem Cells. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.
14. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003;102:3483-93.
15. Hüttmann A, Li CL, Duhrsen U. Bone marrow-derived stem cells and "plasticity". *Annals of Hematology*. 2003;82:599-604.
16. Batista P. Diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas do tecido adiposo de rato na presença de purmorfamina. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2009.
17. Pomerantz JH, Blau HM. Stem Cells, Adult. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.
18. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2010;12:87-117.
19. Melton DA, Cowen C. "Stemness": Definitions, Criteria, and Standards. In: Robert L, John G, Brigid H, Douglas M, Roger P, Thomas ED, et al., editors. *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2009. p. xxiii-xxix.
20. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36:568-84.
21. Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;109:277-82.
22. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-49.
23. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *The Hematology Journal*. 2003;4:92-6.
24. Abcam. [16 Outubro 2011]; Disponível em: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11815>.
25. Prockop DJ. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science*. 1997 April 4, 1997;276:71-4.

26. Cohnheim J. Ueber entzündung und eiterung. *Virchows Archiv*. 1867;40:1-79.
27. Maximow AA. RELATION OF BLOOD CELLS TO CONNECTIVE TISSUES AND ENDOTHELIUM. *Physiological reviews*. 1924 October 1, 1924;4:533-63.
28. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-4.
29. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16:381-90.
30. Friedenstein AY, Lalykina KS, Tolmacheva AA. Osteogenic activity of peritoneal fluid cells induced by transitional epithelium. *Acta Anat (Basel)*. 1967;68:532-49.
31. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6:230-47.
32. Friedenstein AY, Lalykina KS. Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif Tissue Res*. 1970;Suppl:105-6.
33. Friedenstein A, Kurolesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation*. 1971 Aug;12:99-108.
34. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987 May;20:263-72.
35. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
36. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 1991;9:641-50.
37. Gimble J, Guilak F, Nuttall M, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell B. In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2008;35:228-38.
38. Baksh D, Song L, Tuan R. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2004;8:301-16.
39. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*. 2011;7:463-77.
40. Spitkovsky D, Hescheler J. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*. 2008;17:79-90.
41. Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62:1156-66.
42. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
43. Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*. 2005;7:36-45.
44. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8:726-36.
45. Lazarus H, Haynesworth S, Gerson S, Rosenthal N, Caplan A. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*. 1995;16:557-64.
46. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine*. 1999;5:309-13.
47. Le Blanc K, Rasmuson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*. 2004;363:1439-41.
48. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.
49. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007;38:S23-33.
50. Jackson L, Jones D, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of postgraduate medicine*. 2007;53:121.

51. Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, et al. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 2009;583:1029-33.
52. Hildebrandt C, Buth H, Thielecke H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* 2009;191:23-32.
53. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials.* 2010;31:270-8.
54. Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A. Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials.* 2006;27:6150-60.
55. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2008;105:586-94.
56. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie.* 2009;57:318-23.
57. Vallee M, Cote JF, Fradette J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathologie Biologie* 2009;57:309-17.
58. Oshina H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Sugata Y, Maehara H, et al. Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Bone.* 2007;41:575-83.
59. Park JB. The Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid, and beta-Glycerophosphate on Osteoblastic Differentiation by Regulating Estrogen Receptor and Osteopontin Expression. *Journal of Surgical Research.* 2010.
60. Mc G-RS. Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem.* 1958 Jan;6:22-42.
61. Dawson AB. A Note on the Staining of the Skeleton of Cleared Specimens with Alizarin Red S. *Biotechnic & Histochemistry.* 1926;1:123-4.
62. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology.* 2000;28:875-84.
63. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine.* 2001;226:507.
64. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology.* 2001 January 1, 2001;40:74-83.
65. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int.* 1992 Oct;51:305-11.
66. Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata RI. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell biology international.* 2004;28:255-65.
67. Hata RI, Senoo H. L ascorbic acid 2 phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *Journal of cellular physiology.* 1989;138:8-16.
68. Santos JL, Oramas E, Pego AP, Granja PL, Tomas H. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using PAMAM dendrimers as gene delivery vectors. *J Control Release.* 2009 Mar 4;134:141-8.
69. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2006;7:885-96.
70. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jan;66:236-53.
71. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2006;103:17438.

72. Santos JL, Pandita D, Rodrigues J, Pego AP, Granja PL, Tomas H. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr Gene Ther.* 2011 Feb 1;11:46-57.
73. Pandita D, Santos JL, Rodrigues J, Pego AP, Granja PL, Tomas H. Gene Delivery into Mesenchymal Stem Cells: A Biomimetic Approach Using RGD Nanoclusters Based on Poly (amidoamine) Dendrimers. *Biomacromolecules.* 2011.
74. Santos JL, Pandita D, Rodrigues J, Pego AP, Granja PL, Balian G, et al. Receptor-Mediated Gene Delivery Using PAMAM Dendrimers Conjugated with Peptides Recognized by Mesenchymal Stem Cells. *Molecular Pharmaceutics.* 2010;7:763-74.
75. Vaananen HK. Mesenchymal stem cells. *Ann Med.* 2005;37:469-79.
76. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells.* 2009;27:2614-23.
77. Lee CC, MacKay JA, Fréchet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology.* 2005;23:1517-26.
78. Jang W, Kamruzzaman Selim K, Lee C, Kang I. Bioinspired application of dendrimers: from bio-mimicry to biomedical applications. *Progress in Polymer Science.* 2009;34:1-23.
79. Greg T H. Chapter 7 - Dendrimers and Dendrons. *Bioconjugate Techniques (Second Edition).* New York: Academic Press; 2008. p. 346-90.
80. Biricova V, Laznickova A. Dendrimers: Analytical characterization and applications. *Bioorganic chemistry.* 2009;37:185-92.
81. Duncan R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced drug delivery reviews.* 2005;57:2215-37.
82. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, et al. A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer Journal.* 1985;17:117-32.
83. Newkome GR, Yao Z, Baker GR, Gupta VK. Cascade molecules: a new approach to micelles. *The Journal of Organic Chemistry.* 1985;50:2003-4.
84. Fréchet JM, Tomalia DA, Wiley J, Sons I. *Dendrimers and other dendritic polymers:* Wiley New York; 2001.
85. Wolinsky J, Grinstaff M. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews.* 2008;60:1037-55.
86. Bronstein L, Shifrina Z. Nanoparticles in dendrimers: From synthesis to application. *Nanotechnologies in Russia.* 2009;4:576-608.
87. Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Donovan BW, Baker JR. Bioapplications of PAMAM Dendrimers. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers:* John Wiley & Sons, Ltd; 2002. p. 441-61.
88. Santos JL, Oliveira H, Pandita D, Rodrigues J, Pego AP, Granja PL, et al. Functionalization of poly(amidoamine) dendrimers with hydrophobic chains for improved gene delivery in mesenchymal stem cells. *J Control Release.* 2010 May 21;144:55-64.
89. Salgado AJ, Oliveira JM, Pirraco RP, Pereira VH, Fraga JS, Marques AP, et al. Carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles in central nervous systems-regenerative medicine: effects on neuron/glia cell viability and internalization efficiency. *Macromol Biosci.* 2010 Oct 8;10:1130-40.
90. Gillies ER, Fréchet JM. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug discovery today.* 2005;10:35-43.
91. Starpharma. Disponível em: <http://www.starpharma.com/vivagel>.
92. Tay CY, Gu H, Leong WS, Yu H, Li H, Heng BC, et al. Cellular behavior of human mesenchymal stem cells cultured on single-walled carbon nanotube film. *Carbon.* 2010;48:1095-104.
93. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, et al. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett.* 2010 Dec 8.
94. Chen YC, Hsiao JK, Liu HM, Lai IY, Yao M, Hsu SC, et al. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Jun 1;245:272-9.
95. Guo L, Kawazoe N, Hoshiba T, Tateishi T, Chen G, Zhang X. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on chargeable polymer modified surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2008;87:903-12.

96. Shi X, Bányai I, Islam MT, Lesniak W, Davis DZ, Baker Jr JR, et al. Generational, skeletal and substitutional diversities in generation one poly (amidoamine) dendrimers. *Polymer*. 2005;46:3022-34.
97. Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*. 2001 Apr 1;6:427-36.
98. Guillot-Nieckowski M, Eisler S, Diederich F. Dendritic vectors for gene transfection. *New Journal of Chemistry*. 2006;31:1111-27.
99. Labieniec M, Watala C. PAMAM dendrimers—diverse biomedical applications. Facts and unresolved questions. *Central European Journal of Biology*. 2009;4:434-51.
100. Shi X, Lesniak W, Islam M, Muñiz M, Balogh L, Baker Jr J. Comprehensive characterization of surface-functionalized poly(amidoamine) dendrimers with acetamide, hydroxyl, and carboxyl groups. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006;272:139-50.
101. Devarakonda B, Hill RA, de Villiers MM. The effect of PAMAM dendrimer generation size and surface functional group on the aqueous solubility of nifedipine. *Int J Pharm*. 2004 Oct 13;284:133-40.
102. Maiti PK, Çagin T, Lin ST, Goddard III WA. Effect of solvent and pH on the structure of PAMAM dendrimers. *Macromolecules*. 2005;38:979-91.
103. Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR, Jr. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technol Today*. 2000 Jul;3:232-45.
104. Santos JL, Pandita D, Rodrigues J, Pego AP, Granja PL, Balian G, et al. Receptor-mediated gene delivery using PAMAM dendrimers conjugated with peptides recognized by mesenchymal stem cells. *Mol Pharm*. 2010 Jun 7;7:763-74.
105. Domanski DM, Klajnert B, Bryszewska M. Influence of PAMAM dendrimers on human red blood cells. *Bioelectrochemistry*. 2004 Jun;63:189-91.
106. Dobrovolskaia MA, Clogston JD, Neun BW, Hall JB, Patri AK, McNeil SE. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Lett*. 2008 Aug;8:2180-7.
107. Bryant LH, Bulte JWM. Dendrimers
Physics and Chemistry Basis of Biotechnology. In: Cuyper M, Bulte JWM, editors.: Springer Netherlands; 2002. p. 47-69.
108. Snyder SL, Sobocinski PZ. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Analytical biochemistry*. 1975;64:284-8.
109. Shi X, Thomas TP, Myc LA, Kotlyar A, Baker JR, Jr. Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer-stabilized iron oxide nanoparticles. *Phys Chem Chem Phys*. 2007 Nov 14;9:5712-20.
110. Shi X, Wang S, Sun H, Baker JR. Improved biocompatibility of surface functionalized dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Soft Matter*. 2007;3:71-4.
111. Patil ML, Zhang M, Minko T. Multifunctional Triblock Nanocarrier (PAMAM-PEG-PLL) for the Efficient Intracellular siRNA Delivery and Gene Silencing. *ACS Nano*. 2011.
112. Satake K, Okuyama T, Ohashi M, Shinoda T. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-Trinitrobenzene 1-sulfonic acid. *Journal of Biochemistry*. 1960 May 25, 1960;47:654-60.
113. Mokrasch LC. Use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the coestimation of amines, amino acids, and proteins in mixtures. *Analytical biochemistry*. 1967;18:64-71.
114. Bao G, Suresh S. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*. 2003;2:715-25.
115. El-Sadik A, El-Ansary A, Sabry S. Nanoparticle-labeled stem cells: a novel therapeutic vehicle. *Journal: Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2010;2010:2.
116. Solanki A, Kim JD, Lee KB. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging. *Nanomedicine (Lond)*. 2008 Aug;3:567-78.
117. Ferreira L. Nanoparticles as tools to study and control stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;108:746-52.
118. Kane RS, Stroock AD. Nanobiotechnology: protein-nanomaterial interactions. *Biotechnol Prog*. 2007 Mar-Apr;23:316-9.
119. Perumal OP, Inapagolla R, Kannan S, Kannan RM. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials*. 2008 Aug-Sep;29:3469-76.
120. Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*. 2003 Feb 18;252:263-6.

121. El-Sayed M, Ginski M, Rhodes CA, Ghandehari H. Influence of surface chemistry of poly (amidoamine) dendrimers on Caco-2 cell monolayers. *Journal of bioactive and compatible polymers*. 2003;18:7.
122. Mukherjee SP, Davoren M, Byrne HJ. In vitro mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers - towards quantitative structure activity relationships. *Toxicol In Vitro*. 2010 Feb;24:169-77.
123. Winnicka K, Bielawski K, Rusak M, Bielawska A. The effect of generation 2 and 3 poly (amidoamine) dendrimers on viability of human breast cancer cells. *Journal of health science*. 2009;55:169-77.
124. Oliveira JM, Sousa RA, Malafaya PB, Silva SS, Kotobuki N, Hirose M, et al. In vivo study of dendron-like nanoparticles for stem cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011.
125. Bosnjakovic A, Mishra MK, Ren W, Kurtoglu YE, Shi T, Fan D, et al. Poly(amidoamine) dendrimer-erythromycin conjugates for drug delivery to macrophages involved in periprosthetic inflammation. *Nanomedicine*. 2010 Nov 6.
126. Yang H, Kao WJ. Synthesis and characterization of nanoscale dendritic RGD clusters for potential applications in tissue engineering and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2007;2:89.
127. Lee JH, Lim YB, Choi JS, Lee Y, Kim TI, Kim HJ, et al. Polyplexes assembled with internally quaternized PAMAM-OH dendrimer and plasmid DNA have a neutral surface and gene delivery potency. *Bioconj Chem*. 2003 Nov-Dec;14:1214-21.
128. Perrot S, Dutertre-Catella H, Martin C, Rat P, Warnet JM. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicol Sci*. 2003 Mar;72:122-9.
129. Bernstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70:3899.
130. Nunnari JJ, Zand T, Joris I, Majno G. Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. *Experimental and Molecular Pathology*. 1989;51:1-8.
131. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem Smith H, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*. 2003;21:681-93.
132. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005 Oct;23:1357-66.
133. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell biology international*. 2006;30:681-7.
134. Leonardi E, Devescovi V, Perut F, Ciapetti G, Giunti A. Isolation, characterisation and osteogenic potential of human bone marrow stromal cells derived from the medullary cavity of the femur. *Chir Organi Mov*. 2008 Sep;92:97-103.
135. Beyer Nardi N, Silva Meirelles L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization *Stem Cells*. In: Wobus A, Boheler K, editors.: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 249-82.
136. Bonab M, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari S, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC cell biology*. 2006;7:14.
137. Bellows C, Heersche J, Aubin J. Inorganic phosphate added exogenously or released from [beta]-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro* 1. *Bone and mineral*. 1992;17:15-29.
138. Coelho M, Fernandes M. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid,[beta]-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 2000;21:1095-102.
139. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64:295-312.
140. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews*. 1998;78:783.
141. Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res*. 1996 Jan;30:53-65.

142. Chen HT, Neerman MF, Parrish AR, Simanek EE. Cytotoxicity, hemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126:10044-8.
143. Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener J, et al. Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release*. 2000;65:133-48.
144. Heiden TC, Dengler E, Kao WJ, Heideman W, Peterson RE. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov 15;225:70-9.
145. Majoros IJ, Myc A, Thomas T, Mehta CB, Baker JR, Jr. PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules*. 2006 Feb;7:572-9.
146. Brange J, Langkjaer L. Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH. *Acta pharmaceutica nordica*. 1992;4:149.
147. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell*. 2004;6:483-95.
148. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Biomaterials*. 2005 Nov;26:6167-75.
149. Lu H, Guo L, Wozniak MJ, Kawazoe N, Tateishi T, Zhang X, et al. Effect of cell density on adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 10;381:322-7.

