

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**DESENVOLVIMENTO DA COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA DO
SECRETOMA DE CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS E
BIOMATERIAIS NO TRATAMENTO DA PSORÍASE: UMA ABORDAGEM
PRÉ-CLÍNICA**

Patrícia Filipa Rodrigues Ferreira de Sousa

Orientadora: Professora Doutora Ana Colette Maurício

Coorientadores: Professora Doutora Joana Miranda e Mestre Rui Alvites

Porto 2020

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**DESENVOLVIMENTO DA COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA DO
SECRETOMA DE CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS E
BIOMATERIAIS NO TRATAMENTO DA PSORÍASE: UMA ABORDAGEM
PRÉ-CLÍNICA**

Patrícia Filipa Rodrigues Ferreira de Sousa

Orientadora: Professora Doutora Ana Colette Maurício

Coorientadores: Professora Doutora Joana Miranda e Mestre Rui Alvites

Porto 2020

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do estágio de conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, com foco em Medicina Regenerativa, nomeadamente ao nível de terapias com células estaminais mesenquimatosas.

Numa primeira fase, foi estudada a possibilidade de substituição do soro fetal bovino na cultura *in vitro* de células estaminais mesenquimatosas, por plasma humano do cordão umbilical dada a necessidade de utilização de suplementos *xeno-free* na preparação de terapias baseadas em células. Este foi obtido na Biosskin, Molecular and Cell Therapies S.A, sendo um banco de processamento e criopreservação deste tecido.

Posteriormente, foram desenvolvidos *patches* para aplicação cutânea em feridas, com o intuito de promover a capacidade regenerativa da pele. Os mesmos foram suplementados com secretoma de células estaminais mesenquimatosas do cordão umbilical, que representa uma das origens destas células (geleia de Wharton) com resultados regenerativos mais promissores.

Os ensaios *in vitro* realizados permitiram verificar que a substituição de soro fetal bovino por plasma humano é possível e poderá auxiliar a aplicação *in vivo* destas células em medicina humana e veterinária, assim como a sua aplicação em doenças dermatológicas.

Em adição, foi possível verificar que a utilização dos *patches* contendo secretoma é igualmente promissora, podendo ser uma alternativa futura viável no tratamento da psoríase.

Este estágio permitiu o contacto com laboratórios de terapias celulares humanas e veterinárias (GMP - Boas Práticas de Produção), a produção e teste de dispositivos médicos/biomateriais assim como a utilização de diversas técnicas laboratoriais relacionadas com a cultura celular, o que permitiu uma aprendizagem muito completa e enriquecedora.

Agradecimentos

A todas as pessoas que me ajudaram a chegar a este momento.

À minha família, em especial à minha mãe e avó, por me impulsionarem a chegar cada vez mais longe e por me apoiarem em tudo aquilo que decido fazer.

Aos amigos eternos (em especial à Bruna Lopes e à Catarina Tavares) por terem sempre uma palavra de encorajamento e de carinho, por tornarem o meu percurso tão mais fácil e por me ajudarem a não desistir independentemente do que acontecer.

Ao meu namorado, por estar sempre do meu lado, mesmo quando a frustração e a ansiedade falam mais alto.

Às minhas compinchas de estudo durante estes 6 anos (Nana, Sissi e Nussy), por nunca me deixarem sozinha um único momento.

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Colette Maurício, por toda a ajuda ao longo deste processo e pela simpatia e carinho que sempre teve para comigo.

Aos meus coorientadores, Professora Doutora Joana Miranda e Mestre Rui Alvites, por me ensinarem tanto e por estarem sempre disponíveis para me ajudar.

Ao grupo do laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, por me ajudarem a aprender muito em pouco tempo e por me auxiliarem ao longo deste projeto.

A todas as pessoas do Laboratório de Terapias Celulares Veterinárias do ICBAS, por serem as pessoas fantásticas que são e por me ajudarem tanto, sempre com uma palavra de carinho e apoio, com especial atenção à Mestre Mariana Branquinho.

Índice

Resumo.....	iii
Agradecimentos	iv
Índice.....	v
Lista de abreviaturas.....	vii
1. Revisão bibliográfica	1
1.1. Psoríase e Medicina Regenerativa	1
1.2. Células Estaminais	2
1.3. Secretoma/ Meio condicionado 2D.....	5
1.4. Biomateriais /Dispositivos médicos.....	6
1.4.1. Hidrogel de Alginato	6
1.4.2. Conservantes	7
1.4.3. Impressão 3D	7
2. Materiais e Métodos	8
2.1. Processamento do Sangue e Tecido do Cordão Umbilical.....	8
2.2. Processamento e Inativação do Plasma	9
2.3. Biomateriais.....	9
2.3.1. Produção de Hidrogel.....	9
2.3.2. Produção de Hidrogel com Meio Celular e Conservantes	9
2.3.3. Produção de Hidrogel com Secretoma e Conservantes.....	10
2.4. Meio Condicionado.....	10
2.4.1. Cultura Celular.....	10
2.4.2. Produção de Secretoma.....	11
2.5. Caracterização dos Biomateriais	11
2.5.1. Métodos de Esterilização do Alginato.....	11
2.5.2. Medição de pH.....	12
2.5.3. Reologia	12
2.6. Ensaio <i>In Vitro</i>.....	12
2.6.1. Ensaio de Viabilidade, Senescência e Citocompatibilidade	12
2.6.2. Ensaio de Liberação	15
2.6.3. Quantificação de Proteína	16
2.7. Análise Estatística	17

3. Resultados do trabalho	17
3.1. Caracterização dos Biomateriais	17
3.1.1. Medição de pH	17
3.1.2. Medição de Viscosidade (Reologia).....	18
3.2. Ensaio <i>In Vitro</i>	19
3.2.1. Ensaio de Viabilidade, Senescência e Citocompatibilidade	19
3.2.2. Quantificação de Proteína	23
4. Ensaio Futuro	23
4.1. Ensaio de Biocompatibilidade no modelo rato	23
4.2. Ensaio <i>In Vivo</i> no modelo rato	24
5. Discussão e Conclusões	24
6. Bibliografia	26
7. Anexos	30

Lista de abreviaturas

AMP	Ampicilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CA/PES	Acetato de Celulose/Poliétersulfona
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CC-motif	Quimiocina Recombinante Humana
CD	Cluster de Diferenciação
CE	Comissão Europeia
CM2D	Meio Condicionado 2D
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DMEM	Meio Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EMA	Agência de Medicamentos Europeus
FBS	Soro Fetal Bovino
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico 2
G-CSF	Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos Humanos
GM-CSF	Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos e Macrófagos
GMP	Boas Práticas de Produção
HaCaT	Queratinócitos Imortalizados da Pele Humana
HLA-DR	Antigénio Leucocitário Humano
hUCBP	Plasma de Cordão Umbilical Humano
HUCPVCs	Células Perivasculares do Cordão Umbilical Humano
IFN- γ	Interferão- γ
IL	Interleucina
ISO	Organização Internacional de Normalização
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
L929	Fibroblastos de Rato
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos 1
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
MIP-1 β	Proteína Inflamatória de Macrófagos
MSCs	Células Estaminais Mesenquimatosas
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ORBEA	Organismo Responsável pelo Bem-estar Animal

P	Passagem Celular
Pa	Pascal
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PDGF-AA	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas AA
PS	Penicilina-Estreptomicina
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
SEM	Erro Padrão da Média
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento β
Th	T Helper
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UC-MSCs	Células Estaminais Mesenquimatosas do Cordão Umbilical
UV	Radiação Ultravioleta
W	Watts
α -MEM	Meio α -Minimum Essential Eagle

1. Revisão bibliográfica

1.1. Psoríase e Medicina Regenerativa

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele que afeta milhões de pessoas e cuja incidência tem vindo a aumentar [1], [2], [3]. É uma doença de causa autoimune e não contagiosa, que se manifesta comumente pelo aparecimento de placas avermelhadas recorrentes, sobretudo ao nível dos joelhos, cotovelos, couro cabeludo, região lombar e unhas [1], [2], [4]. Provoca alterações na epiderme, tais como hiperproliferação, diminuição da diferenciação dos queratinócitos e da sua apoptose normal, neo-angiogénese e aparecimento de infiltrado inflamatório [2], [3], [4], [5]. Indivíduos que apresentem esta doença têm maior probabilidade de desenvolver outras concomitantes (metabólicas, cardiovasculares, depressão, entre outras) diminuindo conseqüentemente a sua qualidade e esperança média de vida [1], [2].

Foi possível estabelecer uma relação entre a psoríase e a produção de interleucina-23 (IL-23) e IL-17 pelas células T. Assim sendo, os tratamentos estão a evoluir no sentido de interromper estas vias, nas quais há ativação de células dendríticas e de células T. As células dendríticas são responsáveis pelo incremento de IL-12 e IL-23, que corroboram no estímulo da diferenciação de células T-helper 1 (Th) e Th17. Estas são responsáveis pelo aumento de interferão- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), assim como IL-17 e IL-22, respetivamente. Estas citocinas são responsáveis pelo aparecimento dos sintomas da psoríase (Figura I) [4], [5], [6].

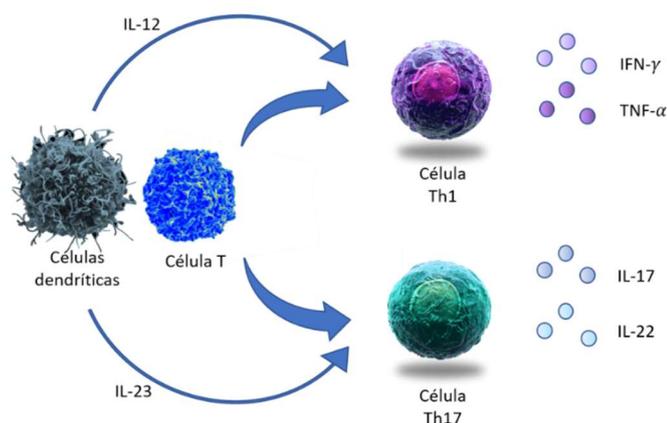


Figura I: Patofisiologia da psoríase. Adaptado de [6].

Neste momento, ainda não existe um tratamento eficaz, no entanto, optar por impedir as vias referidas anteriormente pode ser o mais indicado para o tratamento desta doença [7], [1].

A medicina regenerativa apresenta uma relevância crescente na medicina moderna, surgindo como uma alternativa às terapias convencionais e como uma oportunidade em doenças crônicas e debilitantes em que não se verifica um tratamento convencional eficaz [8].

As células estaminais mesenquimatosas (MSCs) e os seus derivados suscitam cada vez mais interesse devido ao seu potencial terapêutico, estando a sua aplicação em constante expansão nas áreas da medicina regenerativa humana e veterinária [8], [9], [10].

A sua utilização em estudos e ensaios clínicos tem aumentado de forma marcada ao longo dos últimos anos [9], [11].

A utilização do secretoma de MSCs num veículo de aplicação tópica, surge assim como uma boa opção para o tratamento desta e de outras doenças dermatológicas.

O modelo de lesão cutânea será induzido em ratos através da aplicação tópica de um agente indutor de lesões idênticas à psoríase, que irá provocar uma reação imunomediada nestes animais. De seguida a capacidade terapêutica dos *patches* será testada, sendo necessário estabelecer o esquema terapêutico e períodos de tratamento a instituir.

1.2. Células Estaminais

As células estaminais são precursores celulares imaturos que podem originar diferentes linhagens celulares e tecidos. Têm a capacidade de se dividir continuamente e de se autorrenovar [12], [13], [14].

Podem ser classificadas em 3 tipos, nomeadamente as embrionárias (pluripotentes e, por isso, podem dar origem à endoderme, ectoderme e mesoderme), as pluripotentes induzidas e as adultas (multipotentes; incluem as hematopoiéticas, neuronais e mesenquimatosas) [12], [13], [14].

As células estaminais adultas são responsáveis pela regeneração de tecidos danificados e substituição de células lesionadas. Normalmente, originam as células dos tecidos aos quais pertencem [13], [14].

As MSCs foram inicialmente caracterizadas pelo grupo de Friedenstein, como sendo aderentes e semelhantes a fibroblastos, tendo sido inicialmente descobertas na medula óssea [15], [16].

Estas células têm a capacidade de se evadir, suprimir e modelar o sistema imune, migrar para locais afetados e secretar moléculas imunomoduladoras, conseguindo assim acelerar a regeneração tecidual [12], [17], [18].

As MSCs já foram utilizadas em diversos estudos para tratamento de doenças como a artrite reumatoide, doença de Crohn, doenças cardiovasculares, paralisia cerebral, fraturas ósseas, lúpus eritematoso sistémico, esclerose múltipla, lesões nervosas, entre outros [14], [19], [20].

Podem ser isoladas de diversos tecidos (fetais e adultos), tais como a placenta, líquido amniótico, sangue do cordão umbilical, estroma do cordão umbilical/geleia de Wharton, camada subendotelial do cordão umbilical, camada perivascular do cordão umbilical, sangue periférico, medula óssea, tecido adiposo, músculo esquelético, polpa dentária, pâncreas, fígado, pulmão e baço [17], [21], [22]. Em 2006 foram estabelecidas as características mínimas que definem as MSCs humanas, sendo elas: a capacidade de aderir ao plástico em cultura; a expressão de CD105, CD90 e CD73 e não expressão de CD34 e CD45 (marcadores de células hematopoiéticas), CD11b ou CD14, CD19 ou CD79a e Antígeno Leucocitário Humano (HLA-DR); e a capacidade de se diferenciarem em pelo menos 3 linhas celulares distintas (osteoblastos, adipócitos e condroblastos) *in vitro* [23].

Apesar destas características as MSCs apresentam diferenças entre si, podendo estas estar relacionadas com o tecido de origem e com o protocolo de cultura celular utilizado. [18], [22]

As MSCs têm a capacidade de inibir as células do sistema imune inato ou adaptativo, através da inibição da diferenciação e proliferação de células T CD4⁺, maturação das células dendríticas e indução da diferenciação das células T reguladoras. Assim sendo, parecem ser uma boa alternativa para o tratamento de doenças imunomediadas [16], [24], [7].

Apesar de todas estas vantagens da sua utilização direta, pensa-se que o efeito terapêutico das MSCs está relacionado com o seu secretoma, sendo indicativo disso o facto das MSCs não serem incorporadas no local lesionado, assim como a quantidade de moléculas produzidas, com capacidade para interferir em diversos processos biológicos [12], [25], [26], [27].

Ao longo deste trabalho foram utilizados 2 tipos celulares: as células estaminais mesenquimatosas da geleia de Wharton/ do cordão umbilical (UC-MSCs) e os fibroblastos de murganho (L929).

As UC-MSCs apresentam como vantagens a baixa imunogenicidade e elevada capacidade de imunossupressão local, sendo obtidas de forma fácil e não invasiva e exibindo elevado potencial de expansão e de especialização em diversas linhas celulares. Apresentam um complexo maior de histocompatibilidade (MHC) da classe II negativo e da classe I residual, o que é vantajoso ao nível de transplantes alogénicos, uma vez que as disparidades são melhor toleradas e há menor risco de rejeição. Podem ainda ser utilizadas em transplantes autólogos e não se dividem de forma descontrolada (baixo risco de teratoma). Por fim, o número de amostras de elevada qualidade criopreservadas e facilmente acessíveis é cada vez maior, facilitando os entraves éticos associados à utilização deste tipo de células em medicina regenerativa [11], [21], [25], [28], [29], [30], [24], [31], [32].

Os L929 correspondem a uma linha celular contínua, sendo frequentemente utilizados em estudos *in vitro* devido à sua resposta biológica e taxa de crescimento reprodutíveis. Além

disso, devido à sua semelhança com os fibroblastos humanos é possível utilizar estas células em estudos referentes a doenças dermatológicas, como é o caso da psoríase^[33].

Relativamente aos protocolos de cultura de células estaminais, estes utilizam normalmente como suplemento o soro fetal bovino (FBS), que proporciona a adição de nutrientes e fatores de crescimento essenciais para o crescimento destas células, assim como proteção contra agentes citotóxicos e tamponamento do pH. No entanto, existem desvantagens na sua utilização, tais como o potencial imunogénico, a variabilidade entre lotes, o comportamento variável de diferentes tipos de células na sua presença, possível citotoxicidade, risco de contaminação celular e sacrifício de um elevado número de animais para obtenção do soro (cerca de 1.000.000 de fetos bovinos por ano)^{[11], [34]}.

Além disso, o método de recolha do sangue fetal é efetuado normalmente por punção cardíaca sem anestesia, numa altura gestacional em que o animal já sente dor (6 meses), o que gera questões éticas^[34].

Assim sendo, surgiu a necessidade de encontrar alternativas *xeno-free* (que não utilizem derivados de espécies distintas), que consigam substituir com igual eficácia o FBS, mantendo o custo reduzido, a qualidade e segurança de utilização. Um destes potenciais substitutos é o plasma de cordão umbilical humano (hUCBP), que surge como uma oportunidade para a realização de terapias autólogas^[11].

O hUCBP é considerado um produto médico, tendo de obedecer ao regulamento da comissão europeia (CE 1394/2007) assim como à agência europeia do medicamento (EMA). É necessário que o seu processamento ocorra em condições de boas práticas de produção (GMP), isto é, em condições de esterilidade, controlo de qualidade e documentação adequada, seguindo um protocolo estandardizado^{[11], [35]}.

Em Portugal, aplicam-se as Leis nº12/2009, nº1/2015 e nº99/2017 referentes à “qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana”, que definem as regras para estes procedimentos.

O hUCBP utilizado neste estudo foi processado pela Biosskin, Molecular and Cell Therapies S.A., tendo sido obtido a partir de dadores saudáveis devidamente informados através de um consentimento informado, que assinaram um contrato com esta empresa para o processamento e criopreservação da buffy coat do cordão umbilical, sendo o plasma um subproduto que normalmente é destruído e que é utilizado para investigação^[11].

Existem vários tipos de bancos de UC-MSCs, podendo estes ser públicos, nos quais a amostra pode ser utilizada por qualquer indivíduo; privados, nos quais a amostra é armazenada para uso futuro do próprio dador ou familiar em 1º ou 2º grau; ou híbrido, no qual há uma combinação dos outros dois tipos de banco^[36].

Existem diversos critérios obrigatórios para o armazenamento de UC-MSCs em bancos, tais como o acesso a documentos e historial médico dos progenitores e acesso a uma amostra do sangue materno, que tem de ser analisado para controlo de doenças infecciosas como Sífilis, Citomegalovírus, Hepatite B e C, Sida e Toxoplasmose, uma vez que na presença de qualquer um destes agentes não é possível criopreservar a amostra recolhida. Além disso, é necessário que a gestação dure pelo menos 35 semanas, a contagem de células totais nucleadas seja, no mínimo, de 1209107 e que os progenitores assinem uma autorização para a doação e atividades relacionadas [11], [37].

O sangue e o tecido do cordão umbilical são recolhidos do mesmo dador, sendo a vasculatura do cordão removida e procedendo-se à sua criopreservação para utilização futura [35].

O sangue do cordão umbilical é uma fonte tanto de células estaminais hematopoiéticas capazes de restaurar a hematopoiese, como de MSCs, sendo frequentemente utilizado em transplantes para tratamento de diversas doenças sanguíneas e imunológicas [38], [39], [40], [41], [42].

Estas células podem ser utilizadas pelo próprio paciente (transplante autólogo) ou por outra pessoa (transplante alogénico), sendo que pode ser um familiar com compatibilidade de HLA-DR ou não existir relação, desde que exista compatibilidade [41], [43].

1.3. Secretoma/ Meio condicionado 2D

O secretoma corresponde ao conjunto de todos os fatores e moléculas que são secretados pelas células em cultura para o espaço extracelular. Este contém uma fração proteica solúvel (fatores de crescimento e citocinas) e uma fração vesicular (corpos apoptóticos, microvesículas e exosomas). Estes componentes podem variar influenciados pelo tipo e estadió da lesão [12], [25], [26].

Neste trabalho utilizou-se meio condicionado 2D de UC-MSCs (CM2D), isto é, meio produzido em monocamada estática, na qual as células proliferam aderidas à superfície do *T-flask*. No entanto, este sistema não corresponde às condições verificadas nos modelos *in vivo*, no qual as células interagem em 3 dimensões, podendo assim verificar-se diferenças no seu metabolismo e funcionalidade. Essa é a maior diferença em relação ao meio condicionado 3D, na qual é utilizado um *spinner* em constante agitação [44], [45].

A aplicação terapêutica de CM2D apresenta vantagens relativamente à aplicação direta de MSCs, tais como: maior facilidade de utilização e armazenamento, maior duração de armazenamento, menor custo e ausência de expressão de moléculas de superfície (menor imunogenicidade). Elimina-se também a possibilidade de desenvolvimento de tumores (risco ao injetar células vivas em tecidos), a ocorrência de embolismos e de infeções [12], [25].

Implica um número inferior de células para a sua produção do que as necessárias para aplicação direta num tratamento. Em adição, pode ser modificado consoante o efeito terapêutico desejado [12], [25].

Estes fatores tróficos auxiliam ainda a renovação, diferenciação e migração celular, modelam a resposta inflamatória e induzem a angiogénese local. São mais estáveis, promovem um microambiente para as células lesionadas sobreviverem e apresentam fatores anti-oxidantes e anti-fibróticos [17], [19], [44], [46]. Diversos estudos comprovam a capacidade regenerativa do secretoma em feridas da pele, assim como noutros tecidos [44], [47], [48], [49], [50]. No entanto, ainda não foi possível definir qual a composição exata do secretoma de UC-MSCs, nem a duração ou atividade dos seus componentes, apesar de secretomas provenientes de alguns tipos celulares estarem mais caracterizados do que outros [12], [25]. Assim sendo, cada grupo de investigação seleciona os compostos que considera mais apropriados para o seu trabalho, não considerando necessariamente o secretoma como um todo [25].

Foi comprovado através de diversos trabalhos que estão presentes alguns fatores imunomodulatórios, quimiotáticos e proliferativos no secretoma destas células, como por exemplo o TGF- β , G-CSF, FGF-2, KGF, EGF, GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-21, MCP-1, MIP-1 β , C-C motif, RANTES e PDGF-AA e fatores vasculogénicos [19], [21], [44], [51], [52].

Diversos estudos demonstram que o secretoma é influenciado pelo microambiente, apesar de ainda não ser possível definir o seu mecanismo exato. No entanto, a exposição a citocinas inflamatórias, a suplementação com fatores de crescimento e valores de oxigenação variáveis irão alterar a sua composição e ação [19], [25], [51].

A inexistência de um protocolo definido para a produção, recolha e processamento do secretoma, produz variabilidade entre estes. Isto deve-se, por exemplo, a diferenças relativas ao dador, ao tecido de origem, às distintas condições de cultura, à passagem celular em que se colocam as células em condicionamento e à utilização de culturas 2D ou 3D [19], [25].

Para estandardizar a produção de secretoma é necessário considerar os fatores referidos anteriormente, uma vez que estes influenciam os compostos secretados e as composições exossomais. Deve-se chegar a um consenso e definir um protocolo para cada fase da produção do meio condicionado, assim como o seu armazenamento e transporte [12], [25].

1.4. Biomateriais /Dispositivos médicos

1.4.1. Hidrogel de Alginato

Os hidrogéis são polímeros hidrofílicos que contém uma elevada percentagem de água, sendo biocompatíveis, permeáveis e podendo ser facilmente aplicados no local lesionado [53].

Neste estudo foi utilizado o alginato, um polímero natural extraído de algas castanhas (*Laminaria hyperborea* e *L. lessonia*). O mesmo pode também ser produzido por fermentação bacteriana, mas esta versão ainda não é comercializada. Apresenta baixa toxicidade, baixo custo e é facilmente adquirido [45], [54], [55].

O alginato é frequentemente utilizado na área da medicina regenerativa ao nível da regeneração, formulações com agentes bioativos e terapias celulares [45], [56]. A sua relevância deve-se à sua biocompatibilidade, facilidade em formar hidrogéis e capacidade de controlo da sua biodegradação [45], [57]. Apresenta a capacidade de formar soluções aquosas com maior viscosidade, após dissolução [56]. Consegue ainda formar géis através da adição de sais de cálcio, uma vez que estes catiões removem o sódio do alginato e formam ligações de cadeia longa, formando um hidrogel mais estável e resistente [54], [56], [57]. Em adição, o hidrogel de alginato forma-se à temperatura ambiente e em condições fisiológicas, mantendo a sua estrutura quando é aquecido, sendo simples de elaborar e de manter até ao momento da sua utilização [56].

1.4.2. Conservantes

Conservantes são substâncias químicas utilizadas na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética com o objetivo de impedir ou retardar o desenvolvimento de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) [58].

Neste trabalho foram utilizados diversos conservantes, tendo sido selecionado apenas um para integrar o produto final. O motivo prendeu-se com a incapacidade de efetuar uma impressão em ambiente estéril, assim como à não esterilidade da elaboração dos biomateriais.

1.4.3. Impressão 3D

A impressão 3D utiliza materiais biocompatíveis para gerar diversos padrões 3D, permitindo a incorporação de células e/ou biomoléculas, que ficam aí preservadas e viáveis. O objetivo é utilizar posteriormente o material final para tratamento de tecidos lesionados [45], [59].

Atualmente pretende-se diminuir a complexidade do processo de fabrico, preservando a sua arquitetura, as biomoléculas/células e o seu suporte mecânico e aporte nutritivo, e ainda a capacidade de integrar o hospedeiro [59].

Na impressão são concebidos padrões 3D em espaços bem definidos, sendo essenciais 2 componentes denominados *bioink* e *biopaper*. O primeiro diz respeito ao material utilizado para a impressão, que se assemelha a uma matriz extracelular e onde se depositam as células ou biomoléculas (hidrogel). Por sua vez, o *biopaper* corresponde ao substrato no qual os padrões são depositados [59].

As vantagens deste método relacionam-se com a capacidade de produzir *scaffolds* com distribuição homogénea e com uma arquitetura complexa, podendo incorporar uma dose idêntica e pré-definida e sendo de fácil aplicação [56].

No caso da psoríase e de outras doenças dermatológicas, faz sentido utilizar um veículo de aplicação tópica, no qual possamos definir a dose de princípio ativo que queremos administrar, tendo por isso sido elaborado um *patch* 3D de alginato, no qual foi posteriormente incorporado o secretoma.

2. Materiais e Métodos

2.1. Processamento do Sangue e Tecido do Cordão Umbilical

O cordão umbilical colhido foi inicialmente pesado e lavado, através da passagem em álcool (30 segundos em agitação) intercalada com tampão fosfato-salino (PBS), repetindo-se o processo 2 vezes, terminando com PBS para eliminar o álcool remanescente.

De seguida efetuou-se a medição do comprimento do cordão e seccionou-se o mesmo com um bisturi a cada intervalo de 5 cm, lavando-se novamente com PBS.

Procedeu-se à abertura do cordão para expor e remover os vasos sanguíneos, cortando-se no final até este se encontrar liquefeito (obter no mínimo 9,1g).

A solução de criopreservação foi elaborada com Albumina Humana, Dimetilsulfóxido (DMSO) e Plasma-Lyte, a qual se junta ao sangue e tecido do cordão anteriormente referido em *vials* de congelação. Efetuou-se o seu arrefecimento lento com recurso a um Sy-lab Icecube (-120°C), tendo-se por fim colocado numa arca a -180°C.

O sangue do cordão umbilical foi pesado (volume mínimo necessário é 15ml) e colocado em agitação durante 10 minutos para homogeneização, sendo transferido de seguida para um kit dentro da câmara de fluxo laminar, o qual foi escorrido no exterior. Neste momento, efetuou-se a identificação do kit em diversos locais. Posteriormente, realizou-se agitação mecânica durante 2 minutos para retirar o volume inicial que deverá estar compreendido entre 1-2 ml. Este foi dividido em 3 para controlo, hemograma e armazenamento.

De seguida realizou-se uma centrifugação dupla, sendo o primeiro ciclo de 20min, 1400 rpm, 14°C e o segundo ciclo de 10 minutos a 80 rpm, utilizando-se o sistema AXP (Thermogenesis) para separar os glóbulos vermelhos e o plasma.

Este sangue é analisado antes e depois da utilização do sistema anterior por métodos hematológicos, para determinação de hematócrito e plaquetas, sendo definida a recuperação (70% é considerado um bom valor) – volume inicial e final (Ac T diff2™ Beckman Coulter, Inc.); citometria de fluxo (quantificação das células CD34⁺ e CD45⁺ - BD FACSCalibur™ 3 CA Becton

Dickinson, BD Biosciences) e microbiologia para aeróbios e anaeróbios durante 14 dias, a 35°C (BacT/ALERT®, BioMérieux), na qual é utilizado o plasma ou plasma e eritrócitos.

Por fim, é acoplada uma seringa com 7ml de DMSO ao kit, sendo introduzidos 5ml na amostra, de forma lenta, através da Coolmix a 4°C. O kit é selado, permanecendo com amostras de sangue para testagem a cada 5 anos, sendo esta porção armazenada numa cassette.

O sangue materno é utilizado para detecção de doenças infecciosas (referidas anteriormente), assim como realização de hematologia. O plasma não utilizado é armazenado para posterior utilização nos ensaios *in vitro* realizados.

Em anexo (I, II e III) encontram-se imagens relativas ao processamento do sangue e tecido do cordão umbilical realizados na Biosskin, Molecular and Cell Therapies S.A.

2.2. Processamento e Inativação do Plasma

Para a sua inativação, o plasma é colocado num tubo *Falcon* e é centrifugado a 2500-3000 rpm durante 10 minutos, sendo posteriormente transferido para outro tubo e o seu depósito descartado.

De seguida, é colocado em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, sendo que no final deste processo é imediatamente colocado em gelo até arrefecer.

Por fim, é utilizado um filtro de 0,22µm para filtrar e o plasma remanescente é congelado até ao momento da sua utilização.

2.3. Biomateriais

2.3.1. Produção de Hidrogel

O hidrogel foi inicialmente elaborado com alginato de sódio 1,5% (Medium Viscosity Alginate Sodium Salt Powder; Sigma-Aldrich) e água destilada (dH₂O).

A solução de *cross-linking* foi produzida com cloreto de cálcio 3% (CaCl₂; Sigma-Aldrich) e água destilada, sendo adicionada imediatamente após a impressão.

As soluções de alginato foram impressas em 3D (3D Focus printer; ByFlow Netherlands), com uma agulha de 0,8mm. As dimensões dos *patches* são de 10mm x 10mm, com z = 0,3mm.

Os parâmetros de otimização da impressora consistem num hidrogel de alginato a 6%.

2.3.2. Produção de Hidrogel com Meio Celular e Conservantes

Foram elaboradas 6 formulações distintas constituídas por alginato 1,5% (UV), meio de cultura celular α-Modified Eagle's (α-MEM) e um conservante.

Os 6 conservantes utilizados foram: Hidroximetilglicinato de Sódio 0,1% (Ashland), Cetrimida 0,1% (FeF chemicals), Cloreto Benzalcônio 0,1% (Sigma-Aldrich), Clorohexidina 0,3% (Acofarma), Geogard Ultra® 1,5% (Lonza) e Nipagin™ 0,18%/ Nipazol® 0,02% (Fagron).

2.3.3. Produção de Hidrogel com Secretoma e Conservantes

Foram elaborados hidrogéis semelhantes aos anteriores, contendo secretoma proveniente de UC-MSCs concentrado 10 e 100 vezes em substituição do meio de cultura.

Na Figura II é possível verificar um esquema representativo da produção dos *patches* contendo o hidrogel com secretoma/ meio de cultura/ água destilada e um conservante.

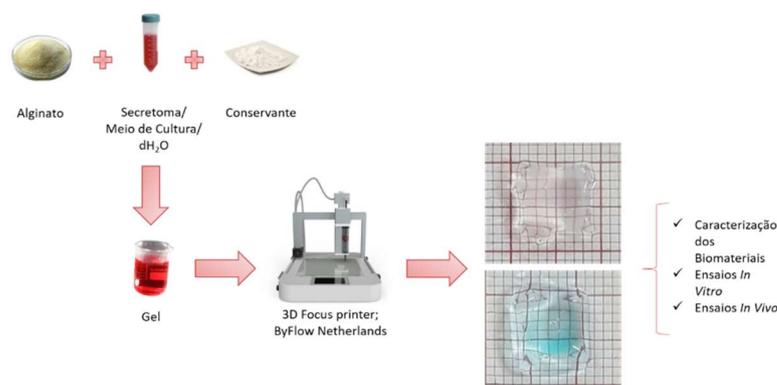


Figura II: Esquema representativo da elaboração dos *patches*.

2.4. Meio Condicionado

2.4.1. Cultura Celular

Efetuaram-se descongelamentos sucessivos de UC-MSCs da linha 248, procedendo-se à sua expansão em culturas de monocamada (2D). Para efetuar o descongelamento procedeu-se ao aquecimento rápido do *vial* de congelação, contendo as células com 10% de DMSO e Soro Fetal Bovino (FBS) (Gibco®). De seguida misturou-se o conteúdo do *vial* (1 ml) com 9 ml de meio α -MEM (Sigma-Aldrich®) e centrifugou-se para eliminar o DMSO, uma vez que este é tóxico para as células à temperatura ambiente. Após contagem semeou-se entre 6.500 – 7.000 células/cm² em α -MEM com 10% de FBS em *T-flasks*, incubando-se a 37°C e em atmosfera húmida (95%) com 5% de CO₂. A cultura foi observada diariamente e após obtenção de uma confluência de 80-90%, foi efetuada passagem celular (até P11-P16). Para a passagem celular removeu-se o meio de cultura, lavando-se de seguida com PBS. Após a lavagem, adicionou-se Tripsina 0,05% com incubação durante 5 minutos, para destacamento das células aderidas à superfície do *T-flask*.

Retiraram-se as células e colocaram-se num *Falcon* com meio de inativação (qualquer meio basal com 10% de FBS), procedendo à sua centrifugação a 200g durante 5 minutos. Por fim, eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em meio de cultura basal com 10% de FBS para posterior inoculação em *T-flasks*. Todo o processo foi elaborado nas devidas condições de esterilidade.

2.4.2. Produção de Secretoma

Numa segunda fase, as células foram cultivadas a uma densidade de 10.000 células/cm² em meio α -MEM suplementado com 5% de FBS até atingirem uma confluência de cerca de 90%. Nesse ponto, o meio de cultura foi substituído por um meio sem suplementação de FBS, obrigando as células a produzir e secretar os seus próprios fatores tróficos/de crescimento. As células foram assim condicionadas durante 48 horas a um rácio de 3.2x10⁵ células/ml, culminando na recolha de meio. Após recolha, efetuou-se centrifugação a 300g durante 10 minutos, a 4°C, para remover células em suspensão. Um novo ciclo de centrifugação (2700g, 30min, 4°C) foi realizado para remover detritos celulares. Posteriormente, este meio foi centrifugado sucessivamente em concentradores de proteína (200g; 90-60min) até se atingir uma concentração de 100x. Efetuou-se a junção e homogeneização dos secretomas recolhidos, para se obter uma amostra uniforme, sendo esta preservada a -80°C até ao momento da sua utilização.

2.5. Caracterização dos Biomateriais

2.5.1. Métodos de Esterilização do Alginato

A esterilização consiste na eliminação de todos os microrganismos presentes num determinado objeto ou local, através da ação de agentes químicos ou físicos.

A radiação ultravioleta (UV) é um método muito utilizado e inclui uma fonte de radiação UV que emite em comprimentos de onda semelhantes aos do DNA e proteínas. A esterilização ocorre através de uma exposição com potência e duração suficientes para destruir a estrutura molecular de qualquer microrganismo ali presente (bactérias, vírus, fungos) ^{[60], [61]}.

Por sua vez, a esterilização por calor húmido é realizada por um autoclave, utilizando o vapor de água para esterilizar por contacto direto, a uma temperatura e pressão elevadas, durante um período de tempo pré-definido. O objetivo é desnaturar as proteínas dos microrganismos, eliminando-os ^[62].

Efetuu-se a esterilização do alginato em pó com radiação ultravioleta (UV-C; 15W; 16h) e por calor húmido (121°C, 20min), elaborando-se posteriormente as formulações com esses compostos (1,5%) e água destilada.

2.5.2. Medição de pH

A conformação das proteínas é alterada perante a variação de diferentes parâmetros, tais como a temperatura e o pH da solução [63]. Assim sendo, é fundamental para este trabalho controlar estes parâmetros na formulação que irá incorporar o secretoma.

Foram registados os valores de pH das formulações que continham alginato 1,5% (UV), α -MEM e conservantes para determinar o pH dos mesmos. Como controlo foi utilizado o alginato 1,5% (UV) com meio de cultura. O pH foi medido com recurso a um medidor de pH, à temperatura ambiente.

2.5.3. Reologia

A reologia é um parâmetro importante a avaliar quando se pretende efetuar impressões 3D, permitindo monitorizar a cinética da reação de *crosslinking*, sendo que pode alterar a sua formação e densidade perante alterações nas propriedades reológicas [54], [64]. Dentro deste parâmetro foi avaliada a viscosidade. A viscosidade foi medida através de um riómetro (controlled stress Kinexus Rheometer; Malvern) com uma geometria cone e prato (ângulo truncado de 4° e 40nm de raio). As medições foram efetuadas entre 1 e 1000 Pa com um aumento logarítmico de 0.1 a 100 s⁻¹, a 25°C.

2.6. Ensaio *In Vitro*

2.6.1. Ensaio de Viabilidade, Senescência e Citocompatibilidade

Estes ensaios foram elaborados devido ao interesse crescente em encontrar alternativas *xeno-free* para substituição do FBS nos protocolos de culturas celulares. Foram utilizadas UC-MSCs (na sequência da sua utilização nos ensaios anteriores) e L929, representando estes um exemplo de modelo celular das células da pele, sendo relevante ao nível da psoríase, uma doença inflamatória da pele.

O ensaio MTT permite determinar a viabilidade e proliferação celular através da atividade mitocondrial das células, uma vez que há conversão da solução MTT (Brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) em cristais insolúveis de cor roxa (formazan) pelas enzimas oxidoreduases dependentes do NAD(P)H. Dado que para a maioria das populações celulares,

a atividade mitocondrial está relacionada com o número de células viáveis, podemos assim determinar a citotoxicidade de diversos compostos [65], [66].

O PrestoBlue™ é um ensaio de viabilidade celular, no qual o reagente corresponde a uma solução com resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3ona-10-óxido). As células vivas reduzem a resazurina, um composto azul e não fluorescente, em resorufina, um composto vermelho fluorescente, que fica mais intenso quanto maior a viabilidade celular. A viabilidade celular e, indiretamente, a capacidade metabólica é posteriormente determinada através de medições de absorvância [66], [67].

A maior vantagem do ensaio pelo método do PrestoBlue™ é a possibilidade de manutenção da viabilidade das células, uma vez que este agente não é citotóxico, em determinadas concentrações e num curto espaço de tempo. Assim sendo, podem ser continuamente utilizadas, sendo somente necessário remover a solução, lavar e substituir por meio de cultura fresco. É um método simples e rápido, que apenas exige um período de incubação reduzido [68], [69].

O TrypanBlue Exclusion Assay é uma técnica que permite determinar o número de células totais, diferenciando as vivas e mortas presentes numa amostra. Enquanto as células viáveis mantêm integridade membranar relativamente ao corante, as células mortas ou lesadas permitem a passagem do mesmo através da membrana, ficando esta corada de azul. A contagem do número de células coradas, por métodos automáticos ou manuais, permite determinar o número de células mortas [70].

A senescência corresponde ao envelhecimento celular com consequente alteração no ciclo de divisão celular. Esta pode ser determinada através da mensuração da atividade da β -Galactosidase, sendo possível marcar as células senescentes de forma simples, rápida e eficaz mesmo perante populações celulares heterogêneas e tecidos envelhecidos [71].

2.6.1.1. Viabilidade – PrestoBlue™

L929 e UC-MSCs foram semeados a uma densidade de 3.000 células/cm², em placas de 24 poços e em meio α -MEM suplementado com 10% de FBS, 1% de Penicilina-Estreptomicina (PS), 1% de Ampicilina (AMP) e 1% de HEPES. Após 24 horas, para permitir adesão celular, o meio foi substituído pelo mesmo meio basal, mas suplementado com FBS a 10%, hUCBP a 10% e a 15%, e 10% DMSO respetivamente para quatro grupos diferentes.

O grupo suplementado com FBS a 10% corresponde ao controlo positivo e o grupo suplementado com 10% DMSO ao controlo negativo. Os restantes grupos correspondem aos grupos teste. O design experimental deste ensaio baseia-se na hipótese destes grupos teste apresentarem comportamento celular *in vitro* igual ou melhor relativamente ao grupo controlo positivo.

Em cada *timepoint* (0h, 48h, 96h e 144h) o meio foi substituído por meio fresco com 10% do reagente PrestoBlue™ (ThermoFisher Scientific), sendo a placa colocada em incubação durante 1 hora a 37°C, em atmosfera húmida (95%) com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante de cada poço é avaliado, sendo a absorvância de cada um medida a 570nm (excitação) e 595nm (emissão) no leitor de placas Thermo Scientific Multiskan FC.

2.6.1.2. TrypanBlue Exclusion Assay

Paralelamente ao ensaio de viabilidade celular pelo método do Presto Blue™, as UC-MSCs e L929 foram semeadas a uma densidade de 3.000 células/cm², em placas de 24 poços. Foram colocadas em meio α -MEM, suplementado com 1% de PS, 1% de AMP e 1% de HEPES, assim como FBS a 10%, hUCBP a 10% e a 15% e DMSO a 10%, respetivamente, sendo mantidos a 37°C numa atmosfera húmida (95%) com 5% de CO₂. Os controlos são idênticos aos do ensaio anterior. Em cada tempo (0h, 48h, 96h e 144h), o meio de cultura foi retirado, lavado três vezes com PBS, tendo sido efetuada incubação com Tripsina 0,05% (Gibco®) durante 3 minutos até ocorrer destacamento celular. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio basal e coradas com TrypanBlue 0,4% (Sigma-Aldrich), procedendo-se a contagem celular em triplicados para cada grupo em cada *timepoint*, com um Countess II FL Automated Cell Counter (Invitrogen™).

2.6.1.3. Senescência

Para o ensaio de senescência, ambas as populações celulares (UC-MSCs e L929) foram semeadas a uma densidade de 3.000 células/cm² em placas de 96 poços, mantendo-se o mesmo design experimental relativamente aos dois ensaios anteriores, isto é, meio basal (α -MEM) suplementado com 10% FBS como grupo controlo positivo, meio basal (α -MEM) suplementado com 10% DMSO como grupo controlo negativo, meio basal (α -MEM) suplementado com 10% hUCBP como grupo teste 1 e suplementado com 15% hUCBP como grupo teste 2.

Às 0h, 48h e 144h o meio de cultura foi removido e após lavagem com PBS as células foram incubadas com o reagente da β -Galactosidase (ThermoFisher Scientific), durante 30 minutos a 37°C, numa atmosfera húmida (95%) com 5% de CO₂, sendo posteriormente lida a absorvância a 405nm.

2.6.1.4. Citocompatibilidade dos Conservantes

Foi realizado um ensaio MTT com queratinócitos imortalizados da pele humana (HaCaT) para testar a citocompatibilidade dos conservantes e seleccionar um único para incorporar no produto final. Utilizou-se o meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FBS, 1,6% de glicose e 1% de Penstrep (Gibco®). Foi elaborado o gel de alginato 1,5% (UV) com α -MEM ao qual foi adicionado cada um dos 5 conservantes, sendo estas as amostras testadas. Foram ainda elaborados controlos que apenas continham alginato 1,5% (UV) com dH₂O e alginato 1,5% (UV) com α -MEM. O controlo positivo do ensaio consistiu em células com DMEM e o controlo negativo em células com DMEM e 20% de DMSO. Cada uma destas 9 condições foram replicadas 6 vezes, sendo realizados 3 ensaios independentes. Inicialmente as HaCaT foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3.0×10^5 células/cm². Procedeu-se então a uma incubação até atingirem uma confluência de 25-30%. De seguida, efetuou-se a diluição dos conservantes e controlos em meio, na proporção de 1:10, separadamente para cada placa. Procedeu-se à incubação das células durante 48 horas nestas novas condições. Posteriormente, substituíram-se os meios pela solução MTT e decorridas 2 horas de incubação adicionou-se 200 μ l de DMSO, homogeneizando até ocorrer dissolução dos cristais. Por fim, procedeu-se à leitura da absorvância (570nm) num espectrofotómetro SPECTROstar® Omega (BMG Labtech).

2.6.1.5. Citocompatibilidade dos *Patches* com Meio de Cultura

Um segundo ensaio MTT foi realizado em condições similares, com exceção do inóculo de células (6.0×10^5 células/cm²). Apenas foram realizados 2 ensaios independentes, em placas de 24 poços. O objetivo foi testar a citocompatibilidade dos *patches* com α -MEM em células HaCaT.

2.6.2. Ensaio de Libertação

O ensaio de libertação em banho-maria com agitação foi realizado para tentar determinar a velocidade de libertação do composto do *patch*.

As células de Franz foram utilizadas para medir a permeabilidade da pele à difusão de um composto *in vitro*. Esta técnica implica a utilização de membranas sintéticas ou de origem animal e baseia-se no contacto da substância com o meio seleccionado através dos poros membranares, simulando assim a pele. É estipulado o tempo de contacto e os tempos de recolha de amostra para análise, sendo o objetivo determinar a concentração de secretoma que se

libertou através da membrana e ficou retido no meio, mimetizando assim o seu comportamento ao nível da pele [72], [73].

Este método apresenta como vantagens a baixa quantidade de composto necessário, baixa manipulação e facilidade de execução [74].

2.6.2.1. Banho-maria em Agitação

Foram impressos *patches* contendo secretoma concentrado a 10 vezes, com 1 e 2 camadas. O ensaio foi realizado com 6 replicados de cada e 6 controlos (*patch* elaborado com dH₂O). As amostras foram colocadas em PBS, em banho-maria a 37°C com agitação. Efetuaram-se medições ao longo de 24 horas, com recolha de amostras para quantificação de proteína de baixo volume e Bradford no espectrofotómetro SPECTROstar® Omega (BMG Labtech).

2.6.2.2. Células de Franz

Foi realizado um ensaio com células de Franz contendo PBS, nas quais se colocou gel com secretoma concentrado a 100 vezes (3 replicados), secretoma e α -MEM como controlos. Foram retiradas amostras ao longo de 24 horas para realização de Bradford.

2.6.3. Quantificação de Proteína

O método Bradford tem por base a reação de um corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) com os resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas. A quantidade de proteína presente na amostra é posteriormente estimada através da quantidade de corante presente, pela leitura da absorvância. É um método rápido, simples e com boa sensibilidade, sendo por isso muitas vezes utilizado em detrimento de outros [75], [76]. A quantificação de proteína de baixo volume é realizada com recurso a uma placa LVIs e é um método mais rápido e que exige menos quantidade de amostra de cada vez. A placa apresenta 16 poços de microgotas, apresentando o formato normal de uma placa de 96 poços. É facilmente limpa e reutilizada e as concentrações de proteína são obtidas através da medição da absorvância [77], [78].

2.6.3.1. Bradford

A proteína total do *pellet* celular foi quantificada após lise celular com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M a 37°C durante 5 minutos. Foi igualmente quantificada a proteína presente no secretoma, após homogeneização do total recolhido, assim como as proteínas dos ensaios de libertação efetuados. O reagente (Protein Assay Dye Reagent Concentrate; BIO-RAD) foi diluído

em 1:4 partes de água MiliQ, sendo filtrado de seguida (filtro CA/PES) para remover partículas em suspensão.

Foi elaborada uma curva de concentração com uma proteína standard (Albumina Sérica Bovina – BSA), contendo 6 diluições (1000 µg/ml – 0 µg/ml). Foi utilizada uma placa de 96 poços na qual cada amostra, incluindo a curva de concentração, foi elaborada em replicado. Cada amostra (10µl) foi colocada num poço distinto, adicionando-se 200µl do reagente diluído. Incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente, em placa de agitação (AROS 160; Thermolyne). Por fim, procedeu-se à leitura da absorvância a 595nm num espectrofotómetro SPECTROstar® Omega.

2.6.3.2. Quantificação de Proteína (Baixo Volume)

Foram retirados 2µl de cada amostra e colocados nos poços de microgotas de uma placa LVis (BMG Labtech), em duplicado. Foi realizada leitura de absorvância no espectrofotómetro SPECTROstar® Omega a 280nm.

2.7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o GraphPad Prism versão 6.00 for, GraphPad Software, La Jolla California USA. A análise foi elaborada através de One-Way ANOVA com o teste de comparação múltipla de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo $p \leq 0.05$. As diferenças estatisticamente significativas são expressas com o símbolo *, com $0.01 < p \leq 0.05$, $0.001 < p \leq 0.01$, $0.0001 < p \leq 0.001$ e $p \leq 0.0001$ a corresponder a *, **, *** e **** respectivamente.

3. Resultados do trabalho

3.1. Caracterização dos Biomateriais

3.1.1. Medição de pH

As medições de pH das soluções (Tabela I) permitiram excluir o Geogard Ultra®, uma vez que este é excessivamente ácido para incorporar o secretoma. Verificou-se inclusivamente alteração de cor do gel de vermelho para amarelo, devido ao indicador de pH (*Fenol Red*) presente no meio. Nos restantes compostos verificou-se um aumento ligeiro do pH comparativamente ao controlo (A+M).

Tabela I: Valores de pH dos conservantes.

Alginato (UV) 1.5% + Meio (A+M)	7,40
Hidroximetilglicinato de sódio + (A+M)	9,23
Cetrimida + (A+M)	8,97
Geogard Ultra® + (A+M)	4,70
Nipagin™/Nipazol® + (A+M)	9,04
Clorhexidina + (A+M)	9,04
Cloreto Benzalcônio + (A+M)	8,90

3.1.2. Medição de Viscosidade (Reologia)

3.1.2.1. Influência do Método de Esterilização na Viscosidade do Alginato

Verificou-se que, após esterilização por calor húmido (autoclave), a viscosidade diminuiu de forma acentuada em comparação com o controlo. Por sua vez, aquando da utilização da radiação ultravioleta, a viscosidade manteve-se semelhante ao grupo controlo, tendo-se optado por esta alternativa no nosso ensaio (Figura III). Foi necessário testar este tipo de métodos de esterilização, uma vez que ainda não foi possível incorporar a impressora 3D dentro de uma câmara de fluxo, sendo esse um dos objetivos futuros.

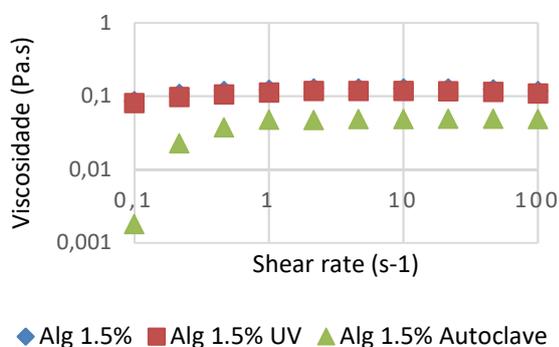


Figura III: Influência da esterilização na viscosidade do Alginato a 1.5%.

3.1.2.2. Influência do Meio de Cultura na Viscosidade do Alginato

Na presença de meio a viscosidade aumenta de forma significativa, sendo este aumento maior no início da medição e tornando-se menos acentuado ao longo do tempo (Figura IV).

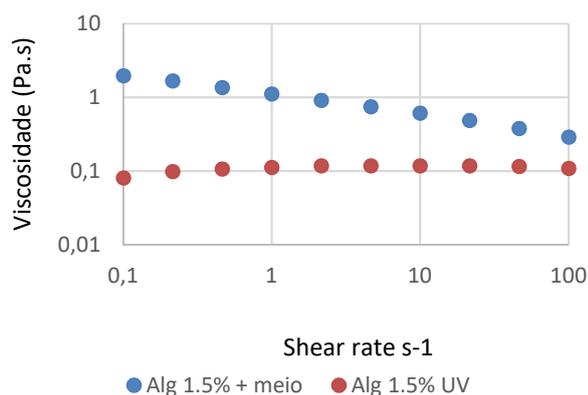


Figura IV: Influência da incorporação de meio na viscosidade do Alginato a 1.5% (UV).

3.1.2.3. Influência dos Conservantes na Viscosidade do Alginato

Os conservantes com valores de viscosidade mais próximos do controlo são a Cetrimida, o Cloreto Benzalcónio e o Nipagin™/Nipazol® (Figura V).

A medição mais discrepante corresponde ao Geogard Ultra®, corroborando a exclusão deste conservante no ensaio de medição de pH.

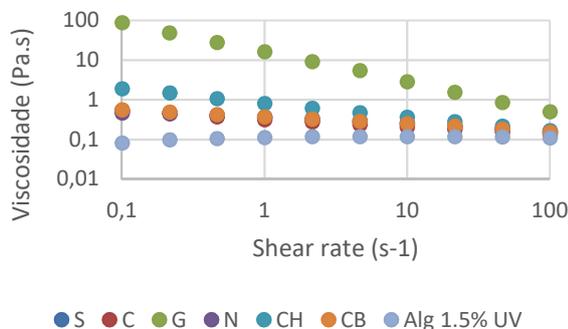


Figura V: Influência dos conservantes na viscosidade do Alginato a 1.5% (UV).

3.2. Ensaio *In Vitro*

3.2.1. Ensaio de Viabilidade, Senescência e Citocompatibilidade

3.2.1.1. Viabilidade Celular – PrestoBlue™

Relativamente às UC-MSCs verifica-se um aumento da viabilidade celular ao longo dos *timepoints*, dentro de cada grupo, exceto no grupo controlo negativo. Comparando o controlo positivo com o hUCBP a 15% é possível concluir que a viabilidade celular no tempo 96h é

superior de forma estatisticamente significativa no grupo controlo positivo, no entanto ao tempo 144h ambos apresentam uma excelente viabilidade (Figura VI a)).

Não foi possível retirar conclusões acerca do grupo suplementado com hUCBP a 10%, uma vez que ocorreu a formação de um coágulo, cuja origem pode ter sido uma falha durante o processo de inativação do plasma.

No caso dos L929 verifica-se uma diferença estatisticamente significativa em todos os grupos, sendo possível concluir que o grupo controlo positivo é sempre aquele cujo suplemento garante maior viabilidade celular. Por sua vez, quando comparamos os grupos teste (hUCBP), verificamos que perante uma concentração maior (15%), a viabilidade diminui de forma muito significativa comparativamente ao hUCBP 10% para tempos maiores (Figura VI b).

Em anexo (Anexo IV) encontra-se um esquema representativo da morfologia dos 2 tipos celulares ao longo do ensaio, no qual é possível verificar que não existem diferenças morfológicas significativas entre grupos.

As tabelas representativas da significância estatística referentes à figura VI, encontram-se em anexo (V e VI).

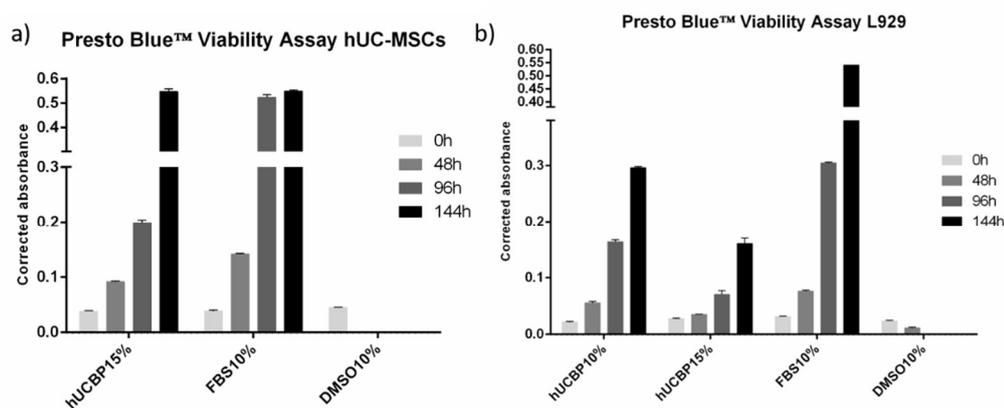


Figura VI: Ensaio de viabilidade celular pelo método PrestoBlue™ em hUC-MSCs e L929.

3.2.1.2. Citocompatibilidade – TrypanBlue Exclusion Assay

No caso das UC-MSCs verifica-se que na presença do controlo positivo o número de células totais é significativamente superior ao grupo teste, sobretudo em tempos mais avançados (96h e 144h), corroborando o ensaio anterior no que diz respeito à viabilidade celular.

Como explicado, não foi possível concluir nada relativamente ao grupo teste com hUCBP a 10% (Figura VII a)).

Em relação aos L929 verificamos que o controlo positivo apresenta um número total de células muito superior ao verificado nos grupos teste, a partir do tempo 96h, não se verificando

no início do ensaio. Entre os grupos teste não se verifica uma diferença significativa às 96h e 144h (Figura VII b)).

Os resultados obtidos neste ensaio corroboram os obtidos anteriormente.

As tabelas representativas da significância estatística referentes à Figura VII, encontram-se em anexo (VII e VIII).

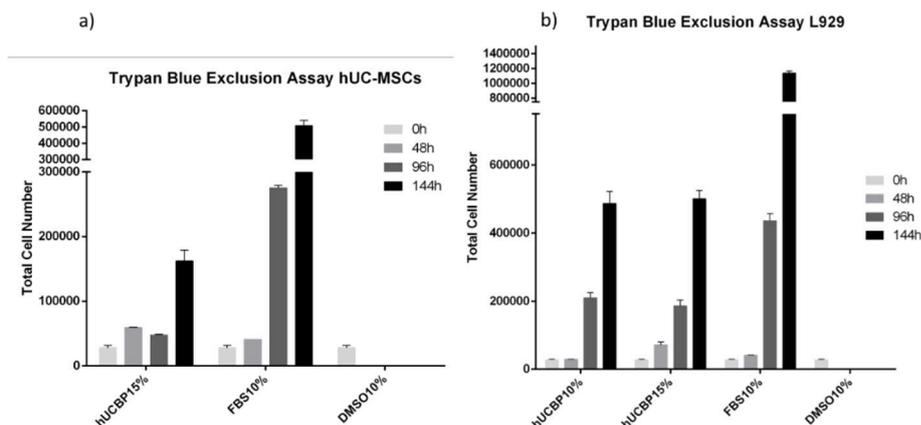


Figura VII: Trypan Blue Exclusion Assay em UC-MSCs e L929.

3.2.1.3. Senescência

Verifica-se que o nível de senescência nas UC-MSCs não difere estatisticamente de forma significativa entre o grupo teste e o controlo positivo.

Nos L929 verifica-se uma maior senescência no controlo positivo em todos os tempos em comparação com o grupo teste, com elevada significância estatística (Figura VIII b)).

As tabelas representativas da significância estatística referentes à Figura VIII, encontram-se em anexo (IX e X).

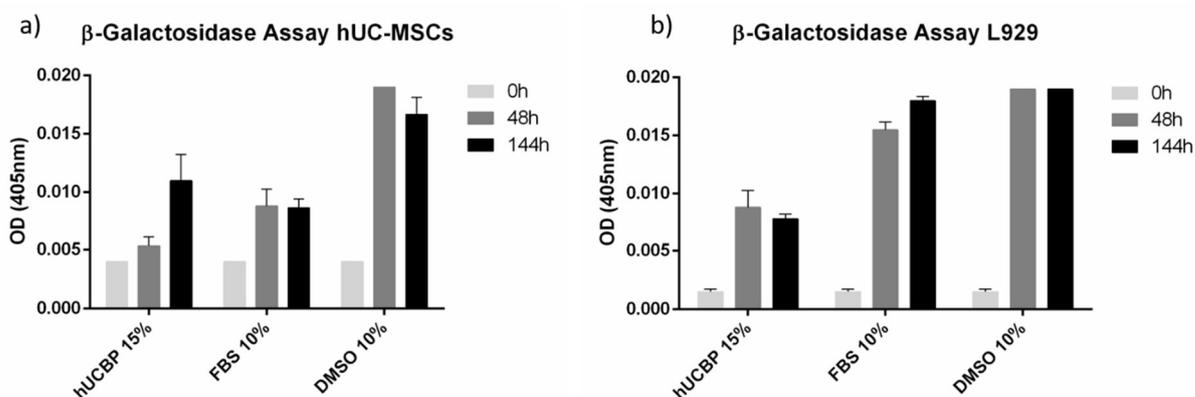


Figura VIII: Ensaio de senescência pela beta-Galactosidase em UC-MSCs e L929.

3.2.1.4. Citocompatibilidade dos Conservantes

Os resultados obtidos nos 3 ensaios de citotoxicidade dos conservantes foram compilados e encontram-se na Figura IX.

A viabilidade foi calculada através da média das absorvâncias dos compostos testados dividida pela média dos controlos positivos, multiplicando-se este resultado por 100.

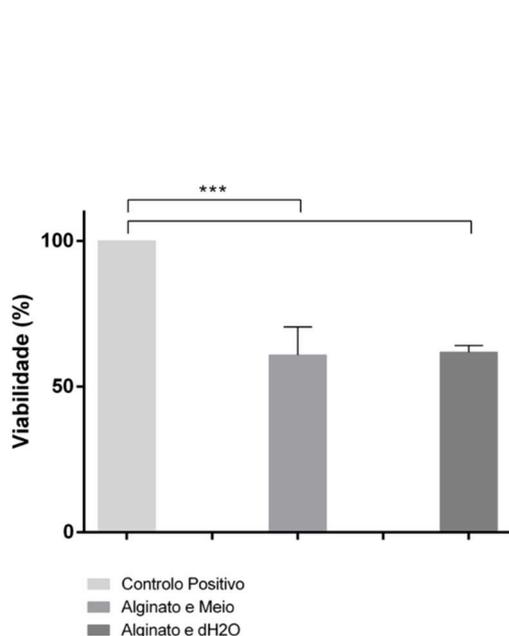
Na Figura IX (1.1) verifica-se que não há diferença significativa entre a citotoxicidade do alginato com dH₂O e do alginato com α-MEM, apesar de ambos apresentarem um decréscimo estatisticamente significativo de viabilidade quando comparados com o controlo positivo.

Na Figura IX (1.2) conclui-se que o conservante a selecionar é o Nipagin™/Nipazol®, uma vez que é o que apresenta maior viabilidade (aproximadamente 50%), refletindo ainda assim um decréscimo de cerca de 20% de viabilidade quando comparado com o alginato com α-MEM.

A tabela representativa da significância estatística referente à Figura IX (1.2), encontra-se em anexo (XI).

Ensaio de Citotoxicidade

1.1



1.2

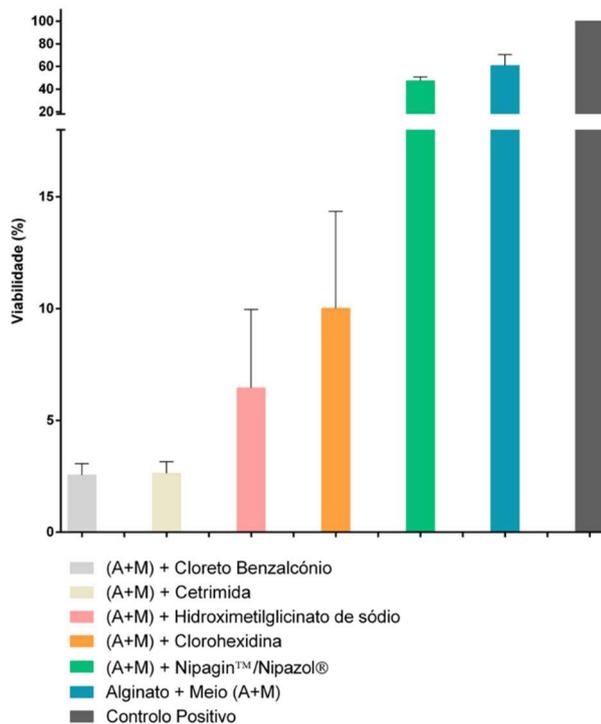


Figura IX: Ensaio de citotoxicidade entre Alginatos (1.1) e dos Conservantes (1.2).

3.2.1.5. Citocompatibilidade dos Patches com Meio de Cultura

Não foi possível realizar análise estatística, dado que só foram realizadas duas medições.

Não se verificou decréscimo de viabilidade entre os *patches* com α -MEM e os com dH₂O.

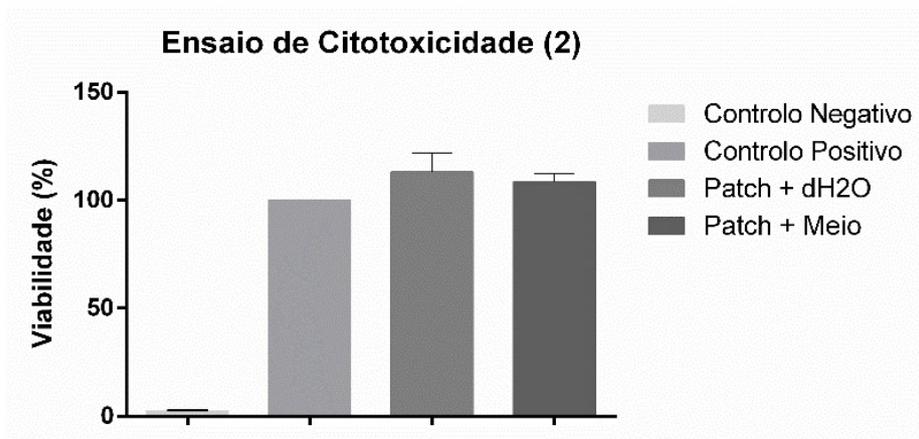


Figura X: Ensaio de citotoxicidade dos *Patches*.

3.2.2. Quantificação de Proteína

O valor médio de proteína total dos *pellets* obtido foi de 15554 mg e o valor de proteína do secretoma foi 744 mg/ml.

Relativamente à quantificação da proteína libertada pelo *patch* contendo secretoma 10x concentrado nenhum dos resultados permitiu retirar conclusões.

Assim sendo, procedemos com as células de Franz, utilizando secretoma 100x concentrado, no entanto os resultados não permitiram, uma vez mais, retirar conclusões.

4. Ensaio Futuros

4.1. Ensaio de Biocompatibilidade no modelo rato

Para determinar a biocompatibilidade do hidrogel com secretoma e conservante será realizada a sua implantação subcutânea em ratos (*Sprague Dawley*) numa bolsa criada por incisão cutânea, ao longo de 3, 7, 15 e 30 dias. O objetivo é verificar a ocorrência local de inflamação, fibrose, reação de corpo estranho ou regeneração.

O grupo de controlo será composto por animais nos quais não será implantado qualquer biomaterial, recebendo apenas a incisão cutânea.

No final deste ensaio, os animais serão eutanasiados, com recurso a anestesia e injeção intracardíaca de pentobarbital sódico 5%.

Por fim, as amostras de tecido cutâneo e subcutâneo do dorso dos animais serão recolhidas e fixadas em paraformaldeído tamponado 4% (Panreac®), seguindo-se a respetiva necrópsia e recolha de órgãos para determinar a ocorrência de efeitos inflamatórios sistémicos.

As amostras serão avaliadas histopatologicamente por veterinários experientes, de acordo com a norma ISO 10993-6:2016: “Avaliação Biológica de dispositivos médicos”.

Após a avaliação e eventual comprovação da biocompatibilidade, avançar-se-á para a avaliação terapêutica dos *patches* em modelo de rato.

4.2. Ensaio *In Vivo* no modelo rato

O objetivo futuro será avaliar a ação do *patch* contendo secretoma em comparação com o controlo, na regeneração de feridas na derme e epiderme de ratos psoróticos.

A psoríase poderá ser induzida através da aplicação tópica de um agente capaz de induzir lesões idênticas a esta doença [79].

Todos os ensaios envolvendo experimentação animal cumprirão as recomendações da ISO 10993-6:2016 “Avaliação Biológica de dispositivos médicos”, da Diretiva Europeia 2010/63/EU, de 22 de Setembro, e ao abrigo do Decreto-Lei 113/2013, de 7 de Agosto e o protocolo será previamente aprovado pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) e pela Comissão de Ética da Universidade do Porto – Organismo Responsável pelo Bem-estar Animal (ORBEA) do ICBAS-UP.

Será também aplicada a regra dos 3R's, que refere que em experimentação animal deve ser tida em consideração que não existe nenhuma outra alternativa viável para além da utilização de animais sendo sempre que possível substituídos por técnicas alternativas (*Replace*); e que o número de animais utilizados é reduzido ao mínimo (*Reduce*) e com o menor sofrimento possível (*Refine*).

5. Discussão e Conclusões

Este trabalho de conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado em diversos locais, nomeadamente, a Biosskin, Molecular and Cell Therapies S.A, o Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Nestes locais foi possível integrar laboratórios GMP, elaborar biomateriais e aprender as bases da cultura de células estaminais mesenquimatosas.

Foram realizados ensaios para determinar se a suplementação com hUCBP (a 10% e 15%) é uma boa alternativa para substituir o FBS 10% nos protocolos de cultura celular.

No ensaio de viabilidade celular pelo método do PrestoBlue™ concluiu-se que nas UC-MSCs ambos os grupos apresentam elevada viabilidade ao *timepoint* 144h. Por sua vez, considerando a população celular L929 verifica-se que o grupo com maior viabilidade é o grupo controlo positivo, o que seria expectável dado este ser o standard nestas culturas celulares. Entre os grupos teste verificou-se ainda que o grupo com maior concentração é o que apresenta menor viabilidade.

Relativamente ao TrypanBlue Exclusion Assay verificou-se que tanto as UC-MSCs como os L929 apresentam maior número de células totais no grupo controlo positivo, em todos os *timepoints*, o que faz sentido tendo em conta que este é o standard.

Por fim, verificou-se que as UC-MSCs apresentam maior senescência no grupo teste suplementado com 15% de hUCBP. Os L929 apresentam uma senescência estatisticamente superior no grupo controlo positivo ao longo de todo o ensaio, comparativamente ao grupo teste, indicando que a suplementação com hUCBP pode diminuir ou atrasar as alterações celulares associadas ao fenómeno de senescência.

Em vários ensaios não foi possível tirar conclusões relativamente ao grupo teste suplementado com hUCBP a 10% devido à ocorrência de coagulação, que poderá ser devida a uma inativação inadequada do plasma aquando do seu processamento e preparação para o ensaio.

Ao longo deste trabalho foi ainda produzido secretoma proveniente de UC-MSCs, que foi incorporado em dois tipos de biomateriais (gel e *patch*), para posterior caracterização.

Relativamente à influência do método de esterilização na viscosidade do alginato, foi selecionado o método de radiação UV. Por sua vez, na influência da incorporação de meio na viscosidade do alginato, concluiu-se que esta aumentou significativamente.

Procedeu-se à escolha de um conservante, para incorporar no *patch*, através da medição de pH, viscosidade e ensaios de citotoxicidade (MTT), tendo-se culminado na escolha do Nipagin™/Nipazol®, sendo um resultado expectável devido à frequente utilização desta combinação em aplicações tópicas.

Nos *patches* foi incorporado o secretoma e realizado novo MTT, que revelou ausência de alterações de viabilidade comparativamente ao controlo.

Foram realizados ensaios de libertação e quantificação de proteína libertada, assim como dos *pellets* e do CM2D. No entanto, os ensaios de libertação não permitiram chegar a conclusões válidas, sendo necessário repensar numa forma de obter resultados de libertação no futuro.

Este trabalho permitiu otimizar o protocolo de produção de *patches* com secretoma e o protocolo *xeno-free in vitro*, sendo os resultados obtidos bastante promissores.

Futuramente, o objetivo será avaliar a ação do *patch* contendo secretoma na regeneração de feridas na derme e epiderme de ratos psoróticos, sendo os passos seguintes passar para os

ensaios *in vivo*, tanto de biocompatibilidade como modelo de lesão, uma vez que os ensaios de citocompatibilidade dos *patches* ainda estão a decorrer, e só após a sua validação será indicado proceder com os ensaios *in vivo*.

6. Bibliografia

1. Owczarczyk-Saczonek, A., et al., *Stem Cells as Potential Candidates for Psoriasis Cell-Replacement Therapy*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(10).
2. Brembilla, N.C., L. Senra, and W.-H. Boehncke, *The IL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: IL-17A and Beyond*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 1682-1682.
3. Liu, R.F., et al., *Research Note Mesenchymal stem cells from skin lesions of psoriasis patients promote proliferation and inhibit apoptosis of HaCaT cells*. Genet Mol Res, 2015. **14**(4): p. 17758-17767.
4. Orciani, M., et al., *The mesenchymal stem cell profile in psoriasis*. British Journal of Dermatology, 2011. **165**(3): p. 585-592.
5. Hou, R., et al., *Stem cells in psoriasis*. Journal of Dermatological Science, 2017. **86**(3): p. 181-186.
6. Lynde, C.W., et al., *Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2014. **71**(1): p. 141-150.
7. Lee, Y.S., et al., *Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorate psoriasis-like skin inflammation in mice*. Biochemistry and Biophysics Reports, 2017. **9**: p. 281-288.
8. Devireddy, L.R., et al., *Questions and Challenges in the Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Based Therapies in Veterinary Medicine*. Tissue Eng Part B Rev, 2017. **23**(5): p. 462-470.
9. Kim, J.H., et al., *Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue*. Stem Cells Int, 2018. **2018**.
10. Tessier, L., et al., *Phenotypic and immunomodulatory properties of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells*. PLoS One, 2015. **10**(4).
11. Caseiro, A.R., et al., *Human umbilical cord blood plasma as an alternative to animal sera for mesenchymal stromal cells in vitro expansion – A multicomponent metabolomic analysis*. PLOS ONE, 2018. **13**(10).
12. Vizoso, F.J., et al., *Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(9).
13. Makridakis, M., M.G. Roubelakis, and A. Vlahou, *Stem cells: Insights into the secretome*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2013. **1834**(11): p. 2380-2384.
14. Mauricio, A.C., et al., *Cellular systems and biomaterials for nerve regeneration in neurotmesis injuries*, in *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. 2011, IntechOpen.
15. Yoo, K.H., et al., *Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues*. Cell Immunol, 2009. **259**(2): p. 150-156.
16. Ding, D.-C., et al., *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy*. Cell Transplantation, 2015. **24**(3): p. 339-347.
17. Kupcova Skalnikova, H., *Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome*. Biochimie, 2013. **95**(12): p. 2196-2211.

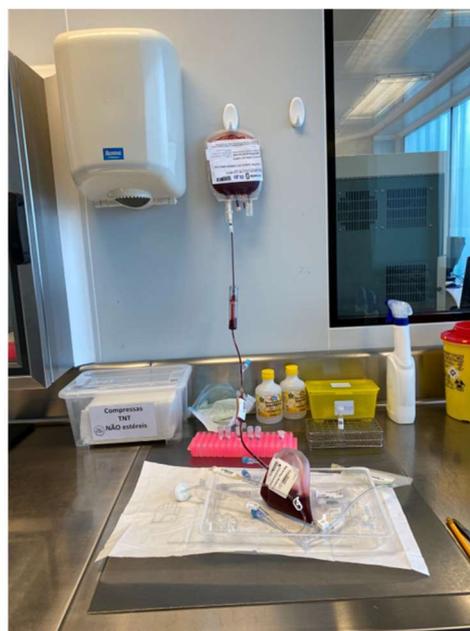
18. Mattar, P. and K. Bieback, *Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 560.
19. Pereira, T., et al., *MSCs Conditioned Media and Umbilical Cord Blood Plasma Metabolomics and Composition*. PLOS ONE, 2014. **9**(11).
20. Shin, T.-H., et al., *Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(2).
21. Miranda, J.P., et al., *The Secretome Derived From 3D-Cultured Umbilical Cord Tissue MSCs Counteracts Manifestations Typifying Rheumatoid Arthritis*. Frontiers in immunology, 2019. **10**.
22. M. Carvalho, M., et al., *Mesenchymal Stem Cells in the Umbilical Cord: Phenotypic Characterization, Secretome and Applications in Central Nervous System Regenerative Medicine*. Current Stem Cell Research & Therapy, 2011. **6**(3): p. 221-228.
23. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
24. Caseiro, A.R., et al., *Neuromuscular Regeneration: Perspective on the Application of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretion Products*. Stem Cells International, 2016. **2016**: p. 16.
25. Teixeira, F. and A. Salgado, *Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges*. Neural Regeneration Research, 2020. **15**(1): p. 75-77.
26. Teixeira, F.G., et al., *Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration?* Cellular and Molecular Life Sciences, 2013. **70**(20): p. 3871-3882.
27. Pereira, T., et al., *Promoting Nerve Regeneration in a Neurotmesis Rat Model Using Poly(DL-lactide--caprolactone) Membranes and Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly: In Vitro and In Vivo Analysis*. BioMed Research International, 2014.
28. Gärtner, A., et al., *Use of poly(DL-lactide-ε-caprolactone) membranes and mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the umbilical cord for promoting nerve regeneration in axonotmesis: In vitro and in vivo analysis*. Differentiation, 2012. **84**(5): p. 355-365.
29. Caseiro, A.R., et al., *Neuro-muscular Regeneration Using Scaffolds with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Isolated from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly: Functional and Morphological Analysis Using Rat Sciatic Nerve Neurotmesis Injury Model*. Procedia Engineering, 2015. **110**: p. 106-113.
30. Ribeiro, J., et al., *Cell therapy with human MSCs isolated from the umbilical cord Wharton jelly associated to a PVA membrane in the treatment of chronic skin wounds*. International journal of medical sciences, 2014. **11**(10): p. 979-987.
31. Patel, S.A., et al., *Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications*. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2008. **56**(1): p. 1-8.
32. Armson, B.A., D.S. Allan, and R.F. Casper, *Umbilical Cord Blood: Counselling, Collection, and Banking*. J Obstet Gynaecol Can, 2015. **37**(9): p. 832-844.
33. Thonemann, B., et al., *Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components*. Dental Materials, 2002. **18**(4): p. 318-323.
34. Tekkate, C., et al., *"Humanized" Stem Cell Culture Techniques: The Animal Serum Controversy*. Stem Cells International, 2011: p. 1-14.
35. Van Pham, P., et al., *Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications*. Cell Tissue Bank, 2016. **17**(2): p. 289-302.
36. Brown, K.S., M.S. Rao, and H.L. Brown, *The Future State of Newborn Stem Cell Banking*. Journal of clinical medicine, 2019. **8**(1).
37. Di Tullio, I., et al., *Factors associated with blood cord unit bankability: an analysis of a 15-year-long case series*. Cell and Tissue Banking, 2019.

38. Schwandt, S., et al., *Cord blood collection and processing with hydroxyethyl starch or non-hydroxyethyl starch*. *Cytotherapy*, 2016. **18**(5): p. 642-52.
39. Souri, M., et al., *Comparison of human umbilical cord blood processing with or without hydroxyethyl starch*. *Transfusion*, 2017. **57**(11): p. 2758-2766.
40. Kim, K.M., et al., *Quality comparison of umbilical cord blood cryopreserved with conventional versus automated systems*. *Cryobiology*, 2017. **78**: p. 65-69.
41. Dessels, C., M. Alessandrini, and M.S. Pepper, *Factors Influencing the Umbilical Cord Blood Stem Cell Industry: An Evolving Treatment Landscape*. *Stem Cells Transl Med*, 2018. **7**(9): p. 643-650.
42. Raffo, D., et al., *Evaluation of DMSO dextrose as a suitable alternative for DMSO dextran in cord blood cryopreservation*. *Vox Sang*, 2019. **114**(3): p. 283-289.
43. Ballen, K.K., E. Gluckman, and H.E. Broxmeyer, *Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond*. *Blood*, 2013. **122**(4): p. 491-498.
44. Santos, J.M., et al., *Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015. **6**(1).
45. Andersen, T., P. Auk-Emblem, and M. Dornish, *3D Cell Culture in Alginate Hydrogels*. *Microarrays (Basel, Switzerland)*, 2015. **4**(2): p. 133-161.
46. Miranda, J.P., et al., *The Human Umbilical Cord Tissue-Derived MSC Population UCX® Promotes Early Motogenic Effects on Keratinocytes and Fibroblasts and G-CSF-Mediated Mobilization of BM-MSCs when Transplanted In Vivo*. *Cell Transplantation*, 2015. **24**(5): p. 865-877.
47. Walter, M.N.M., et al., *Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays*. *Experimental Cell Research*, 2010. **316**(7): p. 1271-1281.
48. Chen, L., et al., *Conditioned Medium from Hypoxic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Wound Healing in Mice*. *PLOS ONE*, 2014. **9**(4).
49. Kim, J.Y., et al., *Human Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells and Their Conditioned Media Exhibit Therapeutic Equivalence for Diabetic Wound Healing*. *Cell Transplantation*, 2010. **19**(12): p. 1635-1644.
50. Jayaraman, P., et al., *Stem cells conditioned medium: a new approach to skin wound healing management*. *Cell Biology International*, 2013. **37**(10): p. 1122-1128.
51. Caseiro, A.R., et al., *Mesenchymal Stem Cells and Biomaterials Systems – Perspectives for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration*. *Procedia Engineering*, 2015. **110**: p. 90-97.
52. Ribeiro, J., et al., *Evaluation of biodegradable electric conductive tube-guides and mesenchymal stem cells*. *World journal of stem cells*, 2015. **7**(6): p. 956-975.
53. Pereira, T., et al., *Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Whartons Jelly of the Umbilical Cord and Conditioned Media on Skeletal Muscle Regeneration Using a Myectomy Model*. *Stem Cells International*, 2014.
54. Liu, Q., et al., *Preparation and Properties of 3D Printed Alginate–Chitosan Polyion Complex Hydrogels for Tissue Engineering*. *Polymers*, 2018. **10**(6): p. 664.
55. Augst, A.D., H.J. Kong, and D.J. Mooney, *Alginate Hydrogels as Biomaterials*. *Macromolecular Bioscience*, 2006. **6**(8): p. 623-633.
56. Liberski, A.R., *Three-dimensional printing of alginate: From seaweeds to heart valve scaffolds*. *QScience Connect*, 2016. **2016**(2).
57. Moshaverinia, A., et al., *Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stem cells: an in vitro study*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012. **23**(12): p. 3041-3051.
58. Davidson, P.M., T.M. Taylor, and S.E. Schmidt, *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*, in *Food microbiology*. 2013, American Society of Microbiology. p. 765-801.
59. Tasnim, N., et al., *3D Bioprinting Stem Cell Derived Tissues*. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2018. **11**(4): p. 219-240.

60. Gaska, R., M. Shur, and Y. Bilenko, *Ultraviolet radiation sterilization*. 2009, Google Patents.
61. Dai, Z., et al., *Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications*. *Journal of Tissue Engineering*, 2016. **7**: p. 2041731416648810.
62. Plotino, G., et al., *Experimental Evaluation on the Influence of Autoclave Sterilization on the Cyclic Fatigue of New Nickel-Titanium Rotary Instruments*. *Journal of Endodontics*, 2012. **38**(2): p. 222-225.
63. O'Brien, E.P., B.R. Brooks, and D. Thirumalai, *Effects of pH on proteins: predictions for ensemble and single-molecule pulling experiments*. *Journal of the American Chemical Society*, 2012. **134**(2): p. 979-987.
64. Bonino, C.A., et al., *Real-time in situ rheology of alginate hydrogel photocrosslinking*. *Soft Matter*, 2011. **7**(24): p. 11510-11517.
65. van Meerloo, J., G.J.L. Kaspers, and J. Cloos, *Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay*, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, I.A. Cree, Editor. 2011, Humana Press: Totowa, NJ. p. 237-245.
66. Scientific, T. *MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)* 13/12/2019]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M6494#/M6494>.
67. Sonnaert, M., et al., *Quantitative Validation of the Presto Blue™ Metabolic Assay for Online Monitoring of Cell Proliferation in a 3D Perfusion Bioreactor System*. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2014. **21**(6): p. 519-529.
68. Scientific, T. *PrestoBlue™ Cell Viability Reagent*. 13/12/2019]; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018370-PrestoBlueCellViabilityReagent-PI.pdf>.
69. Scientific, T. *PrestoBlue® Cell Viability Reagent Frequently Asked Questions*. 13/12/2019]; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>.
70. Scientific, T. *Trypan Blue Stain (0.4%) for use with the Countess™ Automated Cell Counter* 24/01/2020]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T10282?SID=srch-srp-T10282#/T10282?SID=srch-srp-T10282>.
71. Itahana, K., J. Campisi, and G.P. Dimri, *Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay*. *Methods Mol Biol*, 2007. **371**: p. 21-31.
72. Ng, S.-F., et al., *Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies*. *AAPS PharmSciTech*, 2010. **11**(3): p. 1432-1441.
73. Ng, S.-F., et al., *A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells*. *Pharmaceutics*, 2010. **2**(2): p. 209-223.
74. Salamanca, H.C., et al., *Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(3).
75. Ku, H.-K., et al., *Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models*. *Analytical Biochemistry*, 2013. **434**(1): p. 178-180.
76. Kruger, N.J., *The Bradford Method For Protein Quantitation*, in *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 17-24.
77. Sarfaraj Topia, A.T. *Low-volume protein measurements (280nm): validating the LVis Plate over many concentrations*. 07/2013; Available from: <https://www.bmglabtech.com/pt/low-volume-protein-measurements-280nm-validating-the-lvis-plate-over-many-concentrations/>.
78. LABTECH, B. *Placa LVis - Medições de baixo volume*. Available from: <https://www.bmglabtech.com/pt/placa-lvis/>.

79. Sah, S.K., et al., *Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Transduced with Superoxide Dismutase on Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2015. **24**(5): p. 233-248.

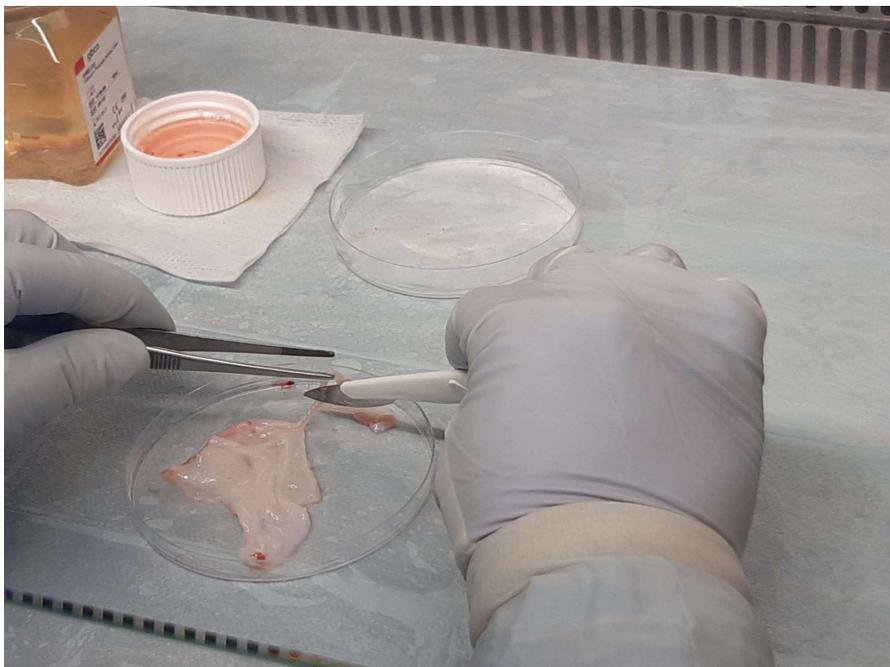
7. Anexos



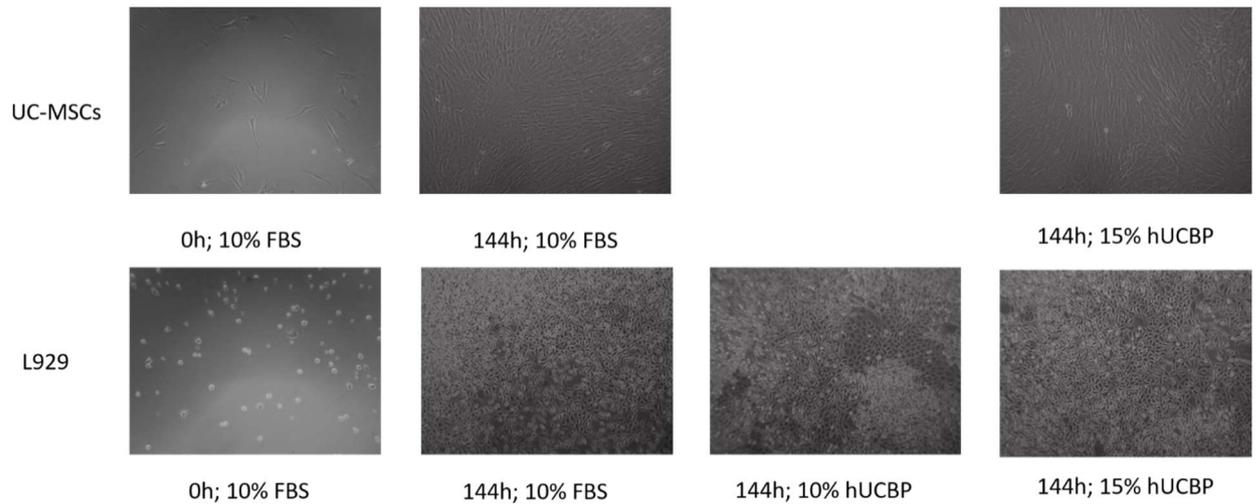
Anexo I: Imagem relativa ao kit de processamento do sangue do cordão umbilical.



Anexo II: Sangue do cordão umbilical após separação dos seus constituintes.



Anexo III: Processamento do tecido do cordão umbilical – Remoção dos vasos.



Anexo IV: Morfologia das UC-MSCs e L929 durante o ensaio de viabilidade celular.

	48h			96h			144h		
	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%
hUCBP 15%		****	****		****	****		****	****
FBS 10%			****			****			ns
DMSO 10%									

Anexo V: Significância estatística referente aos resultados do ensaio de viabilidade celular pelo método do PrestoBlue™ em UC-MSCs.

	48h				96h				144h			
	hUCBP 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%
hUCBP 10%		****	****	****		****	****	****		****	****	****
hUCBP 15%			****	****			****	***			****	****
FBS 10%				****				****				****
DMSO 10%												

Anexo VI: Significância estatística referente aos resultados do ensaio de viabilidade celular pelo método do PrestoBlue™ em L929.

	48h			96h			144h		
	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%
hUCBP 15%		****	****		****	****		****	
FBS 10%			****			****			****
DMSO 10%									

Anexo VII: Significância estatística referente aos resultados do TrypanBlue Exclusion Assay em UC-MSCs.

	48h				96h				144h			
	hUCBP 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%
hUCBP 10%		***	ns	**		ns	****	****		ns	****	****
hUCBP 15%			**	****			****	***			****	****
FBS 10%				***				****				****
DMSO 10%												

Anexo VIII: Significância estatística referente aos resultados do TrypanBlue Exclusion Assay em L929.

	0h			48h			144h		
	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%
hUCBP 15%		ns	ns		*	****		ns	ns
FBS 10%			ns			****			**
DMSO 10%									

Anexo IX: Significância estatística referente aos resultados do ensaio de senescência pela β -Galactosidase em UC-MSCs.

	0h			48h			144h		
	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%	hUCBP 15%	FBS 10%	DMSO 10%
hUCBP 15%		ns	ns		***	****		****	****
FBS 10%			ns			*			ns
DMSO 10%									

Anexo X: Significância estatística referente aos resultados do ensaio de senescência pela β -Galactosidase em L929.

	(A+M) + Hidroximetilglicinato de sódio	(A+M) + Cetrimida	(A+M) + Nipagin™/Nipazol®	(A+M) + Clorohexidina	(A+M) + Cloreto Benzalcônio	Alginato + Meio (A+M)	Controlo Positivo
(A+M) + Hidroximetilglicinato de sódio		ns	****	ns	ns	****	****
(A+M) + Cetrimida			****	ns	ns	****	****
(A+M) + Nipagin™/Nipazol®				****	****	*	****
(A+M) + Clorohexidina					ns	****	****
(A+M) + Cloreto Benzalcônio						****	****
Alginato + Meio (A+M)							****
Controlo Positivo							****

Anexo XI: Significância estatística referente aos resultados do ensaio de citotoxicidade dos conservantes.