



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

ANGÉLICA FERNANDES GURGEL DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DO POTENCIAL
OSTEOGÊNICO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE
ALGAS MARINHAS**

**NATAL
2017**

ANGÉLICA FERNANDES GURGEL DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DO POTENCIAL
OSTEOGÊNICO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE
ALGAS MARINHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Susana Margarida Gomes Moreira.

**NATAL
2017**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências – CB

Sousa, Angélica Fernandes Gurgel de.

Avaliação da genotoxicidade e do potencial osteogênico de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas / Angélica Fernandes Gurgel de Sousa. - Natal, 2017.

92 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Susana Margarida Gomes Moreira.

1. Células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton -
Dissertação. 2. Medicina regenerativa - Dissertação. 3.
Macroalgas marinhas - Dissertação. 4. Fucus vesiculosus -
Dissertação. 5. Caulerpa sertularioides - Dissertação. I.
Moreira, Susana Margarida Gomes. II. Universidade Federal do Rio
Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 602.9


ANGÉLICA FERNANDES GURGEL DE SOUSA

Avaliação da genotoxicidade e do potencial osteogênico de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 26/05/2017.

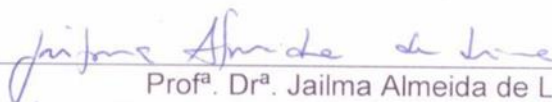
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Susana Margarida Gomes Moreira
Orientadora/Presidente - UFRN



Prof^a. Dr^a. Tirzah Braz Petta Lajus
Examinadora Interna ao Programa - UFRN



Prof^a. Dr^a. Jailma Almeida de Lima
Examinadora Externa à Instituição - CRI

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento pelo suporte financeiro concedido para que a pesquisa fosse desenvolvida com qualidade.

Aos meus pais Ângela Fernandes Gurgel de Sousa e Francisco Eurivanilson de Sousa Silva pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos e esforços para que eu tivesse uma boa educação. Pela liberdade que me concederam de escolher meu próprio destino. Pelo apoio incondicional. Por serem meu lugar seguro em qualquer ocasião. Anseio por poder retribuir, ao menos em parte, tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos meus sobrinhos Augusto Diogo e Luiz Augusto por todo amor e fofura compartilhados. Um agradecimento especial a Luiz por todas as vezes que ele pegou seu notebook de brinquedo e me fez companhia durante as longas horas de escrita.

A minha tia Margarida Fernandes Gurgel por ter iluminado meu caminho enquanto compartilhou esse plano terrestre comigo e por continuar sendo um exemplo a ser seguido.

A minha orientadora Susana Margarida Gomes Moreira pela paciência, pelos ensinamentos, pela troca de experiências e por ter construído junto comigo cada parte deste trabalho. Sou grata pela confiança depositada em mim, pela seriedade com que trabalha e por não ter poupado esforços para garantir a realização de um ótimo trabalho.

Aos professores da pós graduação em Bioquímica pelos conhecimentos compartilhados e construídos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

A todos que fazem parte da equipe do laboratório de Mutagênese Ambiental (LAMA) e Laboratório de Biologia Celular e Genômica (LBMG) pelo companheirismo, troca de conhecimentos e pelas conversas aleatórias que também são importantes para a formação pessoal. Um agradecimento especial para a técnica (Super) Mayara Madja Fernandes Medeiros Santos pela simpatia e disponibilidade em ajudar sempre, tornando o dia-a-dia no laboratório menos árduo.

A Ana Carolina Pereira Rocha e a Elder Douglas Jales por toda amizade e carinho que foram fortalecidos nesse período. Pelo empréstimo dos ouvidos às minhas lamentações, pelos conselhos, incentivos e pela companhia nos momentos de aflição.

A Fábio Miguel Santos Costa (o Portuga) pela amizade inesperada e tão rapidamente desenvolvida, pela companhia nas mais diversas, divertidas e inusitadas ocasiões em que até alguns muros tiveram que ser vencidos. Agradeço pelo auxílio na parte laboratorial e na escrita.

A Micaelly Priscila Gomes Lima pela companhia, pelo carinho, pela compreensão, pelas horas de conversas, por ser raio de sol em dias de tempestade, por ser abrigo e aventura ao mesmo tempo. Por compartilhar da mesma revolta com esse sistema adoecedor e pela luta incessante de igualdade de direitos e fim da violência contra a mulher.

Aos meus colegas de pesquisa Gildácio Chaves Filho, Nathan Andrade e Victor Moraes pelo auxílio nos experimentos, pelas ideias na escrita e pela amizade sincera.

Aos avaliadores da banca de qualificação que doaram seu tempo para analisar minha pesquisa e deram sugestões valiosas para o aprimoramento da mesma.

A minha psicoterapeuta Rafaella Brazão pelo trabalho que desenvolvemos juntas que possibilitou um amadurecimento emocional resultando em bons frutos na vida acadêmica e pessoal.

À gata Mirna Emanuela por sentir meus momentos de tristeza e vir ronronar no meu ouvido.

A todos que compartilharam uma cerveja comigo nesse período, que ouviu um lamento meu quando um experimento não funcionava ou quando batia a “síndrome da folha em branco”. Sou grata também às cervejas que bebi pois sem elas certamente eu não chegaria até aqui.

A quem não se sentiu contemplado nas frases anteriores e que contribuiu direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, mesmo que de forma singela, muito obrigada.

Agradeço à força maior regedora de todo o curso do(s) universo(s). Alguns optam por chamá-la de Deus, Ala, Zeus... Não me sinto capaz de defini-la ou nomeá-la, todavia, sinto-me verdadeiramente grata por ter me guiado até aqui.

Os agradecimentos não têm necessariamente uma ordem de prioridade e/ou importância, acredito que cada pessoa, lugar e ocasião foi de suma importância para a realização desta obra.



Quino

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

RESUMO

Os problemas relacionados com defeitos ósseos continuam a motivar a busca de terapias mais eficazes. Assim, a combinação de biomateriais, células-tronco e moléculas bioativas fazem parte das ferramentas usadas pela medicina regenerativa para alcançar esse objetivo. Diversos estudos já mostraram o potencial osteogênico dos polissacarídeos sulfatados (PSs) extraídos de macroalgas marinhas. Entre eles, o fucoidan, isolado da alga marrom *Fucus vesiculosus*, é o mais estudado, sendo já comercializado por algumas empresas. As algas verdes também são fonte de PSs, mas estas são ainda pouco exploradas para aplicações na regeneração óssea. Em geral, as aplicações clínicas dos PSs extraídos de algas ainda são limitadas devido à escassez de estudos sobre os seus efeitos, como por exemplo, o potencial genotóxico é desconhecido na maioria dos casos. Assim, neste trabalho avaliamos a atividade osteogênica 1) do Fucoidan de *F. vesiculosus* (um extrato comercializado pela Sigma), 2) das amostras ricas em PSs obtidas do subfracionamento do fucoidan comercial, e 3) do extrato rico em PSs extraídos da alga verde *Caulerpa sertularioides* usando como modelo células-tronco humanas isoladas da geleia de Wharton de cordões umbilicais (CTMH-GW). Estudou-se também o potencial genotóxico dos extratos totais de *F. vesiculosus* e *C. sertularioides* e posteriormente, da subfração do fucoidan que apresentou maior potencial osteogênico, utilizando do ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN) na linhagem CHO-K1. Os ensaios de redução do MTT evidenciaram que as amostras ricas em PSs não apresentaram citotoxicidade significativa ao longo de 72 h, até $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os ensaios de atividade da fosfatase alcalina (ALP) e de mineralização sugerem que as amostras ricas em PSs possuem atividades osteogênicas diferentes: a subfração do fucoidan FUC 0.5 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi a que apresentou melhor resultado, aumentando 124% a atividade da ALP em relação ao controle positivo (células mantidas em meio osteogênico). Já o extrato total de *C. sertularioides* ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) aumentou 192% a atividade da ALP. Adicionalmente, todas as amostras testadas induziram o acúmulo de cálcio na matriz extracelular. Quanto à genotoxicidade, os resultados do ensaio CBMN sugerem que, nas condições testadas, estas amostras não são genotóxicas, indicando que podem ser uma alternativa para terapias de regeneração óssea.

Palavras-chaves: Células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton, medicina regenerativa, macroalgas marinhas, *Fucus vesiculosus*, *Caulerpa sertularioides*.

EVALUATION OF THE GENOTOXICITY AND OSTEOGENIC POTENTIAL OF SEAWEED SULFATED POLYSACCHARIDES

ABSTRACT

Problems related with bone defects continue to motivate the search for more effective therapies. Thus, the combination of biomaterials, stem cells and bioactive molecules is part of the tools used by regenerative medicine to achieve this goal. Several studies have already shown the osteogenic potential of sulfated polysaccharides (SPs) extracted from marine macroalgae. Among them, fucoidan, isolated from brown algae *Fucus vesiculosus*, is the most studied, and is already commercialized by some companies. Green algae are also a source of SPs, but these are even more unexploited in the scope of bone regeneration. In general, the clinical applications of SPs from algae are very limited, because studies on their effects are scarce, for example, their genotoxic effects are unknown in most cases. Thus, in this work, we evaluated the osteogenic activity of Fucoidan from *F. vesiculosus* (an extract commercialized by Sigma), 2) SPs-rich samples obtained from subfractionation of commercial fucoidan, and 3) SPs-enriched extract from green algae *Caulerpa Sertularioides*, using human mesenchymal stem cells isolated from the Wharton jelly of umbilical cords (CTMH-GW) as cell model. It was also studied the genotoxic potential of the total extracts of *F. vesiculosus* and *C. sertularioides*, using the cytokinesis block micronucleus assay (CBMN) in the line CHO-K1. The genotoxicity of fucoidan's subfraction that presented greater osteogenic potential was also evaluated. The MTT reduction assays showed that SPs-enriched samples did not show significant cytotoxicity over 72 h, up to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Alkaline phosphatase (ALP) activity and mineralization assays suggest that SPs-enriched samples have different osteogenic activities: fucoidan subfraction FUC 0.5 (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) showed the best result, increasing 124% the ALP activity in relation to the positive control (cells maintained in osteogenic medium). The total extract of *C. sertularioides* (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) increased the ALP activity by 192%. In addition, all samples tested induced calcium accumulation in the extracellular matrix. Concerning to genotoxicity, CBMN assay results suggest that, under the tested conditions, these samples are not genotoxic, indicating their potential as alternative bone regeneration therapy.

Key-words: Wharton jelly mesenchymal stem cells, Regenerative medicine, marine macroalgae, *Fucus vesiculosus*, *Caulerpa sertularioides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos tipos de células-tronco.	18
Figura 2. Esquema representativo dos mecanismos sugeridos para o efeito benéfico das CTMH na regeneração tecidual: Efeitos parácrinos, imunomoduladores e capacidade de diferenciação no tipo celular desejado...	20
Figura 3. Representação esquemática da estrutura do cordão umbilical e das diferentes fontes que podem ser usadas para isolar CTMH.....	21
Figura 4. Estudos publicados envolvendo as atividades biológicas dos PSs extraídos de algas vermelhas, marrons e verdes ao longo dos últimos anos. .	24
Figura 5. Fucoidans com estruturas diversas obtidos a partir de diferentes espécies de algas marrons.....	25
Figura 6. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) pelas CTMH-GW quando expostas ao extrato total do fucoidan e da <i>C. sertularioides</i>	43
Figura 7. Quantificação da atividade da ALP ao fim de 10 dias de exposição aos extratos ricos em PSs.	44
Figura 8. Determinação da acumulação de cálcio na matriz extracelular.	45
Figura 9. Análise da expressão dos marcadores osteogênicos ALP e RUNX2 por qRT-PCR.....	46
Figura 10. Análise da expressão do marcador osteogênico ALP por qRT-PCR induzida pelo extrato total de <i>C. sertularioides</i>	47
Figura 11. Avaliação das frequências médias de células binucleadas, com micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN).	48
Figura 12. Avaliação das frequências médias de células binucleadas, com micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN).	49
Figura 13. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) pelas CTMH-GW quando expostas às subfrações do fucoidan.....	50
Figura 14. Quantificação da atividade da ALP ao fim de 5 dias de indução com as subfrações ricas em PSs obtidas a partir do fucoidan.....	51
Figura 15. Quantificação da atividade da ALP ao fim de 10 dias de indução com a subfrações Fuc 0.5.....	52

Figura 16. Determinação da acumulação de cálcio na matriz extracelular.....	54
Figura 17. Análise da expressão do gene ALP por qRT-PCR induzida pela subfração Fuc 0.5.....	55
Figura 18. Avaliação das frequências médias de células binucleadas, com micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN).	56
Figura 19. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) pelas CTMH-GW quando expostas ao extrato total do fucoidan e das suas subfrações.	82
Figura 20. Análise da expressão do genes BGLAP E BMP2 por qRT-PCR induzida pela subfração Fuc 0.5.....	83
Figura 21. Caracterização das CTMH-GW por meio das diferenciações adipogênica e osteogênica.....	90
Figura 22. Imunofenotipagem das CTMH-GW sem os marcadores.	91
Figura 23. Imunofenotipagem das CTMH-GW com o coquetel de isótopos....	92
Figura 24. Imunofenotipagem das CTMH-GW com o coquetel de marcadores.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de <i>primers</i> usados para amplificação dos genes por qRT – PCR.....	40
Tabela 2. Índice de Divisão Nuclear das CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações do extrato de fucoidan ao longo de 24 h.....	47
Tabela 3. Índice de Divisão Nuclear das CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações do extrato de <i>C. sertularioides</i> ao longo de 24 h.....	48
Tabela 4. Índice de Divisão Nuclear das CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações da subfração FUC 0.5 ao longo de 24 h.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

α-MEM	<i>Minimum Essential Medium, Eagle Alpha Modification</i> (meio essencial mínimo de Eagle, modificação alfa)
AM	<i>Antibiotic-Antimycotic</i> (Solução Antibiótica Antimicótica)
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> (fosfatase alcalina)
BCA	<i>Bicinchoninic acid kit</i> (kit do ácido biciconínico)
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CTA	Células-tronco adultas
CTE	Células-tronco embrionárias
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTMH	Células-tronco mesenquimais humanas
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetraacético)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GW	Geleia de Wharton
iPSC	Células-tronco pluripotentes induzidas
MTT	<i>Dimethylthiazol-2-yl-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i> (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio)
NDI	<i>Nuclear division index</i> (índice de divisão nuclear)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
PSs	Polissacarídeos sulfatados
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RPM	<i>Revolutions per minute</i> (rotações por minuto)
SFB	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Medicina regenerativa	16
1.2 Células-tronco	17
1.2.1 Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	21
1.3 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas	22
1.3.1 Polissacarídeos sulfatados de algas marrons (Fucoidans)	24
1.3.2 Polissacarídeos sulfatados de algas verdes	28
1.4 Genotoxicidade	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Reagentes e meios de cultura.....	34
3.2 Equipamentos	34
3.3 Células-tronco mesenquimais humanas da geleia de Wharton do cordão umbilical (CTMH-GW)	35
3.3.1 Isolamento das células-tronco da geleia de Wharton	35
3.3.2 Caracterização das células-tronco isoladas da geleia de Wharton...	36
3.4 Ensaio de redução do MTT a formazan	37
3.5 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (ALP).....	37
3.6. Avaliação da mineralização da matriz óssea	38
3.7 Avaliação da expressão de marcadores osteogênicos	39
3.7.1 Extração do RNA total	39
3.7.2 Preparação do cDNA	39
3.7.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	40
3.8 Análise da genotoxicidade por ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN)	41
3.9 Análise estatística	41
4 RESULTADOS	42
4.1. Caracterização celular	42
4.2 Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) por CTMH-GW quando expostas ao extrato total do fucoidan e da <i>C. sertularioides</i>	42

4.3. Avaliação da atividade osteogênica dos extratos totais do fucoidan e da <i>C. sertularioides</i>	43
4.3.1. Extratos totais do fucoidan e da <i>C. sertularioides</i> induzem a atividade da ALP em CTMH-GW	43
4.3.2. Acúmulo de cristais de cálcio induzido pelos extratos totais do fucoidan e <i>C. sertularioides</i>	45
4.3.3. Avaliação da expressão de marcadores osteogênicos por qRT-PCR dos extratos totais do fucoidan e da <i>C. sertularioides</i>	46
4.4. Análise da genotoxicidade por micronúcleo	47
4.5. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) de CTMH-GW quando expostas as subfrações do fucoidan.....	49
4.6. Avaliação da atividade osteogênica das subfrações do fucoidan	50
4.6.1 Subfrações do fucoidan induzem aumento de atividade da ALP em CTMH-GW	50
4.6.2. Acúmulo de cristais de cálcio induzido pelas subfrações do fucoidan.	52
4.6.3. Avaliação da expressão de marcadores osteogênicos por qRT-PCR da subfração Fuc 0.5.	55
4.7. Análise da genotoxicidade da subfração fuc 0.5 por micronúcleo	56
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	68
7 REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES	81
ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 MEDICINA REGENERATIVA

A medicina regenerativa é um campo emergente e interdisciplinar de pesquisa e aplicações clínicas focadas na reparação, substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos para restaurar a função prejudicada resultante de defeitos congênitos, doença, trauma e envelhecimento. Para isso são utilizadas várias abordagens tecnológicas que incluem utilização de moléculas solúveis, terapia gênica, transplante de células-tronco, engenharia de tecidos e reprogramação de tipos de células e tecidos (GREENWOOD; THORSTEINSDÓTTIR, 2006). Esta área possui potencial para fortalecer a pesquisa biomédica e a prática clínica, devido às suas inovações no tratamento de doenças prevalentes, como patologias cardíacas e cânceres (KANG, 2016), desenvolve-se a partir de práticas clínicas já estabelecidas, como implantes cirúrgicos e transplantes de medula óssea e de órgãos, que precisam ser melhoradas ou substituídas, relacionando-se, dessa forma, com a engenharia de tecidos (MASON et al., 2008). Naturalmente, na fase inicial de testes, algumas estratégias falham em solucionar os problemas a que se propõem, no entanto, já existem alguns produtos disponíveis comercialmente (MASON et al., 2008), para a úlcera da pele e lesões na cartilagem do joelho (KEMP, 2006) e para tratamento de disfunção da bexiga (ATALA et al., 2006). Nesse sentido, também existem muitas pesquisas que buscam novas estratégias de tratamento para a regeneração do tecido ósseo.

O osso é um tecido conjuntivo denso constituído por um componente mineral e uma matriz orgânica, sendo uma estrutura dinâmica, com capacidade para se autorregenerar. Contudo, fatores como idade, fraturas severas e doenças limitam essa habilidade levando à perda de função (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001; WALMSLEY *et al.*, 2016). As técnicas e tratamentos atuais não são ainda suficientes para resolver todos os problemas ósseos e muitas vezes deixam sequelas. À vista disso, a regeneração do tecido ósseo permanece como uma grande necessidade médica mundial, sendo um campo ativo de pesquisa científica. Diversas estratégias são estudadas com o propósito de encontrar técnicas mais eficazes de recuperação da função óssea, por várias áreas do

conhecimento inclusive pela engenharia tecidual (RICHARDSON *et al.*, 2016). As estratégias passam pela utilização de células (como por exemplo células-tronco), materiais (como hidrogéis e arcabouços com estruturas e composições diversas) e biomoléculas (como fatores de crescimento, citocinas, hormônios, entre outras) (SHAO *et al.*, 2015).

1.2 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco são células indiferenciadas capazes de autorrenovação, aptas a se diferenciar em outros tipos celulares e por isso possuem potencial para regenerar tecidos (TUCH, 2006). Como é mostrado na Figura 1, são divididas em 1) células-tronco embrionárias (CTE), obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto e com capacidade de originar todos os tipos celulares do embrião (TUCH, 2006); e 2) células-tronco adultas (CTA) que possuem capacidade mais limitada de diferenciação em outros tipos celulares e podem ser obtidas a partir de diversas fontes do organismo como medula óssea, tecido adiposo, fluido amniótico, cordão umbilical, entre outras (COLNOT, 2011). Mais recentemente, o grupo de Yamanaka, desenvolveu um protocolo que permite obter células-tronco pluripotentes, por meio da manipulação da expressão de genes específicos em células somáticas diferenciadas, estas células são designadas de célula-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

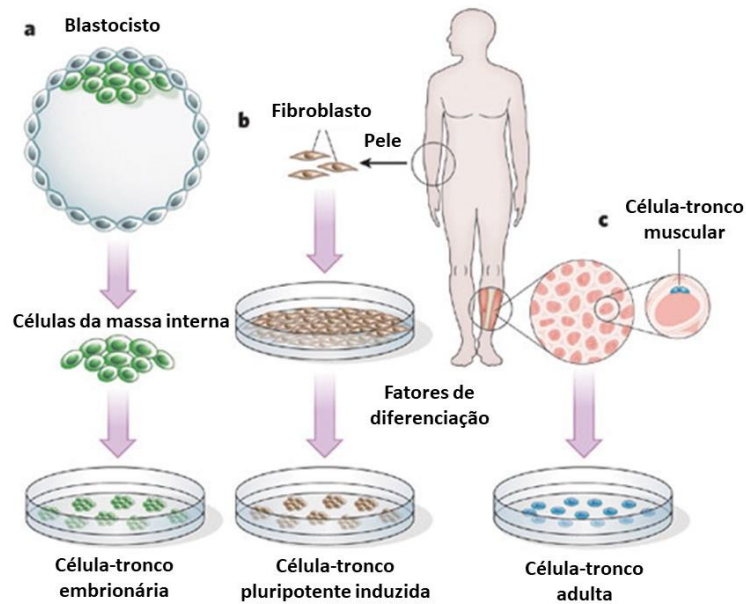


Figura 1. Esquema representativo dos tipos de células-tronco. a) CTE pluripotentes derivadas da massa interna de blastocistos; b) iPSC derivadas de células somáticas adultas por reprogramação; c) CTA específica residente no tecido muscular (adaptado de YVONNE REINWALD, 2016).

Dependendo da origem das células-tronco estão descritas vantagens e desvantagens quanto à sua aplicabilidade em determinados campos da medicina regenerativa. Embora as CTE e as iPSC apresentem maior potencial de diferenciação, ou seja, tenham maior plasticidade, elas apresentam algumas características que limitam a sua utilização, nomeadamente, a sua obtenção levanta problemas éticos (no caso das CTE), são mais difíceis de manipular/cultivar *in vitro* e podem originar teratomas (NAGAMURA-INOUE; HE, 2014; MENON *et al.*, 2016). Nesse sentido, as CTA possuem características que as tornam potenciais agentes terapêuticos para uma ampla variedade de doenças. Especificamente, células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (CTM) são descritas em inúmeros ensaios clínicos (GONZALEZ; BERNAD, 2012).

Em especial as CTM humanas (CTMH) são estudadas para aplicações na regeneração óssea (SHAO *et al.*, 2015). Segundo a Sociedade Internacional para Terapia Celular, CTMH são células multipotentes que, como todas as células-tronco, possuem capacidade de autorrenovação, e com capacidade de

adesão ao plástico. Além disso, são positivas para os marcadores de superfície CD105 (receptor de endoglina), CD90 (proteína de matriz extracelular) e CD73 (enzima de superfície), e negativas para os marcadores de CTH (CD11B ou CD14, CD19 ou CD19 α , CD34, CD45 e HLA-DR). Estas células possuem ainda capacidade para se diferenciarem em adipócitos, condrócitos e osteoblastos *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006). No entanto, estudos apontam que algumas fontes de CTMH podem se transdiferenciar em linhagens não-mesodérmicas, como por exemplo, células neuronais (LIANG *et al.*, 2013) e hepatócitos (AURICH *et al.*, 2009).

Ao longo das últimas décadas nota-se um significativo aumento de estudos que exploram as potencialidades das CTMH. Atualmente, alguns autores avançam nas contribuições para o entendimento da utilidade dessas células a partir do isolamento de diversas fontes de tecidos adultos, por exemplo: adiposo (WANG, Y. *et al.*, 2010), ósseo (QIAO *et al.*, 2014), sangue periférico (GUTIERREZ-AGUIRRE *et al.*, 2014), pele (RIEKSTINA *et al.*, 2008), âmnio (CORRADETTI *et al.*, 2013), cordão umbilical (JIN *et al.*, 2013), dentre outros.

As CTMH são consideradas uma importante alternativa para a terapia celular, não só devido à sua capacidade de diferenciação em outros tipos celulares, mas também por sua função parácrina e atividade imunossupressora, que desempenham um papel essencial na regeneração e reparação tecidual (BLANC, LE *et al.*, 2003; HOCKING; GIBRAN, 2010). Assim, por muito tempo acreditou-se que o papel das CTMH transplantadas para regeneração tecidual resultava da sua capacidade de diferenciação no tipo celular necessário para repor as células no tecido lesado, todavia, foi demonstrado que há uma baixa sobrevivência das células transplantadas (WU *et al.*, 2007). Evidências apontam que o efeito positivo dos transplantes destas células está relacionado com a sua habilidade para modificar o microambiente em que são enxertadas (SHAO *et al.*, 2015), modulando a resposta imune a partir da inibição de algumas vias pró-inflamatórias, além do efeito parácrino e da atividade de endereçamento de linfócitos (entrada de uma população de linfócito em um tecido ou órgão linfoide) que facilita a regeneração tecidual (LI *et al.*, 2014). Na Figura 2 são apresentadas algumas das atividades descritas para as CTMH que fazem com que tenham potencial utilização na medicina regenerativa.

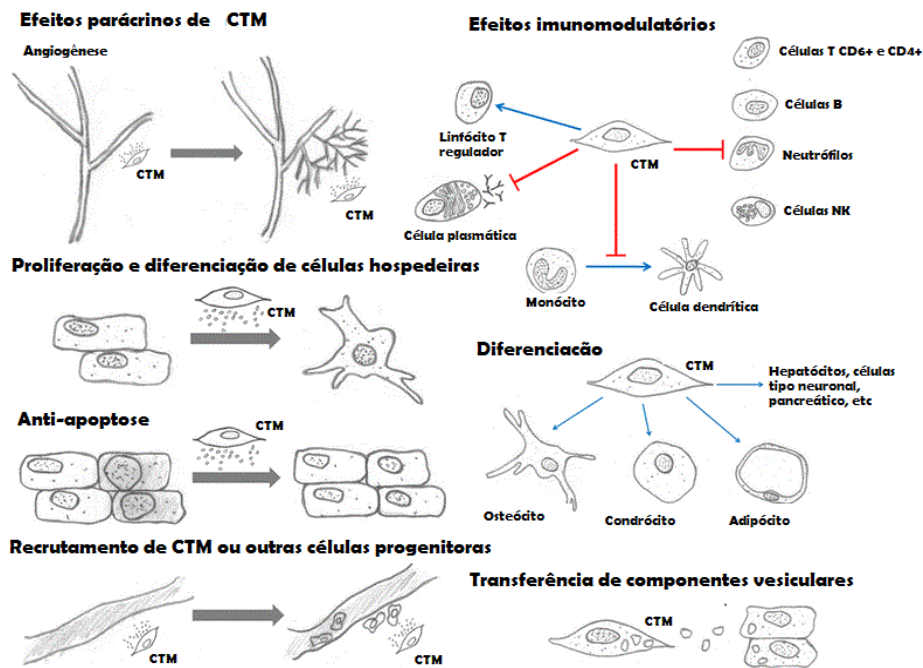


Figura 2. Esquema representativo dos mecanismos sugeridos para o efeito benéfico das CTMH na regeneração tecidual: Efeitos parácrinos, imunomoduladores e capacidade de diferenciação no tipo celular desejado. Adaptado de SHAO et al., 2015.

As CTMH obtidas de diferentes fontes compartilham epítomos similares, no entanto, apresentam diferenças significativas na capacidade de diferenciação, proliferação e potencial de migração (ABBOTT *et al.*, 2014). Foi demonstrado que existem diferenças quantitativas entre as CTMH da medula óssea, do tecido adiposo e da porção cortical do osso em relação ao seu potencial osteogênico, sendo que as células-tronco isoladas do osso cortical apresentaram maior potencial de diferenciação osteogênica em relação às demais (FERNANDEZ-MOURE *et al.*, 2015). Adicionalmente, o estado de diferenciação e/ou tipo de manipulação das CTMH transplantadas influencia na modulação da resposta imune, por isso deverá ser um fator a considerar quando se estuda a aplicação destas células em terapias de regeneração (FU *et al.*, 2016).

Embora as CTMH derivadas da medula óssea tenham sido descritas por apresentarem um melhor potencial para diferenciação condrogênica e osteogênica (SHAO *et al.*, 2015), certas desvantagens relacionadas com o protocolo de obtenção, que pode ser difícil e doloroso, e o baixo rendimento em CTMH isoladas, podem limitar a sua larga aplicação em práticas clínicas. Estes

fatores aumentam o interesse em estudar fontes alternativas e mais convenientes de células com capacidade osteogênica, como por exemplo a polpa dental, o tecido adiposo (FANGANIELLO *et al.*, 2015) e tecidos perifetais, como é o caso do cordão umbilical, líquido amniótico e placenta (GRAYSON *et al.*, 2015). Em particular, as células-tronco perifetais apresentam vantagens em relação às demais, posto que são desprovidas de efeitos colaterais associados com CTA tais como diminuição da capacidade de reparação e aumento da susceptibilidade a doenças degenerativas, o que as torna uma fonte de CTMH com grande potencial para aplicações biomédicas (DING *et al.*, 2015).

1.2.1 Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical

As CTMH são encontradas em vários tecidos do cordão umbilical e na Figura 3 são mostradas algumas dessas fontes. Além disso, elas também podem ser encontradas na membrana amniótica (DING *et al.*, 2015).

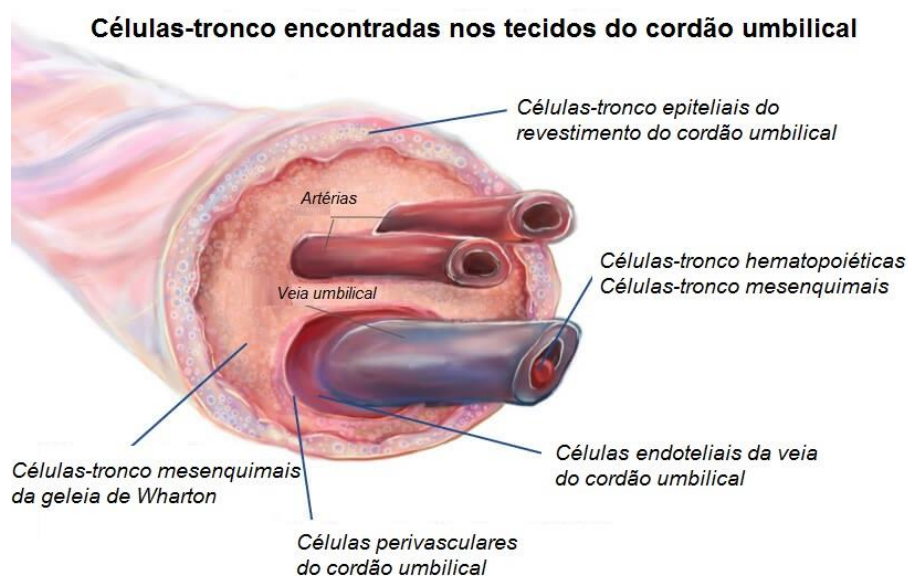


Figura 3. Representação esquemática da estrutura do cordão umbilical e das diferentes fontes que podem ser usadas para isolar CTMH. Adaptado de <http://cells4life.com>

As células-tronco do cordão umbilical apresentam características intermediárias entre CTE e as CTA, expressando baixos níveis dos marcadores de CTE: *Oct-binding transcription factor 4* (Oct4), *Nanog*, *sex-determining region Y box 2* (Sox2), e *Kruppel-like factor 4* (KLF4) (GRECO *et al.*, 2007). Assim como outras CTMH, essas células, além de se diferenciarem em linhagens derivadas da mesoderme, também possuem capacidade para se diferenciarem em tipos

celulares derivados da ectoderme, por exemplo, neurônios, astrócitos e células da glia (DING *et al.*, 2007), e da endoderme, tais como hepatócitos (CAMPARD *et al.*, 2008) e células das ilhotas pancreáticas (TSAI *et al.*, 2012). Essas células apresentam baixa expressão ou completa ausência do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHCII) e de moléculas co-estimulatórias, o que as tornam interessantes para aplicação na medicina regenerativa devido à menor probabilidade de causar reações imunogênicas quando transplantadas (MIGUEL *et al.*, 2012). Adicionalmente, o procedimento para a obtenção das CTMH do cordão umbilical não é invasivo, as células apresentam boa taxa de proliferação e, ao contrário das CTE, não são tumorigênicas nem levantam questões éticas relacionadas com a sua origem (DING *et al.*, 2015).

As CTMH do cordão umbilical já foram descritas em várias aplicações clínicas como: tratamentos de câncer, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MA *et al.*, 2012); tratamento de danos na medula espinhal (HU *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2014); em terapias para diabetes mellitus tipo 2 (KONG *et al.*, 2014); e devido à sua atividade imunossupressora, também foram testadas no tratamento de doenças relacionadas a transplantes (WU *et al.*, 2011). Entretanto, devido à complexidade dos fatores envolvidos neste processo, muitos aspectos do mecanismo pelo qual essas células atuam não são conhecidos o que impede ainda a sua aplicação clínica (DING *et al.*, 2015). Contudo, várias pesquisas já demonstram o efeito benéfico dessas células na regeneração óssea (QU *et al.*, 2012), onde muitas abordagens utilizam essas células em conjunto com outros materiais como, por exemplo, estruturas tridimensionais (arcabouços), hidrogéis ou extratos obtidos a partir de diversas fontes naturais para melhorar o efeito osteogênico (KMIECIK *et al.*, 2015). Desse modo, otimizando-se o protocolo de diferenciação e padronizando-se os procedimentos de coleta, extração, isolamento e manipulação, as CTMH derivadas de cordão umbilical poderão ser uma melhor fonte celular para aplicações na engenharia óssea (SHAO *et al.*, 2015).

1.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

Algumas moléculas naturais ganharam visibilidade devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Certos organismos marinhos, como as

macroalgas, sintetizam uma variedade de compostos bioativos, entre os quais se destacam os polissacarídeos sulfatados (PSs), que têm demonstrado grande potencial para aplicações biomédicas (LAURIENZO, 2010; JESUS RAPOSO, DE *et al.*, 2015). Estas moléculas são análogas aos glicosaminoglicanos de mamíferos, mas não têm equivalentes em plantas terrestres (SILVA *et al.*, 2012). Os PSs são então definidos como polímeros de açúcares carregados negativamente devido a possuírem pelo menos um grupo sulfato. Dependendo do número de monossacarídeos diferentes que a compõe podem ser classificados como homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos (ROCHA *et al.*, 2006; CARVALHO, V; GAMA; M., 2015). Devido ao risco de ocorrerem contaminações com tratamentos realizados com os PSs extraídos de mamíferos (FAREED *et al.*, 2000), os PSs obtidos a partir de algas marinhas são potencialmente mais seguros para aplicações farmacológicas (SENNI *et al.*, 2011).

As macroalgas marinhas estão classificadas em três grupos: i) algas marrons (*Phaeophyceae*) ricas em fucanas; ii) algas vermelhas (*Rhodophyceae*) ricas em galactanas e iii) algas verdes (*Chlorophyceae*), que não possuem um grupo de PSs principal (CUNHA; GRENHA, 2016). As pesquisas atuais, sugerem que cada alga sintetiza o seu tipo de polissacarídeo e o mesmo não é encontrado em nenhuma outra alga (PERCIVAL, 1979; FITTON *et al.*, 2015). Além disso, pode variar na mesma espécie (JESUS RAPOSO, DE *et al.*, 2015), em diferentes partes da mesma alga (DIETRICH *et al.*, 1995), com a sazonalidade (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2006; SCHIENER *et al.*, 2014; JESUS RAPOSO, DE *et al.*, 2015; FLETCHER *et al.*, 2017) e com a fase do ciclo reprodutivo (SKRIPTSOVA, 2016). As algas sintetizam diferentes PSs e por isso, quando se usa um determinado método de extração, prioriza-se a obtenção de um determinado PS em detrimento de outro (ALE *et al.*, 2011).

As galactanas, que são os principais PSs extraídos das algas vermelhas, foram primeiramente estudadas para aplicações na indústria alimentar. Entretanto, nos últimos anos, cresceu o número de estudos envolvendo as atividades biológicas e aplicações de PSs dos outros tipos de algas, marrom e verdes (Figura 4) (CUNHA; GRENHA, 2016).

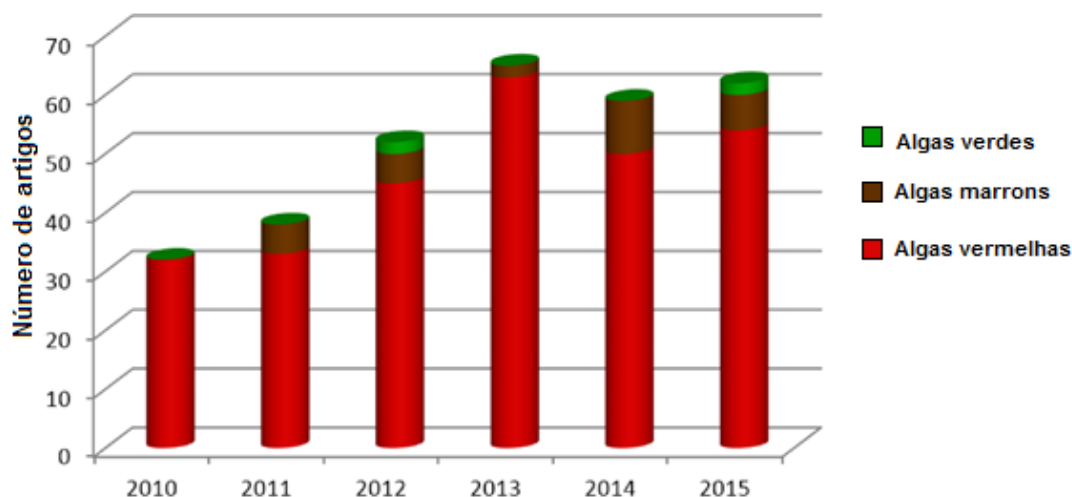


Figura 4. Estudos publicados envolvendo as atividades biológicas dos PSs extraídos de algas vermelhas, marrons e verdes ao longo dos últimos anos (CUNHA; GRENHA, 2016).

Diversas pesquisas mostram as atividades biológicas dos PSs e seus resultados foram sumarizados em várias revisões bibliográficas (WIJESEKARA *et al.*, 2011; WIJESINGHE; JEON, 2012; NGO; KIM, 2013; JESUS RAPOSO, DE *et al.*, 2015). Dentre as atividades biológicas descritas para os PSs de algas marinhas destacam-se as atividades antioxidante (BARAHONA *et al.*, 2011), anticoagulante (CIANCIA *et al.*, 2010), antiviral (OHTA *et al.*, 2009), anticancerígena (SITHRANGA BOOPATHY; KATHIRESAN, 2010), antialérgica e anti-inflamatória (VO *et al.*, 2012). Em particular, os PSs extraídos de algas marrons e conhecidos, de modo geral, como fucanas, ricas em L-fucose sulfatadas, têm demonstrado muitas destas atividades biológicas com possíveis aplicações na medicina regenerativa (FITTON *et al.*, 2015). Dentro da grande família das fucanas, encontramos os fucoidans, os ascophyllans e os sargassans (CHOLLET *et al.*, 2016).

1.3.1 Polissacarídeos sulfatados de algas marrons (Fucoidans)

PSs extraídos da alga marrom *Fucus vesiculosus* começaram a ser estudados no início do século XX por Kylin que denominou o produto da extração de *fucoïdin* (KYLIN, 1913). Posteriormente, outro pesquisador sugeriu alteração do nome para fucoidan (MCNEELY, 1959), desde então, existe indefinição com relação ao uso do termo. Assim sendo, neste trabalho, utilizaremos o termo

fucoidan para denominar extratos ricos em PSs extraídos de algas marinhas marrons. Como citado, esses compostos apresentam a maioria das atividades biológicas encontradas para PSs de algas, em que podemos destacar: anticancerígena (ATASHRAZM *et al.*, 2015), imunomodulatória (ZHANG *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2014), antileishmania (KAR *et al.*, 2011), antiviral para o vírus influenza (HAYASHI *et al.*, 2013; SYNYTSYA *et al.*, 2014), anti-inflamatória (ALSAC *et al.*, 2013), anticoagulante (MAGALHÃES *et al.*, 2011) e também antimalárica (MARQUES *et al.*, 2016), entre outras.

Como é observado para os PSs em geral, a estrutura do fucoidan também depende da sua origem (Figura 5) e esta, por sua vez, vai determinar a sua bioatividade (FLETCHER *et al.*, 2017).

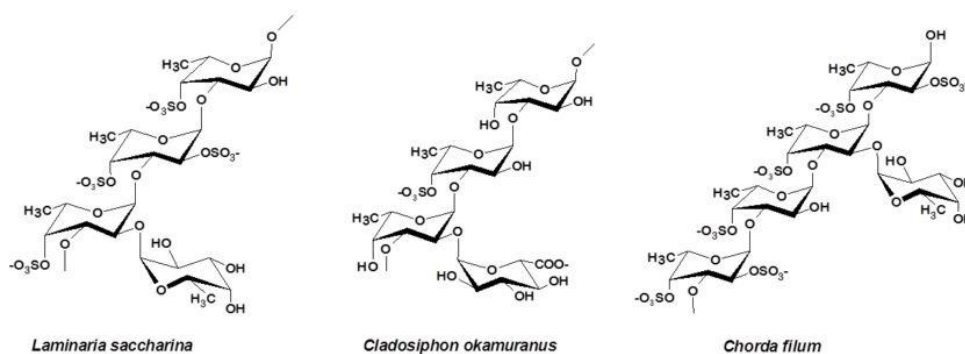


Figura 5. Fucoidans com estruturas diversas obtidos a partir de diferentes espécies de algas marrons (ALE *et al.*, 2011).

Um estudo comparativo usando fucoidans obtidos de nove algas marrons diferentes (*Laminaria saccharina*, *L. Digitata*, *Cladosiphon Okamuranus*, *F. evanescens*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *F. distichus*, *F. spiralis* e *Ascophyllum nodosum*), avaliou as propriedades anti-inflamatórias, antiangiogênicas, anticoagulantes e antiadesivas de fucoidans, com o objetivo de examinar a influência da origem e composição do fucoidan sobre suas atividades biológicas. Os resultados mostraram que nem o teor de fucose e sulfato nem outras características estruturais afetaram significativamente a eficácia dos fucoidans, tendo todos promovido a inibição do recrutamento de leucócitos num modelo de inflamação em camundongos. No entanto, nos ensaios *in vitro*, a adesão de neutrófilos mediada por selectina-P revelou que somente alguns extratos inibiam a selectina-P. Em relação à atividade anticoagulante, todos os fucoidans, exceto

o de *C. okamuranus*, exibiram atividade anticoagulante medida pelo tempo de tromboplastina parcial ativada, enquanto que apenas fucoidans de *L. saccharina*, *L. digitata*, *F. serratus*, *F. distichus* e *F. evanescens* apresentaram forte atividade antitrombina no teste de agregação plaquetária. Os fucoidans de *L. saccharina*, *L. digitata*, *F. serratus*, *F. distichus* e *F. vesiculosus* bloquearam fortemente a adesão das células de carcinoma de mama (MDAMB-231) às plaquetas, efeito que pode ter implicações na metástase tumoral (CUMASHI *et al.*, 2007).

De fato, as pesquisas mostram que fucoidans com composições e estruturas variadas apresentam atividades diferentes. O fracionamento de um extrato obtido de uma mesma alga pode resultar em atividades distintas para as subfrações obtidas. Um estudo recente mostrou que o fracionamento de diferentes PSs ricos em fucose pode resultar em um aumento ou uma perda de atividades (SCHNEIDER *et al.*, 2015). Esses autores trabalharam com extratos ricos em PSs de *Saccharina latíssima*, fucoidan comercial extraído de *F. vesiculosus* e utilizaram heparina para comparar seus resultados. Em termos de inibição da ativação de CXCR4, o extrato de *S. latíssima* foi mais ativo do que o fucoidan, e ambos foram superiores às heparinas. Em seguida, esses extratos foram fracionados por cromatografia de troca iônica. O subfracionamento do extrato de *S. latíssima* revelou que a sua fração principal é composta por uma galactofucana homogênea que exibe atividades mais fortes e pode, portanto, ser considerado como a substância ativa. Já o fracionamento do fucoidan resultou em perda das atividades antioxidante e antiproliferativa quando comparadas com o extrato total (não fracionado). Um outro trabalho separou fucoidan extraído de *C. okamuranus* de acordo com seus pesos moleculares (6.5 – 40 kDa; 110 – 138 kDa; 300 – 330 kDa) e avaliou sua atividade antitumoral em modelo de camundongo. Esse estudo evidenciou que todos os extratos aumentaram significativamente o tempo de sobrevivência do camundongo em relação ao controle (camundongos alimentados com uma dieta isenta de fucoidan), além disso, a amostra com peso de 110 – 138 kDa inibiu significativamente o crescimento do tumor (AZUMA *et al.*, 2012).

A capacidade do fucoidan para modular a diferenciação de células-tronco foi demonstrada em diversas pesquisas (PEREIRA *et al.*, 2014; KWAK, 2014; HAN *et al.*, 2015). Também já foi demonstrado a sua capacidade em estimular a

produção de colágeno e do fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), assim como a indução da angiogênese e da proliferação de fibroblastos (LEE *et al.*, 2012). Estudos descrevem o papel na inibição da via adipogênica (KIM *et al.*, 2010a; XU *et al.*, 2014) e a indução das vias condrogênica (MERCERON *et al.*, 2012) e osteogênica (PARK *et al.*, 2012). Por exemplo, o fucoidan extraído da alga marrom *Undaria pinnatifida* demonstrou capacidade de induzir a diferenciação osteogênica em células de osteossarcoma humano (MG-63), sugerindo que pode ser um importante fator para a promoção da formação e remodelação óssea e também para a mineralização (CHO *et al.*, 2009). Como referido, a origem dos fucoidans pode influenciar as suas atividades devido a possíveis estruturas diferentes (CARDOSO *et al.*, 2016). Assim, foi visto que fucoidan comercializado pela Haewon Biotech, Inc. e pela Sigma-Aldrich, com peso molecular maior do que 30 kDa promove o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), a mineralização, e o aumento da expressão de genes marcadores específicos da osteogênese, incluindo ALP, osteopontina, colágeno do tipo I, fator de transcrição relacionados com o Runt 2 (RunX2) e osteocalcina em CTMH derivadas do tecido adiposo. Este mesmo fucoidan também promoveu a diferenciação osteogênica de uma linhagem de CTMH extraídas do líquido amniótico, sugerindo que o fucoidan tem potencial para ser usado na regeneração óssea (PARK *et al.*, 2012).

Recentemente, os mecanismos moleculares envolvidos na osteogênese induzida pelo fucoidan começaram a ser elucidados e envolvem a via de sinalização BMP-2-Smad1/5/8, pela ativação de ERK e JNK (KIM *et al.*, 2015). Frações ricas em PSs obtidas por extração alcóolica também já tiveram seus efeitos osteogênicos avaliados, *in vitro*, usando células pré-osteoblásticas de murinos (7F2) e, *in vivo*, usando fêmeas de camundongos com 36 semanas de idade (C57BL/6J), confirmando o poder osteogênico do fucoidan, *in vitro*, e efeito anabólico na mineralização óssea, *in vivo* (HWANG *et al.*, 2016).

Assim, algumas abordagens na engenharia tecidual/medicina regenerativa utilizam fucoidan para regeneração óssea, como por exemplo a funcionalização de biomateriais e nanomateriais pela incorporação de fucoidan usando diferentes metodologias. Por exemplo, um tipo de fucoidan (não especificado pelos autores) foi incorporado em nanopartículas de hidroxiapatita

para potencializar o efeito osteogênico do composto (YOUNG *et al.*, 2016). Em outra abordagem, o fucoidan foi incorporado em arcabouços de quitosan e fosfato de β -tricálcio e os resultados mostraram que este biocompósito promoveu a diferenciação osteogênica de células-tronco da medula óssea de uma forma mais eficiente do que o arcabouço sem fucoidan (PUVANESWARY *et al.*, 2016). Outras estratégias ainda utilizam o fucoidan e outros PSs para atuar em sistemas de liberação de fármacos (CHOLLET *et al.*, 2016).

Enquanto já existem vários estudos que mostram a atividade osteogênica dos PSs extraídos de algas marrons, muito pouco foi descrito para os PSs extraídos de algas marinhas verdes.

1.3.2 Polissacarídeos sulfatados de algas verdes

Ainda que sejam menos investigados do que PSs extraídos de outros tipos de algas, alguns estudos descrevem atividades biológicas para PSs presentes nos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*, notadamente, anticoagulantes, antioxidantes, imunomodulatória, anticâncer, antiviral, anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-hiperlipidêmica e anti-hepatotóxica (WANG *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016). Mais recentemente, alguns trabalhos mostraram que os PSs extraídos de algas verdes também possuem potencial para aplicação na medicina regenerativa. Devido ao grande potencial de modificação química que estes PSs permitem, as ulvanas são usadas para o desenvolvimento de biomateriais, como o caso de hidrogéis, e para sistemas de liberação controlada de fármacos (SILVA *et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2016).

Entretanto, as aplicações destes PSs na regeneração óssea ainda são pouco exploradas, mas já existem na literatura estudos que mostram o potencial destes PSs na regeneração óssea. Por exemplo, um estudo desenvolveu um arcabouço de ulvanas funcionalizadas com grupos metacrilato que foi adicionalmente incubado por 30 min numa solução da enzima ALP. Essa técnica promoveu um aumento da mineralização em células MC3T3 (DASH *et al.*, 2014). Foi demonstrado que materiais poliméricos baseados em ulvana e quitosan apresentam propriedades mecânicas que fazem com que possam ser utilizados como componentes do cimento do osso (BARROS *et al.*, 2013). Em um outro

trabalho foi desenvolvido um arcabouço 3D de ácido poli-D,L-láctico carregado com partículas de ulvana, que por sua vez estavam ou não carregadas com dexametasona, e mostraram que o sistema apresenta propriedades compatíveis com aplicações na regeneração óssea (ALVES *et al.*, 2013).

Os PSs de algas verdes são estruturalmente diversos e heterogêneos, diferentemente das algas marrons, não possuindo um termo que contemple a maior parte dos PSs sintetizados pelo grupo. Assim, os PSs de algas verdes possuem diferentes denominações, por exemplo, os membros da família Ulvales, sintetizam principalmente ulvanas. Os polissacáridos derivados de *Caulerpa*, apresentam complexidade composicional e estrutural, em geral, são heteropolissacarídeos que consistem em diferentes monossacarídeos. Galactose é a principal fonte de açúcar nestes PSs, enquanto Xylose, Glucose e Manose são componentes comuns (WANG *et al.*, 2014).

Dentre as diversas espécies que compõe a classe das Chlorophytas, as do gênero *Caulerpa* estão amplamente distribuídas ao longo da costa do estado do Rio Grande do Norte. Concetino e colaboradores (2010) investigaram a diversidade e padrões de distribuição das macroalgas verdes no infra litoral da bacia Potiguar. Mostraram que a família mais representativa é *Caulerpaceae* e dentro da família, o gênero mais diverso é *Caulerpa*, com 11 espécies. Os representantes dessa família apresentam ainda uma ampla distribuição vertical, ocorrendo em profundezas que vão de menos de 10 m a mais de 50 m (CONCETINO *et al.*, 2010).

Um pequeno número de estudos foi publicado descrevendo as atividades para os PSs extraídos a partir de *Caulerpa sp.*, por exemplo, PSs extraídos de *C. racemosa* apresentaram atividade anti-herpética, antileishmania, antiviral, antinociceptiva e anti-inflamatória (GHOSH *et al.*, 2004; PUJOL *et al.*, 2012; LEHNHARDT PIRES *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2014). A atividade imunoestimuladora de PS isolados de *C. lentillifera* foi descrita para células de macrófagos (MAEDA *et al.*, 2012). Atividade antiviral também foi descrita para PSs de *C. taxifolia* (MEN *et al.*, 2009). O extrato rico em PSs de *C. cupressoides* apresentou atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2012). A alga *C. sertularioides*, que teve seu potencial efeito genotóxico e osteogênico avaliado neste trabalho, possui atividades anticoagulante,

antioxidante e antiproliferativa contra células HeLa (COSTA *et al.*, 2010). Todavia, ainda não há relatos sobre a sua possível atividade osteogênica.

Apesar das atividades biológicas já descritas para PSs de algas marinhas, sobretudo para o fucoidan, já foi demonstrado também a sua aplicação em formulações cosméticas, alimentos funcionais e suplementos dietéticos. A verdade é que a sua aprovação para aplicações biomédicas ainda não foi liberada pela *Food and Drug Administration* (FDA), e este fato está relacionado com o pouco conhecimento existente sobre a farmacocinética, a biodisponibilidade, as vias pelas quais esse PSs atuam e também a sua grande heterogeneidade, o que torna difícil a caracterização do fucoidan, das suas subfrações e dos PSs de algas em geral, bem como a padronização das suas aplicações (FITTON *et al.*, 2015). Além disso, o potencial citotóxico e genotóxico são outros aspectos importantes que devem ser determinados antes da translação clínica desses compostos (SONG *et al.*, 2012).

1.4 GENOTOXICIDADE

Ensaio de genotoxicidade podem ser usados para avaliar novos produtos químicos, garantindo a sua eficiência e segurança. Para estudar a biossegurança desses compostos, existem testes que avaliam a integridade genética das células submetidas aos diversos tratamentos (THOMAS; FENECH, 2011), como por exemplo, aos PSs. A Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD) possui uma série de diretrizes que padronizam os testes que certificam a segurança dos compostos. Os principais testes utilizados para avaliar a genotoxicidade dos compostos e a estabilidade genética das células são: micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN), aberrações cromossômicas, eletroforese em gel de célula única (cometa) e o ensaio de mutação reversa em bactérias (teste de Ames). Dentre esses testes, a análise pelo CBMN destaca-se por permitir análise quantitativa com tratamento estatístico.

O CBMN, inicialmente desenvolvido para investigar agentes mutagênicos em culturas de linfócitos do sangue periférico, é um método fidedigno utilizado para a detecção e quantificação de dano no DNA e instabilidade cromossômica, que foi adaptado para utilização em diversas linhagem celulares. O ensaio CBMN pode quantificar algumas alterações nucleares como micronúcleos (MN),

pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN). Os MNs são constituídos por cromossomos inteiros ou fragmentos acêntricos não incluídos no núcleo principal envoltos por uma membrana nuclear individual e indicam quebra cromossômica e/ou perda causada por erros durante a segregação ou no reparo do DNA. Os BNs, por sua vez, indicam amplificação gênica. As PNPs apontam a ocorrência de rearranjos quando os cromossomos dicêntricos são puxados para polos opostos durante a anáfase (THOMAS; FENECH, 2011). Essas alterações nucleares são características de células com instabilidade cromossômica e o método é utilizado em vários estudos que procuram identificar pré-disposição ao desenvolvimento de tumores ou em estados iniciais de desenvolvimento (AIRES *et al.*, 2011; BONASSI *et al.*, 2011; GAYATHRI *et al.*, 2012), como também podem ser utilizados para acessar a biossegurança de vários produtos químicos e biomoléculas (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2013).

A genotoxicidade de alguns PSs obtidos de algas marrons já foi avaliada em alguns estudos. O fucoidan extraído de esporófilos de *U. pinnatifida*, foi testado por três métodos diferentes (CBMN, aberração cromossômica e teste de Ames) e não apresentou efeito genotóxico (KIM *et al.*, 2010b). Outro estudo mostrou que fucoidan com peso molecular de 5 ± 0.6 kDa, obtido por hidrólise ácida, também de *U. pinnatifida*, não exibiu genotoxicidade significativa quando submetido aos testes de aberração cromossômica, mutação reversa e de micronúcleo (SONG *et al.*, 2012). A genotoxicidade de uma fucana purificada a partir da alga marrom *Spatoglossum schröderi* também foi avaliada e não se mostrou genotóxica ou mutagênica por meio do ensaio cometa e do teste de Kado, sendo este último uma adaptação do teste de Ames (ALMEIDA-LIMA *et al.*, 2010).

Além de não ser genotóxico, estudos apontam o possível efeito antígenotóxico de PSs de algas marrons. O extrato aquoso da alga *F. vesiculosus* foi avaliado quanto à sua atividade protetora contra danos induzidos no DNA de linfócitos humanos pela doxorubicina. Os resultados mostraram que os linfócitos pré-tratados com o extrato tiveram redução nos danos ao DNA e nas aberrações cromossômicas (LEITE-SILVA *et al.*, 2007). Outra pesquisa demonstrou que diferentes extratos polissacarídicos da alga *Sargassum dentifolium* tem efeitos antígenotóxicos distintos (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2013).

Entretanto, nada se encontra na literatura em relação aos PSs extraídos de algas verdes, designadamente da alga *Caulerpa sertularioides* que foi estudada nessa pesquisa. Embora a genotoxicidade do fucoïdan extraído de *F. vesiculosus* já esteja descrita, Fitton *et al.*, (2015) citam em sua revisão que as atividades biológicas dos PSs podem variar conforme o método de extração. Desse modo, como a atividade osteogênica de subfrações do fucoïdan está sendo avaliada neste trabalho, é relevante também avaliar o seu potencial genotóxico que, devido ao método de fracionamento utilizado, pode ser diferente daquele encontrado para o extrato total do fucoïdan.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Avaliar a atividade osteogênica de extratos ricos em polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Fucus vesiculosus* (no caso o fucoidan, comercializado pela Sigma) e da alga verde *Caulerpa sertularioides*, bem como, estudar a genotoxicidade das amostras que apresentarem efeito osteogênico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos ricos em PSs do fucoidan e da alga verde *Caulerpa sertularioides* nas CTMH-GW;
- Avaliar a citotoxicidade das subfrações obtidas a partir do fucoidan nas CTMH-GW;
- Avaliar a atividade osteogênica dos extratos ricos em PSs do fucoidan e *C. sertularioides* nas CTMH-CW, por meio de ensaios de atividade enzimática (ALP), morfológicos (mineralização de matriz óssea) e expressão gênica (reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real, qRT-PCR);
- Avaliar a atividade osteogênica das subfrações obtidas a partir do fucoidan nas CTMH-CW, por meio de ensaios de atividade enzimática (ALP), morfológicos (mineralização de matriz óssea) e expressão gênica (reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real, qRT-PCR);
- Avaliar a genotoxicidade dos extratos totais ricos em PSs do fucoidan, da *C. sertularioides* e da subfração Fuc 0.5 utilizando ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos solúveis em água ricos em polissacarídeos sulfatados foram doados pelo Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha. Ressaltando que o fucoidan utilizado neste trabalho é comercializado pela sigma, e as subfrações Fuc 0.5, Fuc 0.9, Fuc 1.1 e Fuc 2.0 foram obtidas a partir da precipitação do mesmo com acetona segundo a metodologia já descrita (COSTA, 2008). Já o extrato aquoso rico em PSs de *C. sertolarioides* foi extraído de algas coletadas pelo grupo no litoral do Estado do Rio grande do Norte. O isolamento das células e demais ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Genômica (LBMG) na UFRN, Natal - RN.

3.1 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura *Minimum Essential Medium Eagle* (α -MEM) e *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (D-MEM), o soro fetal bovino (SFB) e o antibiótico/antimicótico (AM) foram obtidos da GIBCO. A tripsina/EDTA e 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) foram adquiridos à Invitrogen. A dexametasona, o ácido ascórbico, a insulina de pâncreas bovino, o vermelho de alizarina, o *oil red*, o *alcian blue*, o para-nitrofenil-fosfato e o extrato Fucoidan de *Fucus vesiculosus* (F5631) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O β -glicerolfosfato foi adquirido da MP Biomedicals. O kit do ácido bicinconínico (BCA) foi adquirido da Thermo Scientifics. A indometacina foi obtida da Caymam chemical company. A colagenase tipo IV foi obtida da Worthington.

3.2 EQUIPAMENTOS

Os aparelhos utilizados neste projeto foram:

- Bancada de fluxo laminar vertical PCR (Pachane);
- Banho maria (Novatecnica);
- Centrífuga 5804r (Eppendorf);
- Centrífuga 5417r (Eppendorf);
- Centrífuga excelsa II 206 bl (Fanem);
- Centrífuga 05-090-100 (Fisher Scientific);

- Countess II FL (Life Technologies);
- Espectrofotômetro (Biotek);
- Incubadora elite II (REVCO);
- Microscópio óptico CX31RBSFA (Olympus);
- Microscópio óptico invertido CKX41 (Olympus);
- Nanodrop One (Thermo Scientific);
- StepOne Real Time PCR systems (Applied Biosystems).
- Termociclador (Eppendorf);
- Vortex VTX 2500 (Biomixer)

3.3 CÉLULAS-TRONÇO MESENQUIMAIS HUMANAS DA GELEIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL (CTMH-GW)

As células utilizadas nesse estudo foram obtidas a partir de material coletado na Maternidade Januário Cicco, pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN, de acordo com a metodologia proposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e seguindo as medidas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN com número de parecer 508.459 (anexo 1). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todas as mães que concordaram em doar os cordões.

3.3.1 Isolamento das células-tronco da geleia de Wharton

Amostras de cordões umbilicais com aproximadamente 15 a 20 cm de comprimento foram coletadas e mantidas a 4°C em tampão fosfato-salino (PBS: 10 mM Na₂PO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, e 2,7 mM KCl) suplementado com 2% AM até serem processadas. O isolamento das CTMH da geleia de Wharton (CTMH-GW) foi efetuado após o isolamento das CTMH da parede da veia do cordão umbilical de acordo com o descrito (SALEHINEJAD *et al.*, 2012). Em síntese, a geleia de Wharton foi cortada em pequenos fragmentos com o auxílio de bisturi e tesoura cirúrgica. Estes foram centrifugados a 1200 RPM, por 10 min, e lavados com PBS, então, foram tratados com 10 mL de solução 0,1% de colagenase tipo IV, durante 16 h, a 37 °C. Após nova lavagem, o precipitado obtido foi tratado com tripsina/EDTA a 0,25%, durante 15 min, à temperatura ambiente. Adicionou-se SFB e, em seguida, a suspensão celular foi centrifugada

e as células obtidas foram lavada com PBS. O precipitado celular resultante foi ressuspensionado com α -MEM, suplementado com 20% SFB e 2% de AM e as células foram colocadas em frascos T-25 e incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

3.3.2 Caracterização das células-tronco isoladas da geleia de Wharton

As células foram expandidas até às passagens 3 ou 4 (P3 ou P4) e caracterizadas quanto à sua capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica conforme previamente descrito (DUARTE *et al.*, 2012). Resumidamente, para avaliar a capacidade de diferenciação osteogênica, em uma placa de 6 poços foram semeadas CTMH-GW ($9,6 \times 10^4$ células por poço). Após 24 h, o meio foi trocado por meio osteogênico: D-MEM suplementado com 10% de SFB, 1% AM e 1% de glutamina, onde acrescentou-se fatores de indução osteogênica (0,01 μ M de dexametasona, 50 μ M de ácido ascórbico, 10 mM de beta-glicerolfosfato). Para a diferenciação adipogênica o meio D-MEM contendo 15% de SFB e 1% de AM foi enriquecido com fatores de indução adipogênica (1 μ M de dexametasona, 5 μ g.mL⁻¹ de insulina de pâncreas bovino, 60 μ M de indometacina). Em ambos os casos, as células foram mantidas nessas condições por 21 dias, mudando-se o meio a cada 3 – 4 dias. No final as células foram fixadas com álcool a 70% por 1 h e, no caso da diferenciação osteogênica, coradas com 1 mL de solução de 2% de vermelho de Alizarina (pH 4,1), por 30 min para avaliação da produção de matriz extracelular. Para a visualização dos vacúolos de gordura, no caso da diferenciação adipogênica, após fixação com álcool a 70%, as células foram coradas com *Oil Red* por 30 min, protegido da luz. Para a diferenciação condrogênica, 2×10^5 células foram mantidas em tubos falcons de 15 mL sob a forma de *pellet* em 0,5 mL de meio D-MEM contendo 1% de SFB e 1% de AM, enriquecido com fatores de indução condrogênica (0,5 μ g.mL⁻¹ de insulina de pâncreas bovino, 10 ng.mL⁻¹ de TGF-beta1, e 50 μ M de ácido ascórbico 2-fosfato). Depois de 21 dias de cultivo, matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos sulfatados foi corada com *alcian blue*. Como controle negativo foram usadas células cultivadas em meio D-MEM (complementado com 10% de SFB, 1% AM e 1% de glutamina) sem fatores indutores. O experimento foi realizado em triplicata.

As células também foram caracterizadas por imunofenotipagem, por citometria de fluxo, utilizando o kit *Human MSC Analysis* (BD Biosciences), que permite avaliar a presença dos marcadores CD90, CD105 e CD73 (marcadores positivos para CTM) e o CD44, CD34, HLA-DR, CD45, CD14 (marcadores negativos nas CTM) (Consultar anexo 3).

3.4 ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT A FORMAZAN

O ensaio de redução do MTT é um método colorimétrico que se baseia na redução do sal amarelo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em sais de formazana de cor violeta, nas mitocôndrias de células vivas devido à atividade das desidrogenases (ŚLIWKA *et al.*, 2016). As CTMH-GW foram semeadas em placas de 96 poços, em uma densidade de 2×10^3 células/poço e cultivadas em 100 μ L de meio α -MEM complementado com 10% de SFB, 1% AM e 1% de glutamina (meio basal). Ao fim de 24 h o meio foi trocado por meio contendo as amostras ricas em PSs em diferentes concentrações ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a citotoxicidade foi avaliada após 24 h, 48 h e 72 h. Células mantidas em meio basal foram usadas como controle negativo. No final de cada tempo foi adicionado MTT a 1 mg.mL^{-1} solubilizado em PBS e após incubação a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, por 3 h, o sobrenadante foi aspirado e os cristais solubilizados pela adição de 100 μ L de DMSO. A absorbância foi medida a 570 nm e proliferação celular foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Redução do MTT (\%)} = \frac{\text{Absorbância do tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

O experimento foi realizado em triplicata experimental e biológica.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP)

CTMH-GW foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 2×10^4 células/poço e cultivadas em 500 μ L de meio basal, por 24 h. Em seguida, foram tratadas com os extratos ricos em PSs diluídos em meio basal e em meio osteogênico, em diferentes concentrações (5 e 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e a atividade da ALP foi avaliada, pelo de ensaio de atividade enzimática, após 5, 10 e 14 dias de

exposição. Células mantidas em meio basal e meio osteogênico foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. O meio de todas as células foi mudado a cada três dias.

Inicialmente, as células foram lavadas duas vezes com PBS (4°C) e foi adicionado 300 µL de tampão de lise (NaHCO₃ - 0,1 M, Na₂CO₃ - 0,1 M, MgCl₂ - 1.5 mM, e Triton X-100 - 0.1% a pH 10). A ALP, em meio alcalino, é capaz de promover a hidrólise de p-Nitrofenil-fosfato em p-Nitrofenol. O substrato é incolor, enquanto o produto formado possui cor amarelada possível de ser mensurada a 405 nm, sendo a intensidade da cor proporcional à concentração da enzima no meio (SABOKBAR *et al.*, 1994). Desse modo, 180 µL de cada lisado foi transferido para um novo poço em uma placa de 96 poços, no qual foi adicionado 20 µL do substrato específico da ALP (para-nitrofenil-fosfato solubilizado no tampão de lise a 10 mg.mL⁻¹). Em seguida, a placa foi agitada por 2 min e então, incubada a 37 °C, protegida da luz, por 1 h. Logo após, a absorbância foi mensurada a 405 nm. As proteínas totais foram quantificadas usando o kit BCA seguindo as orientações do fabricante e usando BSA para a curva padrão. Os valores da ALP foram expressos em termos percentagem de aumento em relação ao controle negativo. Esse experimento foi realizado em duplicata experimental e triplicata biológica.

3.6. AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DA MATRIZ ÓSSEA

As células foram semeadas em placas de 96 poços (2x10³ células/poço) usando 100 µL de meio basal. Ao fim de 24 h, o meio basal foi mudado por meio basal (constituído por DMEM) e meio osteogênico contendo as amostras ricas em PSs e mantidas por 21 dias. Como controle negativo mantiveram-se as células em meio basal e como controle positivo, em meio osteogênico. O meio foi trocado a cada três dias. As células foram fixadas e coradas com vermelho de alizarina conforme descrito no tópico 3.3.2. Após a coloração obteve-se imagens utilizando o microscópio óptico. Em seguida, para a quantificar a produção de matriz óssea, o corante retido foi solubilizado com 150 µL de ácido acético 10% (v/v), a placa foi mantida sob agitação por 30 min, protegida da luz. Por fim, 100 µL foi transferido para outra placa de 96 poços e a absorbância a 405 nm medida no espectrofotômetro. O acúmulo de vermelho de alizarina foi normalizado pela quantidade de proteínas totais. As proteínas totais foram

quantificadas usando o kit BCA seguindo as orientações do fabricante e usando BSA para a curva padrão. Os valores da deposição de corante foram expressos em termos percentagem de aumento em relação ao controle negativo. Para este ensaio, foram realizados dois experimentos independentes com três réplicas de cada condição por ensaio.

Adicionalmente, a mineralização da matriz óssea também foi avaliada qualitativamente pela coloração de von Kossa. Resumidamente, as células foram fixadas com solução de formalina a 10% por 30 min. Em seguida, 50 μ L de solução de nitrato de prata a 5% foi adicionado a cada poço e exposto a luz forte por 30 minutos. Após a coloração obtiveram-se imagens utilizando o microscópio óptico.

3.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES OSTEOGÊNICOS

Para analisar a expressão diferencial dos marcadores osteogênicos, induzida pelos diferentes tratamentos, CTMH-GW foram semeadas em placas de 6 poços, na densidade de $9,6 \times 10^4$ células/poço, em 2 mL de meio basal, por 24 h. As células foram mantidas por um período de 10 dias com os extratos diluídos em meio basal (onde o α -MEM foi substituído por DMEM) e em meio osteogênico. O meio foi trocado a cada três dias. Como controle negativo mantiveram-se as células apenas com meio basal e como controle positivo, células em meio osteogênico. Foram realizados 3 experimentos independentes.

3.7.1 Extração do RNA total

O RNA total das células foi extraído utilizando o kit RNeasy (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 30 μ L de água livre de RNases e armazenado a -80 °C até sua utilização. A sua concentração e pureza foi determinada usando NanoDrop One.

3.7.2 Preparação do cDNA

Tendo como molde o RNA total extraído, o cDNA foi sintetizado, usando-se 2 μ g de RNA total, segundo o protocolo do *High Capacity cDNA reverse transcription* kit (Applied Biosystem): 10 min a 25 °C, seguindo-se incubação durante 120 min a 37 °C, e finalmente 5 min a 85 °C. As amostras de cDNA ficaram guardadas a -20 °C até a sua utilização.

3.7.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A análise de qRT-PCR foi usada para comparar a expressão relativa dos marcadores osteogênicos nas diferentes condições de cultura e para isto foi utilizado o cDNA sintetizado como descrito anteriormente. A amplificação foi realizada no aparelho StepOne Real Time PCR systems (Applied Biosystems). Foi analisada a expressão dos marcadores gênicos: Fosfatase Alcalina (ALP), Fator de Transcrição Runx-2 (RUNX2), Proteína Morfogenética Óssea 2 (BMP2), Proteína Óssea de gama-carboxiglutâmico (BGLAP). A normalização dos resultados foi realizada usando a expressão da Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As sequências dos *primers* usados para a amplificação dos genes estão descritas na Tabela 1. As reações do qRT-PCR foram preparadas numa placa de 48 poços, sendo que cada reação foi composta por 1 µL de cDNA, 10 µM de cada *primer*, 5 µL do SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), e 3 µL de água, totalizando 10 µL por reação. O experimento foi realizado sob as seguintes condições: 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão. A análise foi realizada por meio do *Fold change* obtido pelo cálculo: $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o GAPDH para normalizar os resultados.

Tabela 1. Sequências de *primers* usados para amplificação dos genes por qRT – PCR

Gene	Sequência (5' - 3')	Número de acesso
GAPDH	For - AGG TGC GTG TGA ACG GAT TTG	NM_002046.3
	Rev - TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA	
ALP	For - ACT GGT ACT CAG ACA ACG AGA T	NM_000478.4
	Rev - ACG TCA ATG TCC CTG ATG TTA TG	
RUNX2	For - TCA ACG ATC TGA AGA TTT GTG GG	NM_001024630.3
	Rev - GGG GAG GAT TTG TGA AGA CGG	
BMP2	For - TTC GGC CTG AAA CAG AGA CC	NM_001200.2
	Rev - CCT GAG TGC CTG CGA TAC AG	
BGLAP	For - GGC GCT ACC TGT ATC AAT GG	NM_000711
	Rev - GTG GTC AGC CAA CTG GTC A	

3.8 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE POR ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE (CBMN)

Células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% SFB e 1% AM em placas de 6 poços a uma densidade de $9,6 \times 10^4$ células/poço. Após 24 h, o meio foi mudado por meio contendo as amostras ricas em PSs da *C. sertularioides*, do extrato total do fucoidan ou da subfração Fuc 0.5, nas concentrações 5 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Células mantidas em meio basal foram usadas como controle negativo. Passadas 24 h, mudou-se novamente o meio para meio contendo citocalasina B (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ao controle positivo foi adicionado 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de mitomicina-C. Depois de 24 h, as células foram tripsinizadas e transferidas para tubos de 15 mL, onde se realizou o protocolo segundo Tavares (2009) com adaptações. Resumidamente, foi adicionado 5 mL de solução fixadora gelada, na proporção de 9:1 (metanol:ácido acético), as células foram então centrifugadas por 8 min, a 1200 RPM, e esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Então, 60 μL de suspensão celular foi transferida para uma lâmina e em seguida as células foram coradas com Giemsa por 5 min. O índice de divisão celular (NDI) de cada tratamento foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{NDI} = \frac{(\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3} + 4\text{M4})}{\text{N}}$$

Onde M1 - M4 representa o número de células com 1 - 4 núcleos e N é o número total de células viáveis marcadas. Foram avaliadas 2000 células binucleadas por tratamento/ensaio quanto à formação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos, por microscopia óptica segundo Fenech (2007). Foram realizados três experimentos independentes.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graphpad Prism versão 6.0 (2012). Para comparações simples, foi utilizado o teste t-Student; para comparações múltiplas a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. A análise foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO CELULAR

Utilizando a metodologia descrita, as células cultivadas nos meios de diferenciação (osteogênico e adipogênico) apresentaram, ao fim de 21 dias, coloração positiva para os seus respectivos tipos celulares. As células foram positivas para os marcadores CD105, CD90 e CD73 e negativas para os marcadores CD44, CD34, HLA-DR, CD45, CD14 (anexos 2 e 3).

4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REDUTORA DO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT) POR CTMH-GW QUANDO EXPOSTAS AO EXTRATO TOTAL DO FUCOIDAN E DA *C. sertularioides*

Os resultados mostrados na Figura 6A evidenciaram que, até $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o extrato total do fucoidan não influenciou a capacidade redutora do MTT das CTMH-GW. Entretanto, na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ao fim de 48 h, o tratamento com o extrato total do fucoidan resultou em 17,5% de diminuição da redução do MTT em relação às células mantidas em meio basal (controle negativo). Contudo, após 72 h de tratamento, não foi observado efeito significativo. Ensaio anteriores realizados com concentrações mais altas (25, 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) evidenciaram que, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, houve um decréscimo de 50% na capacidade redutora do MTT pelas CTMH-GW após 72h de tratamento (apêndice 2).

Já o extrato total rico em PSs extraído da alga verde *C. sertularioides*, não influenciou a capacidade redutora do MTT das CTMH-GW em concentrações até $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Com $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em 72 h, observou-se uma diminuição de 20% na capacidade redutora do MTT das CTMH-GW em comparação ao controle negativo Figura 6B.

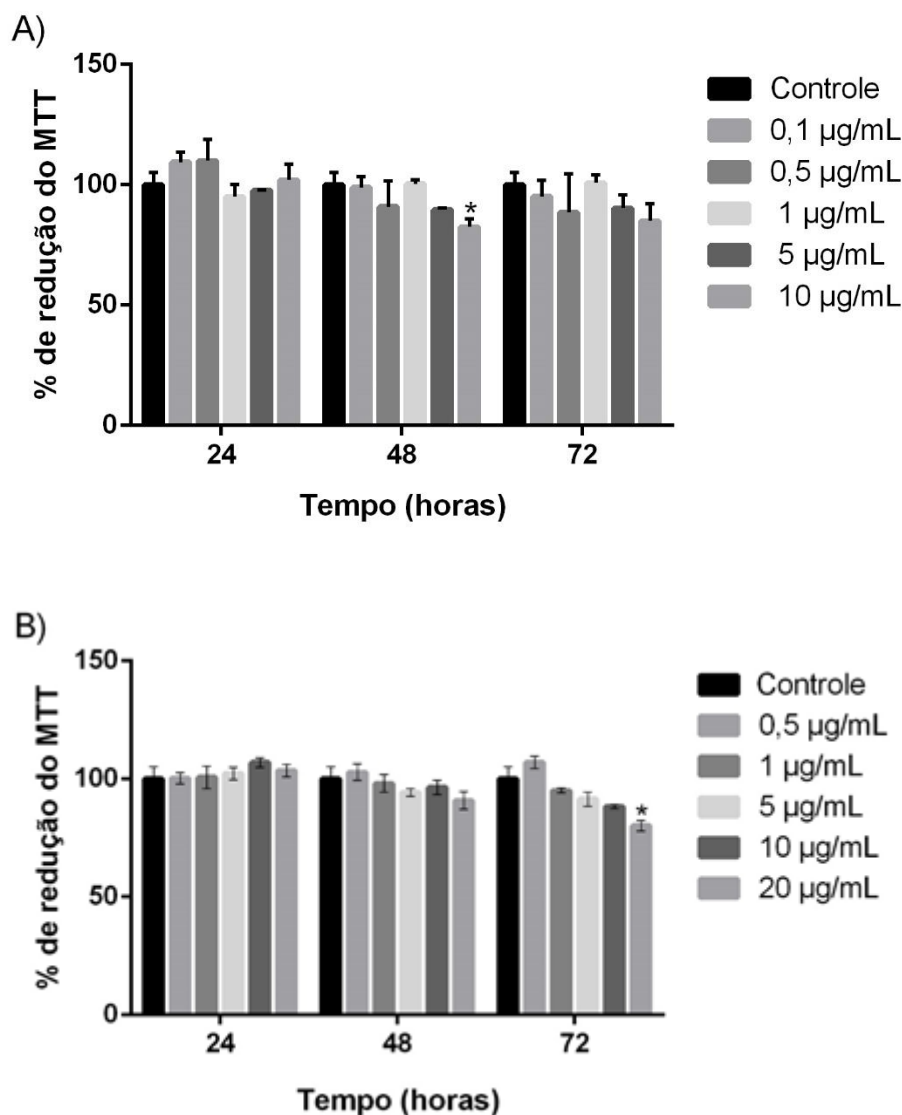


Figura 6. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) pelas CTMH-GW quando expostas ao extrato total do fucoidan e da *C. sertularioides*. CTMH-GW foram expostas aos extratos totais do fucoidan (A) e da *C. sertularioides* (B) em diferentes concentrações (0,1-20 µg.mL⁻¹) durante 24, 48 e 72 h. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *p < 0,05 Estatisticamente significativa em relação ao controle negativo de acordo com o teste de Tukey.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DOS EXTRATOS TOTAIS DO FUCOIDAN E DA *C. SERTULARIOIDES*

4.3.1. Extratos totais do fucoidan e da *C. sertularioides* induzem a atividade da ALP em CTMH-GW

Para verificar se os extratos totais do fucoidan e da *C. sertularioides* induzem a diferenciação osteogênica das CTMH-GW, o ensaio de atividade da

fosfatase alcalina foi realizado como um *screening* de atividade, em que o meio basal e o meio osteogênico foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. As amostras foram diluídas em meio basal e meio osteogênico, para avaliar um potencial efeito sinérgico das amostras com os indutores osteogênicos presentes no meio. Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que o extrato total do fucoidan induziu um aumento de 40 % ($p < 0,05$) na atividade da ALP em relação ao controle negativo, quando diluído apenas em meio basal. Quando as amostras ricas em PSs foram diluídas em meio osteogênico, observou-se aumento de 192 % ($p < 0,0001$) na atividade da ALP em relação ao controle positivo induzida pelo extrato da *C. sertularioides* a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

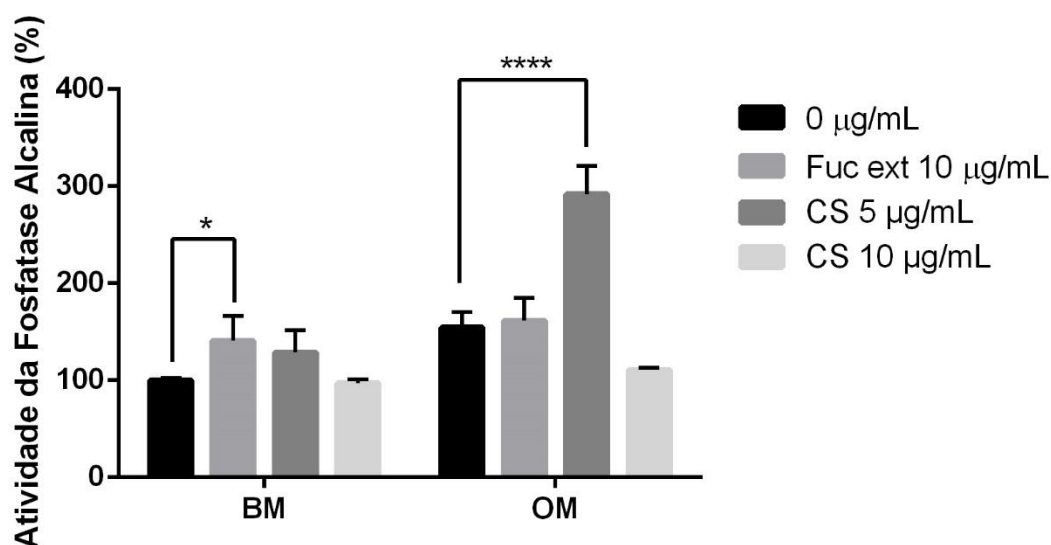


Figura 7. Quantificação da atividade da ALP ao fim de 10 dias de exposição aos extratos ricos em PSs. CTMH-GW foram tratadas, durante 10 dias, com 5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada amostra rica em PSs em meio basal ou osteogênico e a atividade da ALP foi quantificada e normalizada pela quantidade de proteínas totais. MB: meio basal, MO: meio osteogênico, Fuc ext: extrato total de fucoidan, CS: *C. sertularioides*. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle negativo ou positivo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ Estatisticamente significativa de acordo com o teste de Tukey.

4.3.2. Acúmulo de cristais de cálcio induzido pelos extratos totais do fucoidan e *C. sertularioides*

O ensaio de mineralização foi realizado após 21 dias de tratamento usando duas concentrações (5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos extratos totais do fucoidan e da *C. sertularioides* diluídos em meio basal e meio osteogênico. Todas as condições induziram a deposição de cálcio. As colorações histoquímicas, vermelho de alizarina e von Kossa, comprovam a deposição de cálcio nas células tratadas com o meio osteogênico (controle positivo) e com os extratos totais do fucoidan e da *C. sertularioides* (Figura 8A). Entretanto, quando realizada a quantificação do vermelho de alizarina, esse acréscimo foi significativo apenas para o extrato da *C. sertularioides* na concentração 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, diluído em meio basal. Não foi observado aumento estatístico quando os estratos foram diluídos em meio osteogênico em comparação ao controle positivo (Figura 8B).

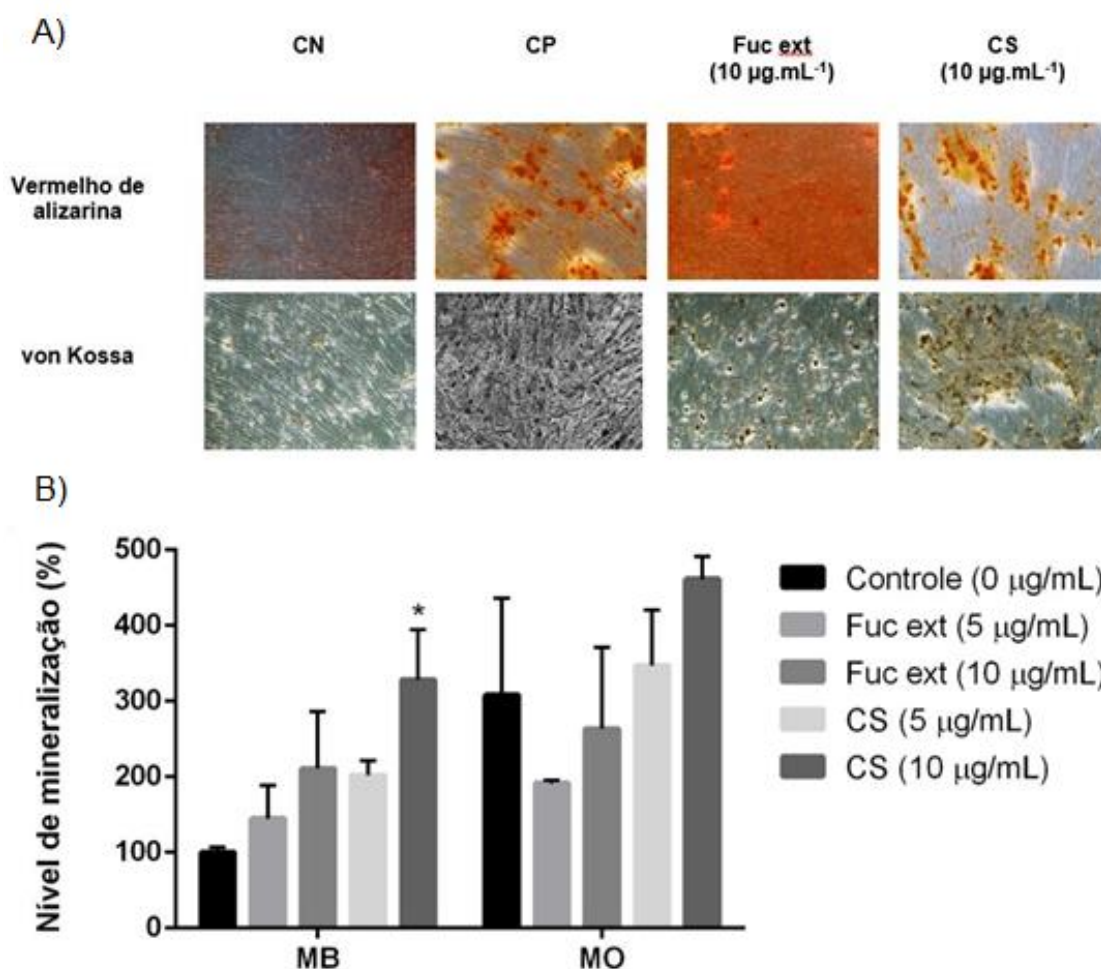


Figura 8. Determinação da acumulação de cálcio na matriz extracelular. CTMH-GW foram tratadas com o extrato total do Fucoidan e da *C. sertularioides* com 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 21 dias. A) Coloração com vermelho de alizarina e von Kossa. B) Quantificações da acumulação

de cálcio determinadas por absorvância a 405 nm e normalizada pela quantidade de proteínas totais. Ampliação 100X. CN: controle negativo. Fuc ext: extrato total do fucoidan. CS: *C. sertularioides*. CP: controle positivo. MB: meio basal MO: meio osteogênico. *p < 0,05 Estatisticamente significante em relação ao controle negativo de acordo com o teste de Tukey.

4.3.3. Avaliação da expressão de marcadores osteogênicos por qRT-PCR dos extratos totais do fucoidan e da *C. sertularioides*

O efeito dos PSs, alvo deste estudo, na expressão dos genes que são marcadores osteogênicos foi realizado cultivando as células por 3 e 5 dias na presença do extrato de fucoidan (Fuc ext) nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados mostraram que houve expressão dos genes ALP (Figura 9A) e RUNX2 (Figura 9B), entretanto esse aumento observado foi inferior à expressão destes mesmos genes no controle positivo. A expressão basal (controle negativo) é sempre igual a 1.

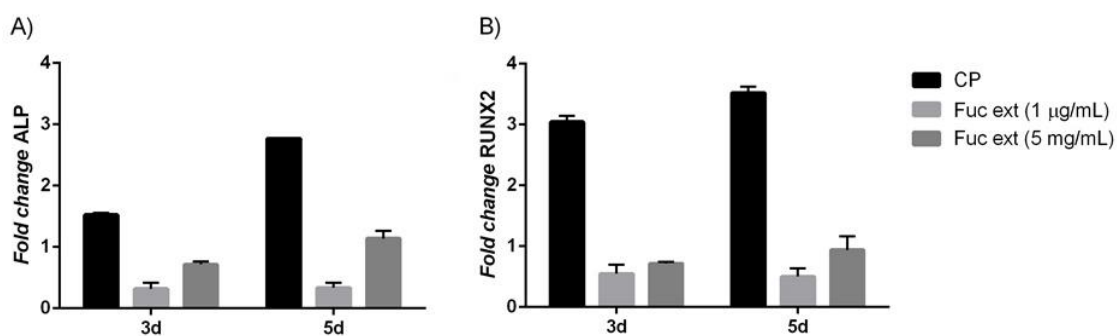


Figura 9. Análise da expressão dos marcadores osteogênicos ALP e RUNX2 por qRT-PCR. CTMH-GW foram tratadas com amostras ricas em PSs em meio basal ao longo do tempo. O *fold change* foi obtido por meio do cálculo $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o GAPDH para normalizar os resultados. CP: Controle positivo. Fuc ext: Extrato total do fucoidan.

Um novo ensaio foi realizado com 10 dias de tratamento, com o extrato total da *C. sertularioides* diluído em meio osteogênico. Nessas condições, as CTMH-GW apresentaram expressão do gene ALP duas vezes superior à expressão encontrada no controle positivo (Figura 10).

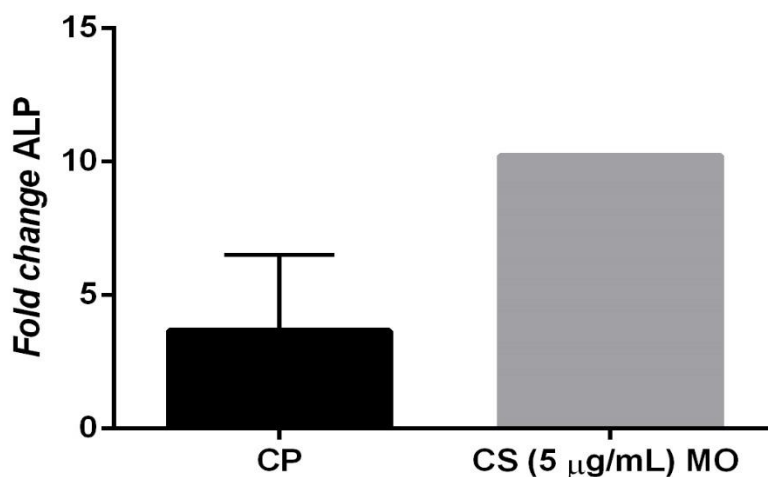


Figura 10. Análise da expressão do marcador osteogênico ALP por qRT-PCR induzida pelo extrato total de *C. sertularioides*. CTMH-GW foram tratadas com amostras ricas em PSs da *C. sertularioides* em meio osteogênico, por 10 dias. O *fold change* foi obtido por meio do cálculo $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o GAPDH para normalizar os resultados. CP: Controle positivo. CS: *C. sertularioides*. MO: células tratadas com meio osteogênico e PSs na concentração indicada.

4.4. ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE POR MICRONÚCLEO

A genotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo ensaio de CBMN de acordo com Tavares e colaboradoras (TAVARES *et al.*, 2009). Após 24 h de exposição às amostras ricas em PSs, o extrato total do fucoidan não induziu alterações significativas em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 11). A Tabela 2 apresenta os valores de NDI para os controles e para cada tratamento com o fucoidan.

Tabela 2. Índice de Divisão Nuclear das CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações do extrato de fucoidan ao longo de 24 h.

Tratamento	NDI
CN	1,99 ± 0,005
CP	1,94 ± 0,05
Fuc ext (5 µg.mL ⁻¹)	1,99 ± 0,007
Fuc ext (20 µg.mL ⁻¹)	1,84 ± 0,015

*NDI: Índice de divisão nuclear; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; Fuc ext: Extrato total do fucoidan.

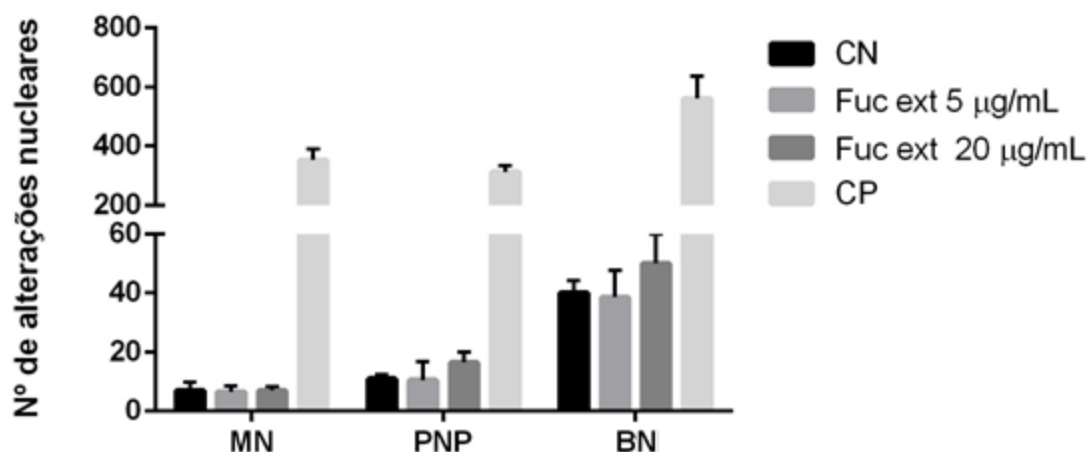


Figura 11. Avaliação das frequências médias de células binucleadas, com micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN). Células CHO-K1 expostas ao extrato do fucoidan a 5 e 20 µg.mL⁻¹. CN: Controle negativo. Fuc ext: Extrato total do fucoidan. CP: Controle positivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições. Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey foi utilizado para avaliar a probabilidade de diferenças significativas entre os tratamentos.

De modo semelhante, as células tratadas com o extrato da *C. sertularioides* também não apresentaram alterações com relevância estatística, quer na frequência de micronúcleos quer nas outras alterações nucleares estudadas, em comparação com o controle negativo. Apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos, é possível visualizar uma tendência na redução do número total de micronúcleos, pontes e brotos na concentração 5 µg.mL⁻¹ (Figura 12). A tabela 3 apresenta os valores de NDI para os controles e para cada tratamento.

Tabela 3. Índice de Divisão Nuclear das CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações do extrato de *C. sertularioides* ao longo de 24 h.

Tratamento	NDI
CN	1,98 ± 0,005
CP	1,82 ± 0,012
CS (5 µg.mL ⁻¹)	1,97 ± 0,005
CS (20 µg.mL ⁻¹)	1,93 ± 0,008

*NDI: Índice de divisão nuclear; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; CS: *C. sertularioides*.

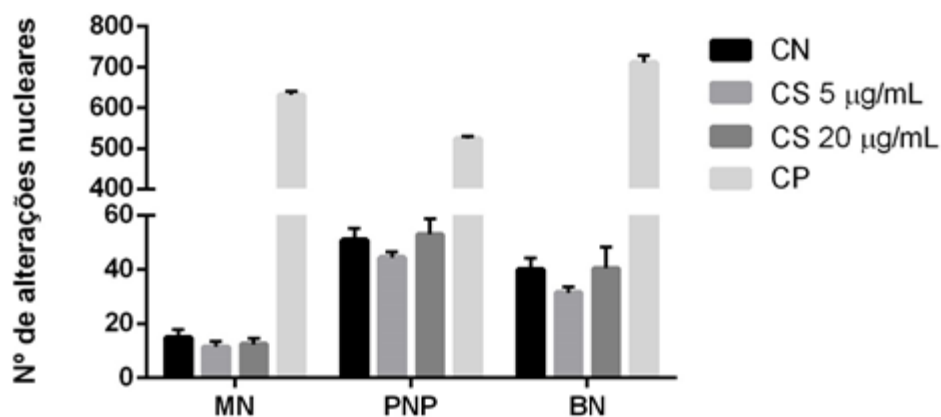


Figura 12. Avaliação das frequências médias de células binucleadas, com micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN). Células CHO-K1 expostas ao extrato da alga verde *C. sertularioides* a 5 e 20 µg.mL⁻¹. CN: Controle negativo. CS: *Caulerpa sertularioides*. CP: Controle positivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições. Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey foi utilizado para avaliar a probabilidade de diferenças significativas entre os tratamentos.

4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REDUTORA DO SAL DE TETRAZOLIUM (MTT) DE CTMH-GW QUANDO EXPOSTAS AS SUBFRAÇÕES DO FUCOIDAN.

Os resultados exibidos na Figura 13 evidenciaram que, até 5 µg.mL⁻¹, as subfrações do fucoidan não influenciaram a capacidade das CTMH-GW em reduzir o MTT. Entretanto, na concentração de 10 µg.mL⁻¹, a subfração Fuc 1.1, ao fim de 48 h de tratamento, e a subfração Fuc 2.0 em 24 h, resultaram em aproximadamente 20% de diminuição da capacidade das células em reduzir o MTT em relação ao controle negativo. Contudo, após 72 h, nenhuma amostra apresentou efeito significativo. Ensaio anteriores realizados com concentrações mais altas (25, 50 e 100 µg.mL⁻¹) evidenciaram que, na concentração de 100 µg.mL⁻¹, houve um decréscimo de 30% na capacidade redutora do MTT pelas CTMH-GW após 72 h de tratamento com a subfração Fuc 0.5 (apêndices).

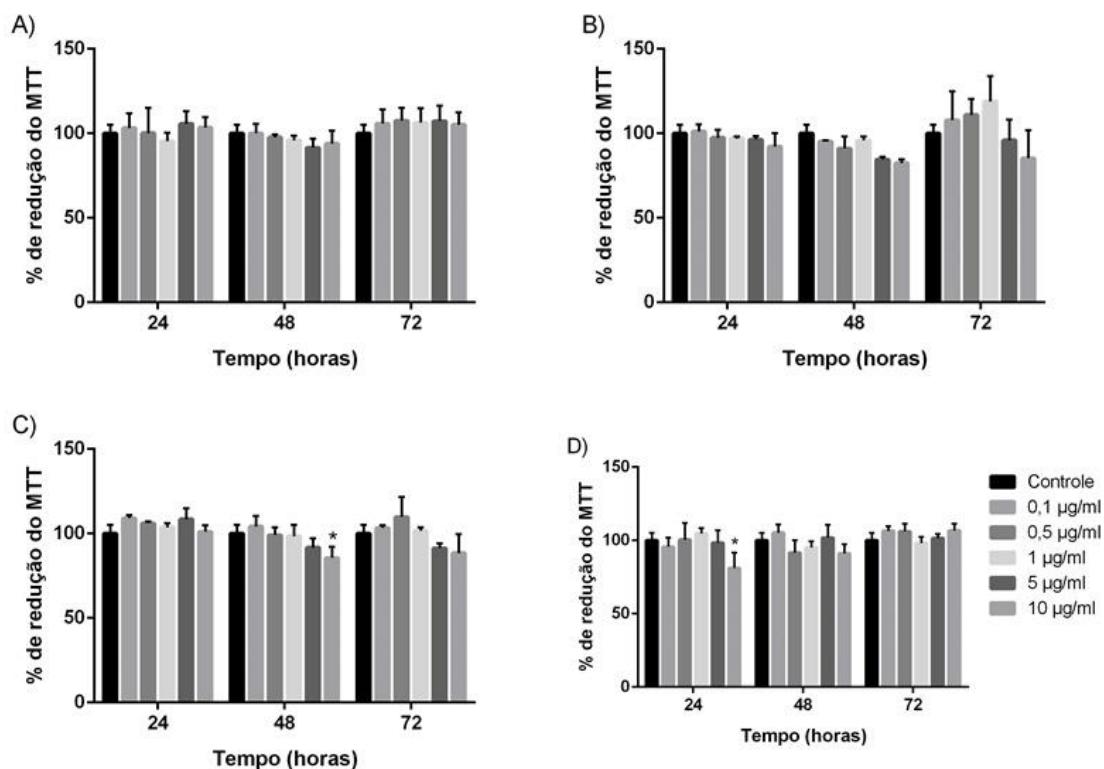


Figura 13. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) pelas CTMH-GW quando expostas às subfrações do fucoidan. CTMH-GW foram expostas às subfrações do fucoidan em diferentes concentrações (0,1 - 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24, 48 e 72 h. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A) Subfração Fuc 0.5, B) Subfração Fuc 0.9, C) Subfração Fuc 1.1 e D) Subfração Fuc 2.0. * $p < 0,05$ Estatisticamente significativa em relação ao controle negativo de acordo com o teste de Tukey.

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OSTEOGÊNICA DAS SUBFRAÇÕES DO FUCOIDAN

4.6.1 Subfrações do fucoidan induzem aumento de atividade da ALP em CTMH-GW

Para verificar se as subfrações do fucoidan induzem a diferenciação osteogênica das CTMH-GW, foi realizado o ensaio de quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) com as amostras ricas em PSs diluídas em meio basal durante 5 dias de indução. Verificou-se que todas as subfrações induziram o aumento de atividade da ALP ($p < 0,0001$), exceto a subfração Fuc 2.0, na concentração 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 14).

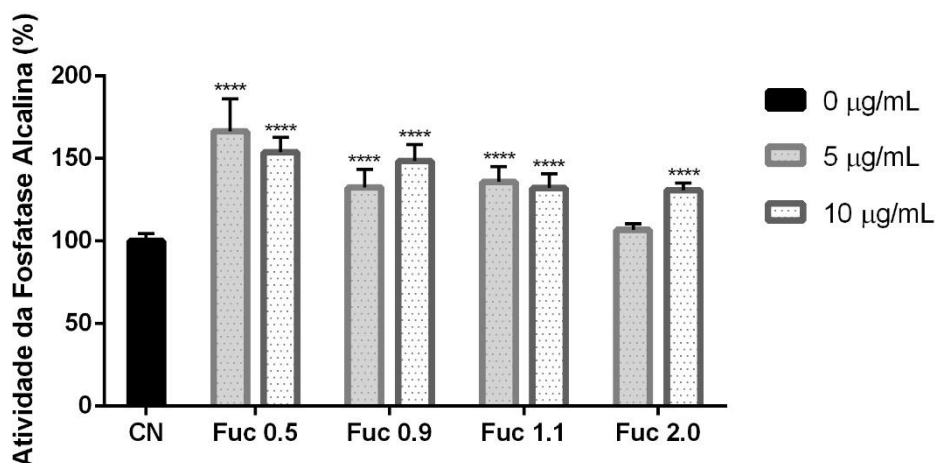


Figura 14. Quantificação da atividade da ALP ao fim de 5 dias de indução com as subfrações ricas em PSs obtidas a partir do fucoïdan. CTMH-GW foram tratadas, durante 5 dias, com 5 e 10 µg.mL⁻¹ de cada subfração em meio basal e a atividade da ALP foi medida e depois normalizada pela quantidade de proteínas totais. CN: Controle negativo, Fuc 0.5 - 2.0: subfrações de Fucoïdan. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle negativo. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ****p < 0,0001 Estatisticamente significativo de acordo com o teste de Tukey.

Como a subfração Fuc 0.5 apresentou melhor resultado, realizou-se outro teste de atividade da ALP, diluindo essa amostra em meio osteogênico com 10 dias de tratamento, para avaliar um potencial efeito sinérgico das amostras com os indutores osteogênicos presentes no meio. A Figura 15 mostra que a subfração Fuc 0.5, a 5 µg.mL⁻¹, quando diluída em meio osteogênico promoveu o aumento em 124% da atividade da ALP em relação ao controle positivo (p <0,01).

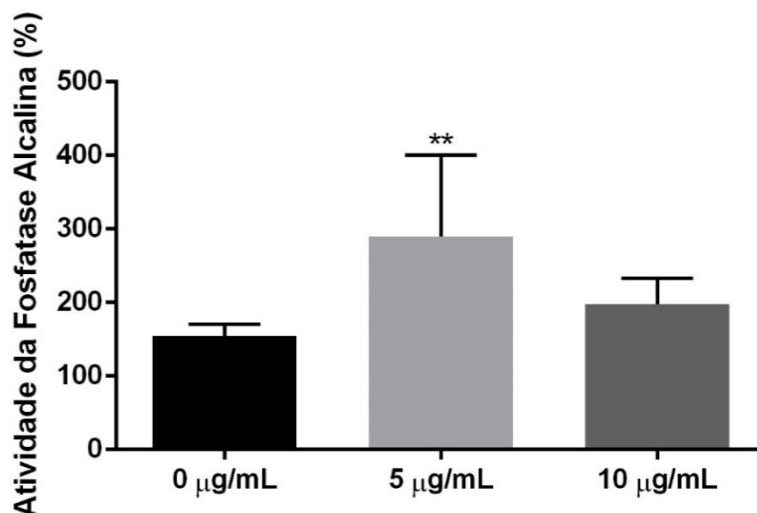
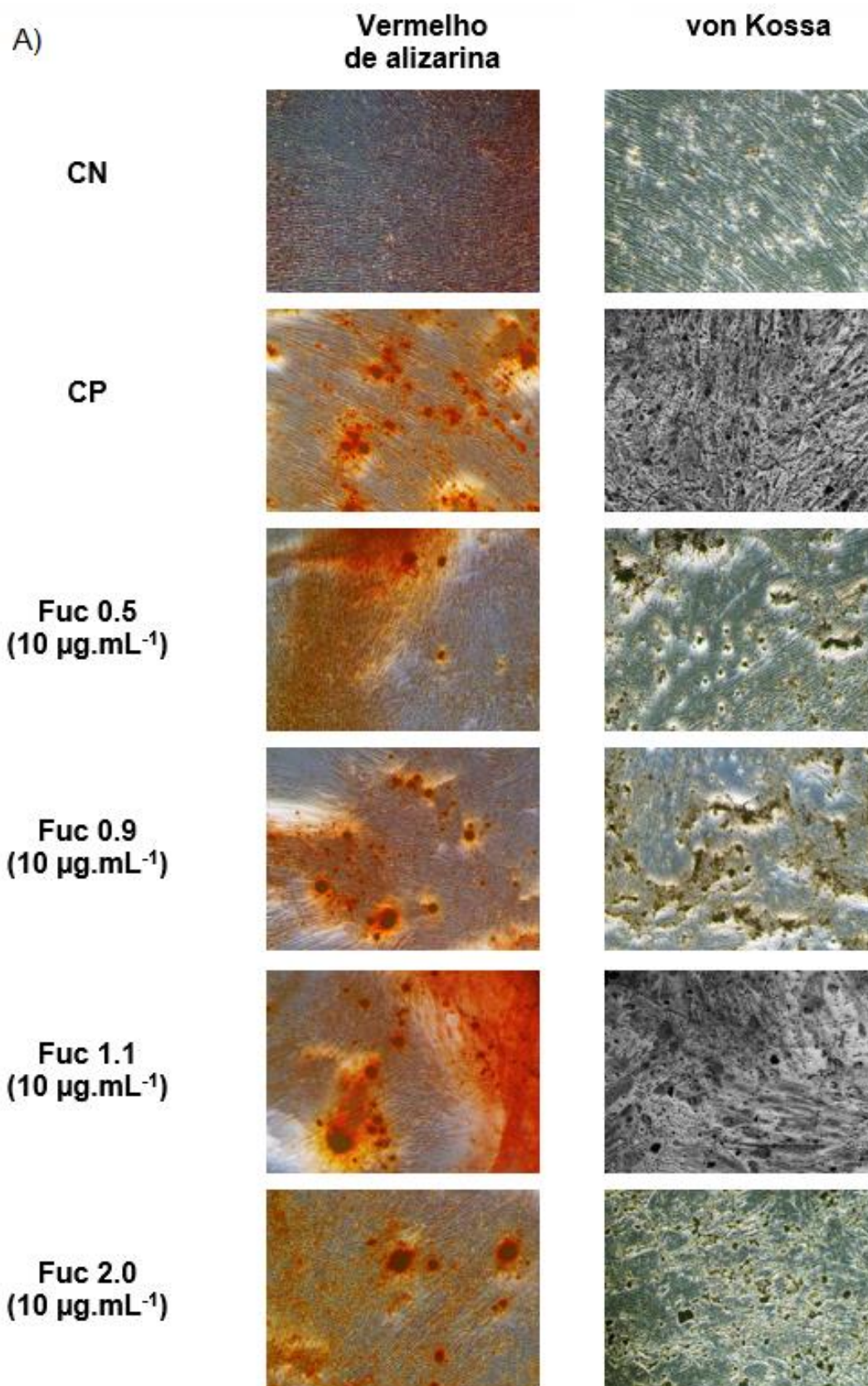


Figura 15. Quantificação da atividade da ALP ao fim de 10 dias de indução com a subfrações Fuc 0.5. CTMH-GW foram tratadas, durante 10 dias, com 5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da subfração Fuc 0.5 em meio osteogênico e a atividade da ALP foi medida e normalizada pela quantidade de proteínas totais. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle positivo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ Estatisticamente significante de acordo com o teste de Tukey.

4.6.2. Acúmulo de cristais de cálcio induzido pelas subfrações do fucoidan.

O ensaio foi realizado após 21 dias como já descrito. As subfrações apresentaram diferentes efeitos sobre a deposição de cálcio. Nenhuma subfração apresentou efeito sinérgico com o meio osteogênico na indução de mineralização. Na Figura 16 A são apresentadas as imagens representativas das colorações histoquímicas de vermelho de alizarina e von Kossa, sendo visíveis a presença de depósitos de cálcio nas células tratadas com as diferentes subfrações. A subfração Fuc 0.9 induziu um aumento de 216 % ($*p < 0,05$) de mineralização nas CTMH-GW na concentração 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em comparação ao controle negativo Figura 16 C. As outras subfrações também induziram o aumento do acúmulo de cálcio, entretanto, não foram significativos.



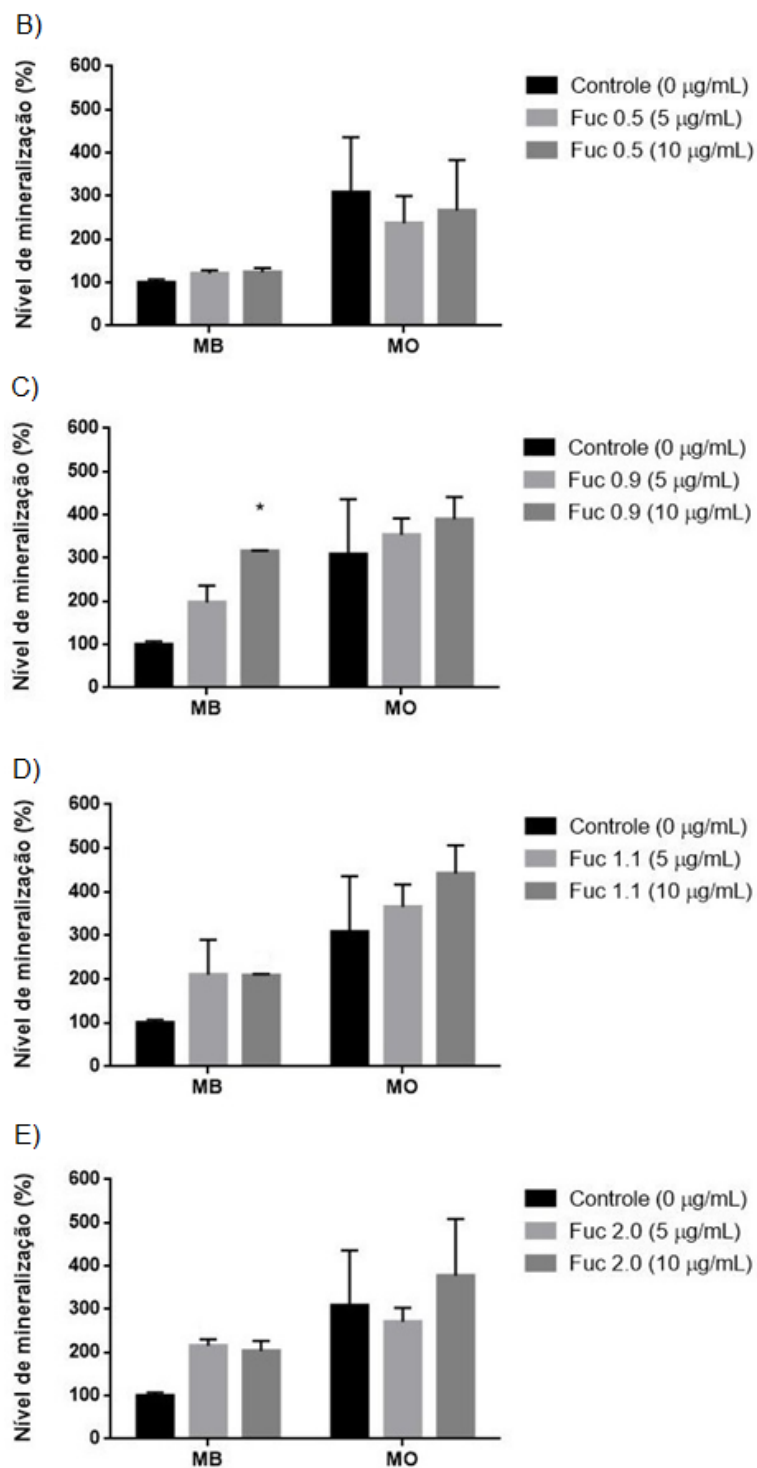


Figura 16. Determinação da acumulação de cálcio na matriz extracelular. CTMH-GW foram tratadas com as subfrações do fucoidan com 5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 21 dias, e as quantificações da acumulação de cálcio determinadas por absorbância a 405 nm e normalizada pela quantidade de proteínas totais. A) Subfração Fuc 0.5. B) Subfração Fuc 0.9. C) Subfração Fuc 1.1. D) Subfração Fuc 2.0. E) Coloração histoquímica por vermelho de alizarina e von Kossa. Ampliação 100X. CN: controle negativo. Fuc 0.5 – 2.0: subfrações do fucoidan. CP: Controle positivo. MB: meio basal. MO: meio osteogênico. * $p < 0,05$ Estatisticamente significante em relação ao controle negativo de acordo com o teste de Tukey.

4.6.3. Avaliação da expressão de marcadores osteogênicos por qRT-PCR da subfração Fuc 0.5.

O efeito da subfração Fuc 0.5 na expressão do gene da ALP nas CTMH-GW foi estudado para 10 dias de tratamento com a subfração diluída em meio basal e meio osteogênico. Nessas condições, subfração Fuc 0.5 em meio osteogênico, na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, induziu a expressão do gene ALP de maneira semelhante à observada no controle positivo. Quando tratadas apenas com a amostra diluída em meio basal, na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, as células apresentaram expressão de ALP, entretanto esta expressão foi menor do que a observada no controle positivo (Figura 17). A expressão basal (controle negativo) é sempre igual a 1.

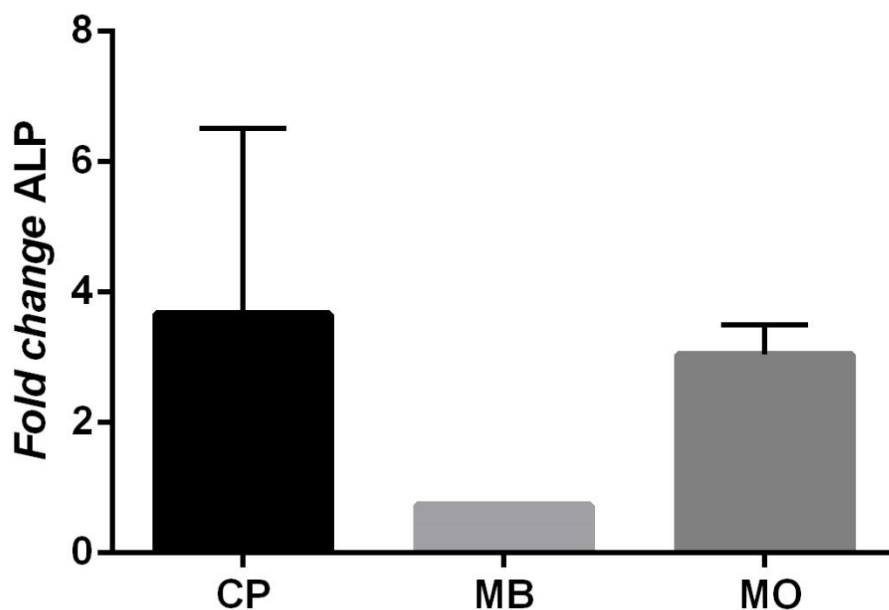


Figura 17. Análise da expressão do gene ALP por qRT-PCR induzida pela subfração Fuc 0.5. CTMH-GW foram tratadas com a subfração Fuc 0.5 em meio osteogênico, por 10 dias. O *fold change* foi obtido por meio do cálculo $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o GAPDH para normalizar os resultados. CP: Controle positivo. MB: Células tratadas com meio basal e PSs na concentração indicada. MO: Células tratadas com meio osteogênico e PSs na concentração indicada.

4.7. ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DA SUBFRAÇÃO FUC 0.5 POR MICRONÚCLEO

O ensaio de micronúcleo foi realizado conforme descrito na metodologia e, após o tempo de tratamento, a subfração Fuc 0.5 não apresentou efeito sobre as alterações nucleares avaliadas (Figura 18). A Tabela 4 apresenta os valores de NDI para os controles e para cada tratamento com a subfração Fuc 0.5.

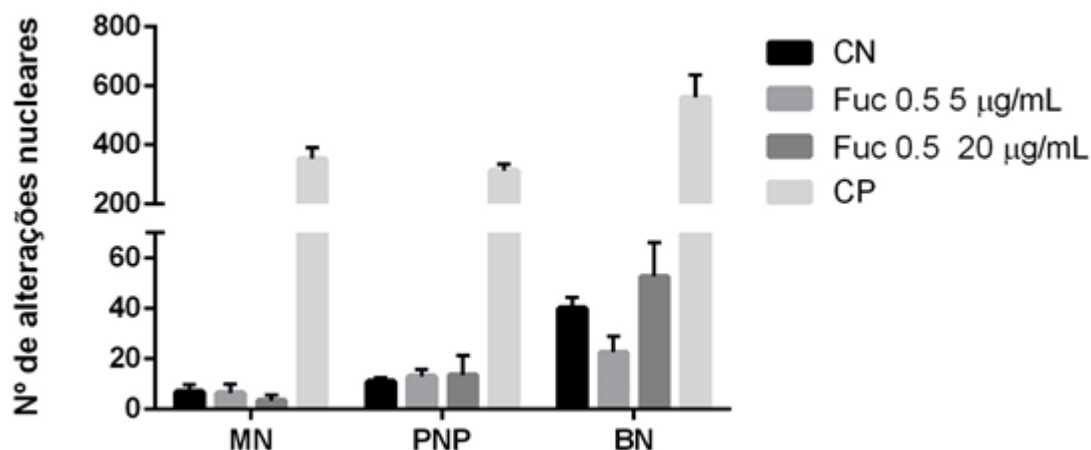


Figura 18. Avaliação das frequências médias de células binucleadas, com micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (BN). Células CHO-K1 expostas ao extrato da alga verde *C. sertularioides* a 5 e 20 µg.mL⁻¹. CN: Controle negativo. Fuc 0.5: subfração 0.5 do fucoidan. CP: Controle positivo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três repetições. Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey foi utilizado para avaliar a probabilidade de diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 4. Índice de Divisão Nuclear das CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações da subfração FUC 0.5 ao longo de 24 h.

Tratamento	NDI
CN	1,99 ± 0,005
CP	1,94 ± 0,05
Fuc 0.5 (5 µg.mL ⁻¹)	1,99 ± 0,006
Fuc 0.5 (20 µg.mL ⁻¹)	1,97 ± 0,02

*NDI: Índice de divisão nuclear; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; Fuc 0.5: subfração do fucoidan Fuc 0.5.

5 DISCUSSÃO

Nas novas abordagens para tratamentos relacionados com perda óssea, ou danos em que o organismo não consegue se autorregenerar, são desenvolvidas alternativas aos transplantes autólogos que passam pela aplicação de células, biomateriais e biomoléculas. Nesse sentido, os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vêm sendo extensivamente investigados devido à ampla gama de bioatividade que possuem (WANG *et al.*, 2014; FITTON *et al.*, 2015; JESUS RAPOSO, DE *et al.*, 2015). Dentre os PSs mais estudados, estão os fucoidans extraídos das algas marrons que compõem, na verdade, um grupo de moléculas variadas com pesos moleculares e graus de sulfatação distintos o que dificulta a caracterização e, conseqüentemente, a sua aplicação farmacológica (FITTON *et al.*, 2015). Pesquisas mostram que os PSs podem modular o comportamento das células-tronco direcionando-as para uma via de diferenciação (MERCERON *et al.*, 2012), inclusive para a via osteogênica (KIM *et al.*, 2015). As células-tronco extraídas da geleia de Wharton também são estudadas por possuírem várias características que as tornam uma fonte atrativa para aplicações na terapia celular (SHAO *et al.*, 2015). Apesar disso, até vai o nosso conhecimento, o comportamento das CTMH-GW nunca foi avaliado na presença de PSs. Adicionalmente, este efeito dos PSs na modulação do comportamento das células-tronco é ainda pouco explorado, principalmente no que se refere à ação de PSs extraídos de algas verdes. Por isso, neste trabalho investigou-se o potencial osteogênico do fucoidan e das suas subfrações e de um extrato rico em PSs extraído *C. sertularioides*. Além do mais, foi avaliada a genotoxicidade do extrato total de um fucoidan comercial (F5631 - Sigma), da subfração Fuc 0.5 obtida desse mesmo fucoidan, bem como do extrato total da alga verde *C. sertularioides*.

Inicialmente foi avaliado efeito dos extratos na capacidade das CTMH-GW reduzirem o MTT, visto que, se os compostos em questão fossem tóxicos para essas células não seria possível continuar com os ensaios. Constatou-se que os extratos influenciam diferentemente esta atividade, todavia, no geral, tanto o extrato do fucoidan quanto as subfrações obtidas a partir dele, bem como o extrato de *C. sertularioides* não apresentaram efeito significativo até 10 µg.mL⁻¹,

nas condições testadas (Figura 6 e Figura 13). Estudos relatam que os PSs apresentam efeitos conflitantes no crescimento celular *in vitro*. Por exemplo, PSs obtidos da alga *S. schröderi* foram investigados como agentes anticarcinogênicos por inibirem o crescimento de certas linhagens de células cancerígenas (carcinoma pancreático - PANC-1, epitélio de câncer prostático - PC-3 e leucemia promielocítica - HL60) (ALMEIDA-LIMA *et al.*, 2010). Contudo, outras pesquisas mostram um efeito proliferativo sobre células endoteliais humanas (GIRAUX *et al.*, 1998) e CTMH derivadas da medula óssea alveolar (KIM *et al.*, 2015), enquanto outros autores não encontram quaisquer influência desses PSs na proliferação celular (CHO *et al.*, 2009). Os PSs utilizados em cada estudo são moléculas distintas química e estruturalmente e por isso agem diferentemente. Além disso, os efeitos dos PSs sobre a proliferação celular variam com a concentração e com a linhagem celular em questão. Os resultados obtidos no presente estudo, no entanto, indicam que as CTMH-GW se mostram mais sensíveis aos efeitos dos PSs do que outras linhagens celulares. Por exemplo, Park e colaboradores, em sua pesquisa realizada com CTMH extraídas a partir do tecido adiposo, para testar o efeito osteogênico de determinados fucoidans comercializados pela Haewon Biotech, Inc. e pela Sigma-Aldrich, utilizou até $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do composto (PARK *et al.*, 2012). Em nossos estudos, a visualização das células por microscopia e o ensaio de MTT indicam que essa concentração é citotóxica para as CTMH-GW, o efeito do extrato total do fucoidan, nessas condições é devido à morte celular e não à diminuição da taxa de proliferação, embora, o mecanismo envolvido nesse processo não tenha sido explorado nesse trabalho (apêndice 2).

Depois de determinado o efeito dos PSs abordados na presente pesquisa sobre a proliferação celular e citotoxicidade, o potencial osteogênico dessas moléculas foi estudado. Sabe-se que a ALP é um marcador dos estágios iniciais da diferenciação osteogênica. A isoforma não específica dos tecidos possui um papel chave na mineralização óssea, promovendo a formação de cristais de hidroxiapatita nas vesículas extracelulares secretadas pelos osteoblastos (ORIMO; SHIMADA, 2008). Dependendo do tipo celular utilizado, pode haver diferenças nos tempos de atividades máxima desta enzima. Neste trabalho, diferentes condições foram testadas para avaliar a influência das amostras ricas

em PSs na atividade da ALP em CTMH-GW. Além disso, também se avaliou se haveria um efeito sinérgico entre os fatores que induzem a atividade da ALP e os PSs, por isso o ensaio usando as amostras diluídas em meio basal e em meio osteogênico foi realizado com tempo de exposição de 10 dias. Na comparação entre os dois extratos totais, os resultados apresentados na Figura 7 mostram que o extrato total do fucoidan teve melhor efeito a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando diluído em meio basal, aumentando 40 % ($p < 0,05$) a atividade da ALP em relação ao controle negativo, enquanto que o extrato da *C. sertularioides* apresentou melhor resultado para a menor concentração ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com as amostras ricas em PSs diluídas em meio osteogênico, aumentando em 192 % ($p < 0,0001$) a atividade da ALP em relação ao controle positivo.

O efeito encontrado para este fucoidan, nestas células, foi comparativamente menor do que o encontrado para fucoidans testados em outros tipos celulares. Provavelmente o aumento pouco expressivo da atividade da ALP possa estar relacionado ao fato de que as CTMH-GW são obtidas a partir de tecidos neonatais, e por isso, menos comprometidas com a linhagem osteogênica. Estas células poderão necessitar de um tempo maior ou de outras condições para induzir um aumento mais expressivo da atividade da ALP do que as células-tronco obtidas de tecidos adultos, como as da medula óssea. Posto que já existem artigos que descrevem a atividade osteogênica de alguns fucoidans em outras células, e que nessas células não vimos um efeito tão pronunciado, foi mais interessante nesse trabalho investigar a atividade das subfrações obtidas pela precipitação com acetona do extrato total, para avaliar se alguma apresentaria melhor efeito osteogênico.

O ensaio realizado com as subfrações do fucoidan foi realizado ao fim de 5 dias de indução, com as amostras ricas em PSs diluídas em meio basal. Nessas condições, todas as frações apresentaram efeito indutor sobre a atividade da ALP, contudo, o melhor resultado foi observado para a subfração FUC 0.5, a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde se observou um aumento de 67% ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo, efeito semelhante ao encontrado no controle positivo (Figura 14). Desse modo, como a subfração Fuc 0.5 apresentou melhor resultado, realizou-se também outro teste, diluindo essa fração em meio osteogênico com 10 dias de tratamento, em que evidenciou-se um efeito

sinérgico da subfração Fuc 0.5 com os indutores presentes no meio osteogênico (Figura 15).

O efeito do fucoidan extraído de *U. pinnatifida* na maturação dos osteoblastos foi estudado, dentre outros ensaios, pela determinação da atividade da ALP em células da linhagem MG-63. Foi demonstrado que o fucoidan aumentou a atividade da enzima, de forma dose dependente, após 48 h de tratamento (CHO *et al.*, 2009). Outro estudo conduzido com CTMH extraídas do tecido adiposo testou a atividade osteogênica de um fucoidan com peso molecular maior do que 30 kDa, comercializado pela Haewon Biotech, Inc. Os pesquisadores utilizaram esse fucoidan diluído em meio osteogênico e verificaram que o ensaio colorimétrico de atividade da ALP foi fortemente positivo. Neste estudo também testaram o possível efeito sinérgico desse fucoidan com a dexametasona e os resultados mostraram indução da osteogênese de forma semelhante, independente da presença ou ausência de dexametasona (PARK *et al.*, 2012). Outra pesquisa avaliou a atividade osteogênica do fucoidan extraído de *Laminaria japônica* em CTMH derivadas da medula óssea alveolar, e entre as concentrações testadas, o maior efeito na indução da atividade da ALP foi observado com $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, obtendo-se uma redução da atividade quando se usaram concentrações de 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (KIM *et al.*, 2015). Diferentemente, nossos resultados apontam para uma maior atividade da ALP a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, confirmando que, além do PSs, a indução da atividade da ALP também depende do tipo de célula e das concentrações testadas, o que reforça a importância de se estudar cada PS para uma determinada aplicação.

É importante salientar que o extrato da *C. sertularioides* e a subfração Fuc 0.5 induziram de forma semelhante o aumento da atividade da ALP (Figura 7 e Figura 15). Tendo em vista que o fucoidan comercial é uma mistura complexa de PS que podem possuir efeitos farmacológicos distintos e que subfracionamento reduz a diversidade de PSs, podendo inclusive potencializar determinado efeito. Nesse sentido, pretendemos em trabalhos futuros, fracionar o extrato da *C. sertularioides*, com o objetivo de investigar se alguma subfração apresenta efeito osteogênico potencializado como o que encontramos para a subfração do fucoidan.

Além da atividade da ALP, outro ensaio comumente utilizado para estudar o potencial osteogênico de biomoléculas, biomateriais, nanopartículas, etc., é o ensaio de coloração da matriz mineralizada produzida pelas células. A mineralização da matriz extracelular é a última fase na formação óssea (KIM *et al.*, 2015) e nesse estudo foi avaliada por ensaios de coloração com vermelho de alizarina e von Kossa. Para tal, consideramos 21 dias de tratamento, duas concentrações (5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), com os extratos diluídos em meio basal e meio osteogênico. Ocorreu muita variação entre os ensaios, em que muitas vezes células cultivadas em poços vizinhos, sob o mesmo tratamento, exibiam comportamentos distintos. Neste ensaio, é visualizada a deposição de cálcio nas células tratadas com os extratos totais do fucoidan e da *C. sertularioides*, bem como com as subfrações do fucoidan, por meio das imagens das colorações histoquímicas, indicando que esses compostos possuem efeito na mineralização de matriz óssea (Figura 8 A e Figura 16 A). Entretanto, quando realizamos a quantificação do acúmulo do corante vermelho de alizarina, apenas a fração Fuc 0.9, quando diluída em meio basal a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou aumento significativo de 216% em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 16 C). Embora o método de quantificação do acúmulo de corante seja muito utilizado em artigos na área, neste trabalho o resultado da quantificação não representou o que foi observado nas imagens. Portanto, consideramos o resultado do ensaio de atividade da ALP mais fidedigno e, por isso, optamos por utilizar a fração Fuc 0.5 nos ensaios de qRT-PCR e CBMN.

No geral, os resultados da mineralização corroboram também os resultados obtidos no ensaio de atividade da ALP, onde concentrações diferentes têm efeitos distintos, não se observando uma relação diretamente proporcional entre a atividade da enzima e a concentração da amostra utilizada.

De acordo com os dados de coloração com vermelho de alizarina, o fucoidan de *U. pinnatifida* (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou de forma dependente da concentração as quantidades de hidroxiapatita nas células MG-63 (CHO *et al.*, 2009). Fucoidan extraído de *Ascophyllum nodosum* promoveu a mineralização (PEREIRA *et al.*, 2014). Um fucoidan comercializado pela Haewon Biotech, Inc. com peso molecular maior do que 30 kDa, induziu a mineralização em células-

tronco derivadas do tecido adiposo e células-tronco obtidas a partir do fluido amniótico (PARK *et al.*, 2012).

A propriedade de sintetizar matriz mineralizada é uma das principais funções dos osteoblastos maduros (CLARKE, 2008). Sendo assim, apesar da variação dos resultados, a presença de nódulos de mineralização após 21 dias (KIM *et al.*, 2013) comprova a diferenciação das CTMH-GW em osteoblastos funcionais. Esse efeito osteogênico das amostras extraídas das macroalgas marinhas indica que eles poderão ser usados para o desenvolvimento de terapias alternativas mais eficazes em problemas associados à regeneração óssea.

Com o propósito de confirmar o efeito indutor da osteogênese das amostras ricas em PSs, foram analisadas as expressões dos genes ALP, RUNX2 (Figura 9, Figura 10 e Figura 17), BMP2, e BGLAP (apêndice 3) por qRT-PCR. Para tanto, as CTMH-GW foram cultivadas sob diferentes condições para estudar alteração na expressão dos diferentes marcadores gênicos. Foram avaliados por meio deste ensaio o efeito osteogênico dos extratos totais do fucoidan, da *C. sertularioides* e da subfração Fuc 0.5, que apresentou maior efeito sobre a indução de atividade da ALP.

As BMPs fazem parte da superfamília dos fatores de crescimento TGF- β . As proteínas desta família participam no desenvolvimento neural, cardíaco, cartilaginoso e ósseo (CHEN *et al.*, 2004). A BMP2 está intimamente associada com a diferenciação de osteoblastos e foi mostrado que a proteína BMP2 recombinante estimula, por si só, a formação óssea *in vivo* e, em modelos *in vitro*, induz o aparecimento de fenótipo de osteoblasto (THIES *et al.*, 1992). Sendo o primeiro fator específico de osteoblasto identificado, o RUNX2 possui um importante papel na manutenção do fenótipo osteoblástico (LONG, 2001). A osteocalcina (BGLAP) possui papel na mineralização e está envolvida com o metabolismo do cálcio, apresentando expressão restrita à linhagem osteogênica (LECLERC *et al.*, 2005). De um modo geral, estes genes são considerados os marcadores osteogênicos canônicos (KASPERK C, WERGEDAL, J, STRONG, D, 1995).

Alguns estudos já avaliaram o efeito osteogênico do fucoidan na expressão dos genes marcadores osteogênicos. Em linhagens pré-

osteoblásticas (MG 63) a expressão do gene BMP-2 aumenta significativamente com a presença de fucoidan de *U. pinnatifida* e de forma dose dependente (CHO *et al.*, 2009). O efeito positivo de fucoidans no aumento da expressão de genes que são específicos do fenótipo de osteoblastos também já foi demonstrado para CTMH do tecido adiposo (PARK *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014) e da medula óssea alveolar (KIM *et al.*, 2015). Entretanto, nos nossos experimentos tivemos dificuldades para demonstrar esse efeito indutor, uma vez que não conseguimos reprodutibilidade entre os ensaios. As células utilizadas neste estudo são periferais, menos comprometidas com a linhagem osteogênica e possivelmente serão necessárias otimizações nos tempos de exposição, ou seja, fazer uma varredura mais detalhada para ver a diferença de expressão dos genes. Uma vez que o aumento da atividade da enzima ALP e da mineralização foram detectadas, seria de esperar alterações na expressão dos genes. Apesar disso, podemos observar uma tendência do extrato da alga *C. sertularioides* em aumentar a expressão do gene ALP em relação ao controle positivo (Figura 10). Entretanto, a heterogeneidade já descrita para as CTMH-GW (KMIECIK *et al.*, 2015) pode ter contribuído para a não reprodutibilidade entre os ensaios, não sendo possível confirmar essa tendência. Assim, por não ter sido visualizado aumento significativo nos ensaios de 3 e 5 dias e por não haver reprodutibilidade nos resultados do ensaio realizado com 10 dias, será necessária uma otimização dos tempos e concentrações de amostra usadas para avaliar a expressão de outros marcadores.

Mesmo com o grande potencial dos PSs para aplicações biomédicas, a genotoxicidade deve ser estudada para assegurar que o composto não acarreta riscos para a saúde. Sendo assim, o potencial genotóxico dos PSs foi investigado pelo ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocineses (CBMN) que é um método confiável para a detecção e quantificação de dano no DNA e instabilidade cromossômica. Foi inicialmente desenvolvido para analisar culturas de linfócitos do sangue periférico por Fenech e colaboradores, e, entretanto, sofreu adaptações para ser aplicado em diversos tipos celulares (THOMAS; FENECH, 2011). O CBMN consiste em analisar de alterações nucleares em células binucleadas que foram impedidas de completar a citocinese pelo uso de citocalasina B (cyt-B), permitindo a acumulação de células no estado binucleado. Dentre as alterações nucleares que o ensaio de CBMN pode avaliar encontram-

se o micronúcleo propriamente dito, as pontes nucleoplasmáticas e os brotos nucleares (THOMAS; FENECH, 2011). Esse método permite a avaliação do potencial genotóxico de micronutrientes revelando o potencial carcinogênico ou protetor de certos compostos ingeridos na dieta (BULL *et al.*, 2011, 2012). Nesse sentido, o CBMN também pode ser utilizado para avaliar a genotoxicidade de PSs e, de fato, já existem alguns trabalhos comprovando a segurança de alguns tipos de PSs de algas, principalmente de fucoidans (ALMEIDA-LIMA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010b; SONG *et al.*, 2012); outros estudos apontam, inclusive para um efeito antígenotóxico do fucoidan (LEITE-SILVA *et al.*, 2007; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2013).

Apesar de existirem trabalhos que avaliam o efeito genotóxico de determinados tipos de fucoidans, o lote utilizado nessa pesquisa, bem como as subfrações obtidas por precipitação com acetona, podem apresentar efeito distinto daqueles já descritos. Adicionalmente, até onde temos conhecimento, não existem relatos sobre o potencial genotóxico do extrato rico em PSs extraído da alga verde *C. sertularioides*. Uma vez que é de suma importância conhecer o potencial genotóxico dos compostos antes da liberação de seu uso em aplicações farmacológicas, este trabalho se propôs a avaliar a genotoxicidade do fucoidan e da subfração Fuc 0.5, bem como do extrato total da alga verde *C. sertularioides*. Utilizamos para este fim, células CHO-K1 que já são estabelecidas para esse tipo de teste, e verificamos que o extrato total da *C. sertularioides* não exerce nenhum efeito genotóxico significativo nas concentrações de 5 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ressaltando que a concentração 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi selecionada por ter sido a menor concentração que apresentou efeito sobre a proliferação celular (nas CTMH-GW) e a de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que mostrou maior efeito osteogênico. Mesmo não apresentando qualquer efeito no teste executado e por já existirem relatos na literatura do possível efeito protetivo dos PSs contra agentes genotóxicos, seria pertinente realizar ensaios futuros que avaliem se o extrato de *C. sertularioides* possui essa característica, uma vez que parece haver uma tendência de menor presença de alterações nucleares no tratamento com 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 12).

Apesar do indicativo de atividade osteogênica que tanto as subfrações Fuc 0.5 e Fuc 0.9 do fucoidan, como o extrato total da *C. sertularioides* apresentaram, ocorreram muitas variações nos diversos experimentos

realizados. Essa variação observada nos ensaios pode ser multifatorial. Tanto as CTMH-GW quanto os PSs apresentam características vantajosas que os tornam ferramentas promissoras para aplicações na medicina regenerativa. Todavia, muitos aspectos dos mecanismos pelos quais as CTMH-GW promovem a regeneração óssea não são conhecidos. Da mesma forma, muitas particularidades do modo como os PSs interagem com as células, executando suas bioatividades, estão ainda por elucidar, o que dificulta a translação para a aplicação clínica para ambos.

Vários estudos clínicos em seres humanos já demonstram o efeito benéfico das CTMH de medula óssea sobre reparo ósseo. E a capacidade osteogênica dessas células já está bem descrita. Outros reportes mostram as CTMH extraídas do tecido adiposo como fonte propícia para aplicações em regeneração óssea (HSIEH *et al.*, 2010; COLNOT, 2011; PARK *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014). As pesquisas a respeito das CTMH do cordão umbilical ainda são controvérsias em relação à capacidade dessas células se diferenciarem em osteoblastos. Alguns estudos apontam-nas como uma boa fonte celular, não só devido a facilidade de obtenção, taxa de proliferação elevada e por não envolver questões éticas (DING *et al.*, 2015), como também por se diferenciarem em osteoblastos de forma eficaz (MENNAN *et al.*, 2013). Entretanto, estudos que comparam a capacidade de diferenciação osteogênica de diferentes fontes de células-tronco apontam que outros tipos celulares são mais propensos a se diferenciarem em osteoblastos, como as células-tronco da medula óssea (HSIEH *et al.*, 2010) e células-tronco do ligamento periodontal (YU *et al.*, 2013). Outro estudo realizado com células-tronco de diferentes partes do cordão umbilical mostra que as CTMH-GW foram as precursoras menos eficazes (ISHIGE *et al.*, 2009). Bosch e colaboradores não conseguiram diferenciar as células do cordão em osteoblastos, sugerindo que essas não possuem as características de células-tronco (BOSCH *et al.*, 2012). Nossos resultados juntamente com essas outras pesquisas evidenciam que muitos aspectos do metabolismo, bem como processo de diferenciação dessas células, ainda permanecem desconhecidos o que pode explicar, em parte, os resultados conflitantes publicados. Desse modo, conhecer melhor o processo de diferenciação nessas células pode ajudar a desenvolver um método

mais adequado que possibilite explorar apropriadamente o potencial terapêutico das CTMH-GW.

Além das variações de comportamento relativas às CTMH-GW, os PSs utilizados neste estudo também são passíveis de sofrer modificações em suas bioatividade em consequência de muitos fatores, como a sazonalidade e o método de extração (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003). Os extratos utilizados nesse estudo são, na verdade, uma mistura de moléculas complexas com pesos moleculares, composições químicas e graus de sulfatação distintos, inclusive as subfrações obtidas a partir da precipitação do fucoidan. Fletcher *et al.* (2017) salientam que para se estudar alguma bioatividade deve-se considerar todas essas possíveis variações, selecionando aquelas que melhor se adaptam a atividade desejada. Nesse sentido, levando-se em consideração que o período e as condições de coleta, bem como o método de extração dos PSs utilizados nesse estudo não foram controlados para favorecer a atividade osteogênica, faz-se necessário mais ensaios para se determinar o real potencial osteogênico dos PSs em questão.

Oliveira (2015) realizou o estudo da composição química do extrato e das subfrações do fucoidan, onde é possível constatar a taxa de sulfatação (sulfato/açúcar) das amostras em que as diferentes subfrações possuem efeitos farmacológicos distintos. Constatou-se que a o extrato total possui a maior taxa sulfato/açúcar (0,45), seguido da subfração Fuc 1.1 (0,34), Fuc 2.0 (0,32), Fuc 0.5 (0,27) e Fuc 0.9 (0,26) (OLIVEIRA, 2015). Alguns autores apontam que o efeito osteogênico de uma molécula pode estar relacionado com maior grau de sulfatação (WANG, J. *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013), desse modo, o efeito osteogênico encontrado para a subfração Fuc 0.5 estaria em desacordo com o que existe na literatura. Entretanto, a relação entre a estrutura e as atividades biológicas dos PSs de algas marinhas ainda não está claramente estabelecida (BILAN, USOV, 2008), muitos outros fatores podem estar associados ao efeito osteogênico encontrado para a subfração Fuc 0.5, nomeadamente, peso molecular, configurações dos grupos sulfato, como também a presença de contaminantes fenólicos. Por outro lado, Costa e colaboradores (2010) encontraram uma taxa alta de sulfatação (sulfato/açúcar) para o extrato da C.

sertularioides (1,11), o que pode estar relacionado com o forte efeito osteogênico encontrado para esse extrato.

6 CONCLUSÃO

O extrato total da *C. sertularioides* e a subfração Fuc 0.5 do fucoidan exibiram maior aumento na indução da atividade da ALP. A subfração Fuc 0.9 induziu maior formação de matriz mineralizada.

Pela primeira vez foi demonstrado a atividade osteogênica de um extrato rico em PSs extraído da *C. sertularioides*, bem como a avaliação do seu potencial genotóxico. Evidenciou-se que o extrato do *C. sertularioides* não induz aumento de micronúcleos, de brotos ou pontes nucleoplasmáticas, o que sugere a segurança do seu uso em aplicações biomédicas. Desse modo, esses extratos apresentam-se como uma alternativa conveniente para aplicações clínicas dado que além de possuírem características osteogênicas, possivelmente não são genotóxicos. No entanto, estes resultados terão que ser complementados com mais estudos para que estes compostos possam ser aplicados clinicamente.

Este trabalho contribui para o conhecimento das atividades biológicas dos PSs e de sua possível aplicação na engenharia tecidual. Os resultados também colaboram para um melhor conhecimento do comportamento das CTMH-GW na presença dos PSs. Em conjunto, os PS e as CTMH-GW estudados nesta pesquisa podem compor, futuramente, uma estratégia de terapia para a regeneração de tecidos ósseos.

7 REFERÊNCIAS

ABBOTT, S.; MACKAY, G.; DURDY, M.; SOLOMON, S.; ZYLBERBERG, C. Twenty years of the International Society for Cellular Therapies: The past, present and future of cellular therapy clinical development. **Cytotherapy**, v. 16, n. 4, p. S112–S119, 2014. International Society for Cellular Therapy. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.01.001>>. .

AIRES, G. M. A.; MEIRELES, J. R. C.; OLIVEIRA, P. C.; et al. Micronuclei as biomarkers for evaluating the risk of malignant transformation in the uterine cervix. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 1558–1564, 2011.

ALE, M. T.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 2106–2130, 2011.

ALMEIDA-LIMA, J.; COSTA, L. S.; SILVA, N. B.; et al. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 7, p. 708–715, 2010.

ALSAC, J. M.; DELBOSC, S.; ROUER, M.; et al. Fucoidan interferes with Porphyromonas gingivalis-induced aneurysm enlargement by decreasing neutrophil activation. **Journal of Vascular Surgery**, v. 57, n. 3, p. 796–805, 2013.

ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. Processing of degradable ulvan 3D porous structures for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101 A, n. 4, p. 998–1006, 2013.

ATALA, A.; BAUER, S. B.; SOKER, S.; YOO, J. J.; RETIK, A. B. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. **Lancet**, 2006.

ATASHRAZM, F.; LOWENTHAL, R. M.; WOODS, G. M.; HOLLOWAY, A. F.; DICKINSON, J. L. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. **Marine Drugs**, 1. Apr. 2015. MDPI AG.

AURICH, H.; SGODDA, M.; KALTWASSER, P.; et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. **Gut**, v. 58, n. August, p. 570–581, 2009.

AZUMA, K.; ISHIHARA, T.; NAKAMOTO, H.; et al. Effects of oral administration of fucoidan extracted from Cladosiphon okamuranus on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model. **Marine Drugs**, v. 10, n. 10, p. 2337–2348, 2012.

BARAHONA, T.; CHANDÍA, N. P.; ENCINAS, M. V.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E. A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 529–535, 2011.

BARROS, A. A. A.; ALVES, A.; NUNES, C.; et al. Carboxymethylation of ulvan and chitosan and their use as polymeric components of bone cements. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 11, p. 9086–9097, 2013. Acta Materialia Inc. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.036>>. .

BLANC, K. LE; TAMMIK, C.; ROSENDAHL, K.; ZETTERBERG, E.; RINGDÉN, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 10, p. 890–896, 2003.

BONASSI, S.; EL-ZEIN, R.; BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. , v. 26, n. 1, p. 93–100, 2011.

BOSCH, J.; HOUBEN, A. P.; RADKE, T. F.; et al. Distinct differentiation potential of “MSC” derived from cord blood and umbilical cord: are cord-derived cells true mesenchymal stromal cells? **Stem cells and development**, v. 21, n. 11, p. 1977–88, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087798>>. .

BULL, C. F.; BEETSTRA-HILL, S.; BENASSI-EVANS, B. J.; et al. Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 193–197, 2011.

BULL, C. F.; MAYRHOFER, G.; ZEEGERS, D.; et al. Folate deficiency is associated with the formation of complex nuclear anomalies in the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, n. 4, p. 311–323, 2012.

CAMPARD, D.; LYSY, P. A.; NAJIMI, M.; SOKAL, E. M. Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. **Gastroenterology**, v. 134, n. 3, p. 833–848, 2008.

CARDOSO, M. J.; COSTA, R. R.; MANO, J. F. Marine origin polysaccharides in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 1–27, 2016.

CARVALHO, V; GAMA, F.; M. Sulfated polysaccharides and nanotechnology. **Sulfated Polysaccharides**. p.265–308, 2015. Nova Science Publishers.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. R. Bone morphogenetic proteins. **Growth factors (Chur, Switzerland)**, v. 22, n. 4, p. 233–241, 2004.

CHENG, H.; LIU, X.; HUA, R.; et al. Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in treatment for sequelae of thoracolumbar spinal cord injury. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 253, 2014.

CHO, Y. S.; JUNG, W. K.; KIM, J. A.; CHOI, I. W.; KIM, S. K. Beneficial effects of fucoidan on osteoblastic MG-63 cell differentiation. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 990–994, 2009.

CHOLLET, L.; SABOURAL, P.; CHAUVIERRE, C.; et al. Fucoidans in Nanomedicine. **Marine Drugs**, v. 14, n. 8, p. 145, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/14/8/145>>. .

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CERESO, A S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 2503–2529, 2010.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 3 Suppl 3, p. 131–139, 2008.

COLNOT, C. Cell Sources for Bone Tissue Engineering: Insights from Basic Science. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 17, n. 6, p. 449–457, 2011.

CONCETINO, A. D. L.; FUJII, M. T.; REIS, T. N.; et al. Diversity and distribution Patterns of the infralittoral green macroalgae from Potiguar basin , Rio Grande do Norte , Northeastern Brazil. , v. 24, n. 4, p. 986–996, 2010.

CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F.; LANGE CONSIGLIO, A. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. **Reproduction**, v. 145, n. 4, p. 391–400, 2013.

COSTA, L. S. **Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha Gracilaria caudata**, 2008.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 21–28, 2010.

CUMASHI, A.; USHAKOVA, N. A.; PREOBRAZHENSKAYA, M. E.; et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541–552, 2007.

CUNHA, L.; GRENHA, A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. **Marine Drugs**, 1. Mar. 2016. MDPI AG.

DASH, M.; SAMAL, S. K.; BARTOLI, C.; et al. Biofunctionalization of ulvan scaffolds for bone tissue engineering. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 5, p. 3211–8, 2014.

DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D. DE; et al. A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v. 108, n. 2, p. 143–153, 1995.

DING, D.-C.; CHANG, Y.-H.; SHYU, W.-C.; LIN, S.-Z. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. **Cell transplantation**, v. 24, n. 3, p. 339–47, 2015.

DING, D. C.; SHYU, W. C.; CHIANG, M. F.; et al. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of β 1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. **Neurobiology of Disease**, v. 27, n. 3, p. 339–353, 2007.

DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>>..

DUARTE, D. M.; CORNÉLIO, D. A; CORADO, C.; et al. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. **Regenerative Medicine**, v. 7, n. 2, p. 147–

157, 2012.

FANGANIELLO, R. D.; ISHIY, F. A. A.; KOBAYASHI, G. S.; et al. Increased in vitro osteopotential in SHED associated with higher IGF2 expression when compared with hASCs. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 11, n. 4, p. 635–644, 2015.

FAREED, J.; HOPPENSTEADT, D. A.; BICK, R. L. An update on heparins at the beginning of the new millennium. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 26 Suppl 1, p. 5–21, 2000.

FERNANDEZ-MOURE, J. S.; CORRADETTI, B.; CHAN, P.; et al. Enhanced osteogenic potential of mesenchymal stem cells from cortical bone: a comparative analysis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 203, 2015. Stem Cell Research & Therapy. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/6/1/203>>. .

FITTON, J. H.; STRINGER, D. N.; KARPINIEC, S. S. Therapies from fucoidan: An update. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5920–5946, 2015.

FLETCHER, H. R.; BILLER, P.; ROSS, A. B.; ADAMS, J. M. M. The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. **Algal Research**, v. 22, p. 79–86, 2017. The Authors. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926416305604>>. .

FU, X.; YANG, H.; ZHANG, H.; et al. Improved osteogenesis and upregulated immunogenicity in human placenta-derived mesenchymal stem cells primed with osteogenic induction medium. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 138, 2016. Stem Cell Research & Therapy. Disponível em: <<http://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-016-0400-6>>. .

GAMAL-ELDEEN, A. M.; ABO-ZEID, M. A. M.; AHMED, E. F. Anti-genotoxic effect of the *Sargassum dentifolium* extracts: Prevention of chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA fragmentation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1–2, p. 27–34, 2013. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2011.05.005>>. .

GAYATHRI, B.; KALYANI, R.; HEMALATHA, A; VASAVI, B. Significance of micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. **J Cytol**, v. 29, n. 4, p. 236–240, 2012.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P. K.; et al. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 23, p. 3151–3157, 2004.

GIRAUX, J. L.; MATOU, S.; BROS, A.; et al. Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. **European journal of cell biology**, v. 77, n. 4, p. 352–9, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933598800940>>. .

GONZALEZ, M.; BERNAD, A. Characteristics of adult stem cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 741, p. 103–120, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22457106>. .

GRAYSON, W. L.; BUNNELL, B. A.; MARTIN, E.; et al. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 11, n. 3, p. 140–150, 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.234>>. .

GRECO, S. J.; LIU, K.; RAMESHWAR, P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. **Stem cells**, v. 25, n. 12, p. 3143–3154, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761754>>. .

GREENWOOD, H.; THORSTEINSDÓTTIR, H. Regenerative medicine: new opportunities for developing countries. **International journal of ...**, v. 8, p. 60–77, 2006.

GUTIERREZ-AGUIRRE, C. H.; GOMEZ-DE-LEON, A.; ALATORRE-RICARDO, J.; et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning in an outpatient setting in ABO-incompatible patients: are survival and graft-versus-host disease different? **Transfusion**, v. 54, n. 5, p. 1269–1277, 2014.

HAN, Y. S.; LEE, J. H.; JUNG, J. S.; et al. Fucoidan protects mesenchymal stem cells against oxidative stress and enhances vascular regeneration in a murine hindlimb ischemia model. **International Journal of Cardiology**, v. 198, p. 187–195, 2015. Elsevier Ireland Ltd.

HAYASHI, K.; LEE, J. B.; NAKANO, T.; HAYASHI, T. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 4, p. 302–309, 2013.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Experimental Cell Research**, Aug. 2010.

HSIEH, J.; FU, Y.; CHANG, S.; TSUANG, Y.; WANG, H. Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Wharton ' s Jelly of Umbilical Cord. , v. 19, n. 12, 2010.

HU, S.-L.; LUO, H.-S.; LI, J.-T.; et al. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Critical care medicine**, v. 38, n. 11, p. 2181–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711072>>. .

HWANG, P.-A.; YAN, M.-D.; LIN, H.-T.; LI, K.-L.; LIN, Y.-C. Toxicological Evaluation of Low Molecular Weight Fucoidan in Vitro and in Vivo. **Marine Drugs**, v. 14, n. 7, p. 121, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/14/7/121>>. .

ISHIGE, I.; NAGAMURA-INOUE, T.; HONDA, M. J.; et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. **International Journal of Hematology**, v. 90, n. 2, p. 261–269, 2009.

JESUS RAPOSO, M. F. DE J. DE; MORAIS, A. M. B. DE; MORAIS, R. M. S. C. DE. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications.

Marine Drugs, v. 13, n. 5, p. 2967–3028, 2015.

JIN, H. J.; BAE, Y. K.; KIM, M.; et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 17986–18001, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms140917986>>. .

JIN, J. O.; ZHANG, W.; DU, J. Y.; et al. Fucoidan can function as an adjuvant in vivo to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2014.

KANG, Y. J. Regenerative Medicine Research: striving to better serve the emerging field. **Regenerative medicine research**, v. 4, n. 2008, p. E1, 2016.

KAR, S.; SHARMA, G.; DAS, P. K. Fucoidan cures infection with both antimony-susceptible and-resistant strains of *Leishmania donovani* through Th1 response and macrophage-derived oxidants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 618–625, 2011.

KASPERK C, WERGEDAL, J, STRONG, D, F. J. O. N. Human Skeletal Bone Cell Phenotypes Site of Origin*. , , n. January, 1995.

KEMP, P. History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards. **Regenerative medicine**, 2006.

KIM, B. S.; KANG, H.-J.; PARK, J.-Y.; LEE, J. Fucoidan promotes osteoblast differentiation via JNK- and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells. **Experimental & molecular medicine**, v. 47, n. 1, p. e128, 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4314586&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. .

KIM, K. J.; LEE, O. H.; LEE, B. Y. Fucoidan, a sulfated polysaccharide, inhibits adipogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in 3T3-L1 preadipocytes. **Life Sciences**, v. 86, n. 21–22, p. 791–797, 2010a. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.03.010>>. .

KIM, K. J.; LEE, O. H.; LEE, B. Y. Genotoxicity studies on fucoidan from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 1101–1104, 2010b. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.032>>. .

KIM, T. H.; LEE, E. K.; LEE, M. J.; KIM, J. H.; YANG, W. S. Fucoidan inhibits activation and receptor binding of transforming growth factor- β 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 432, n. 1, p. 163–168, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.055>>. .

KMIECIK, G.; SPOLDI, V.; SILINI, A.; PAROLINI, O. Current View on Osteogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Tissues. **Stem Cell Rev**, v. 11, p. 570–585, 2015.

KONG, D.; ZHUANG, X.; WANG, D.; et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transfusion ameliorated hyperglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinical Laboratory**, v. 60, n. 12, p. 1969–1976, 2014. Verlag Klinisches Labor GmbH.

KWAK, J. Y. Fucoïdan as a marine anticancer agent in preclinical development. **Marine Drugs**, Feb. 2014.

KYLIN, H. Zur biochemie der Meersalgen. **Physiological Chemistry**, v. 83, p. 171–197, 1913.

LAURIENZO, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview. **Marine Drugs**, v. 8, n. 9, p. 2435–2465, 2010.

LECLERC, N.; NOH, T.; KHOKHAR, A.; SMITH, E.; FRENKEL, B. Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 3, p. 929–939, 2005.

LEE, J. S.; JIN, G. H.; YEO, M. G.; et al. Fabrication of electrospun biocomposites comprising polycaprolactone/ fucoidan for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 181–188, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.012>>. .

LEHNHARDT PIRES, C.; RODRIGUES, S. D.; BRISTOT, D.; et al. Evaluation of macroalgae sulfated polysaccharides on the Leishmania (L.) amazonensis promastigote. **Marine Drugs**, 2013.

LEITE-SILVA, C.; GUSMÃO, C. L. S.; TAKAHASHI, C. S. Genotoxic and antigenotoxic effects of Fucus vesiculosus extract on cultured human lymphocytes using the chromosome aberration and Comet assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 105–111, 2007.

LI, Z. Y.; WANG, C. Q.; LU, G.; PAN, X. Y.; XU, K. L. Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Hematopoietic Recovery and Acute Graft-Versus-Host Disease in Murine Allogeneic Umbilical Cord Blood Transplantation Model. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 70, n. 1, p. 115–122, 2014. Humana Press Inc.

LIANG, J.; WU, S.; ZHAO, H.; et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 532, n. 1, p. 59–63, 2013.

LONG, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 27, p. 677–690, 2001.

MA, Y.; HAO, X.; ZHANG, S.; ZHANG, J. The in vitro and in vivo effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 2, p. 473–485, 2012.

MAEDA, R.; IDA, T.; IHARA, H.; SAKAMOTO, T. Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from Caulerpa lentillifera on Macrophage Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 3, p. 501–505, 2012.

MAGALHÃES, K. D.; COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P. Anticoagulant , Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed Dictyopteris delicatula. , , n. May, p. 3352–3365, 2011.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from Gracilaria species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 329–333, 2003.

MARINHO-SORIANO, E.; FONSECA, P. C.; CARNEIRO, M. A. A.; MOREIRA, W. S. C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2402–2406, 2006.

MARQUES, J.; VILANOVA, E.; MOURÃO, P. A. S.; FERNÁNDEZBUSQUETS, X. Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by Plasmodium. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–14, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep24368>>. .

MASON, C.; DUNNILL, P.; SCHROOTEN, J.; et al. A brief definition of regenerative medicine. **Regenerative medicine**, 2008.

MCNEELY, W. H. Fucoidan. **Academic Press**, p. 117–125, 1959.

MEN, X. Y.; XU, W. G.; ZHU, X.; MA, W. C. [Extraction, selenium-nanoparticle preparation and anti-virus bioactivity determination of polysaccharides from *Caulerpa taxifolia*]. **Zhong Yao Cai**, 2009.

MENNAN, C.; WRIGHT, K.; BHATTACHARJEE, A.; et al. Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Different Regions of the Human Umbilical Cord. , v. 2013, 2013.

MENON, S.; SHAIENDRA, S.; RENDA, A.; LONGAKER, M.; QUARTO, N. An overview of direct somatic reprogramming: The ins and outs of iPSCs. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016. MDPI AG.

MERCERON, C.; PORTRON, S.; VIGNES-COLOMBEIX, C.; et al. Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: Potential application to cartilage regenerative medicine. **Stem Cells**, v. 30, n. 3, p. 471–480, 2012.

MIGUEL, M. P. DE; FUENTES-JULIAN, S.; BLAZQUEZ-MARTINEZ, A.; et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 5, p. 574–591, 2012.

NAGAMURA-INOUE, T.; HE, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 2, p. 195–202, 2014. Baishideng Publishing Group Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24772246>%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3999777>. .

NGO, D. H.; KIM, S. K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 70–75, 2013. Elsevier B.V.

OHTA, Y.; LEE, J.-B.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 5, p. 892–898, 2009.

OLIVEIRA, R. M. DE. **Avaliação das atividades farmacológicas de Fucoidans obtidos do extrato bruto de Fuciudan comercial de *Fucus vesiculosus***, 2015.

ORIMO, H.; SHIMADA, T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in

the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 315, n. 1–2, p. 51–60, 2008.

PARK, S.; LEE, K. W.; LIM, D.-S.; LEE, S. The Sulfated Polysaccharide Fucoidan Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 12, p. 2204–2211, 2012.

PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. **British Phycological Journal**, v. 14, n. 2, p. 103–117, 1979.

PEREIRA, J.; PORTRON, S.; DIZIER, B.; et al. The in vitro and in vivo effects of a low-molecular-weight fucoidan on the osteogenic capacity of human adipose-derived stromal cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 20, n. 1–2, p. 275–84, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059447>>. .

PUJOL, C. A.; RAY, S.; RAY, B.; DAMONTE, E. B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 412–416, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.028>>. .

PUVANESWARY, S.; RAGHAVENDRAN, H. B.; TALEBIAN, S.; et al. Incorporation of Fucoidan in β -Tricalcium phosphate-Chitosan scaffold prompts the differentiation of human bone marrow stromal cells into osteogenic lineage. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 24202, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep24202>>. .

QIAO, S. K.; REN, H. Y.; SHI, Y. J.; LIU, W. Allogeneic compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation increases survival of mice exposed to lethal total body irradiation: A potential immunological mechanism. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n. 3, p. 475–482, 2014.

QU, Z.; GUO, L.; FANG, G.; et al. Biological characteristics and effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) grafting with blood plasma on bone regeneration in rats. **Cell Biochem Biophys**, v. 63, n. 2, p. 171–181, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528865>>. .

RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; et al. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research**, v. 63, n. 7, p. 569–580, 2014.

RICHARDSON, S. M.; KALAMEGAM, G.; PUSHPARAJ, P. N.; et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. **Methods**, v. 99, p. 69–80, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.015>>. .

RIEKSTINA, U.; MUCENIECE, R.; ČAKSTINA, I.; MUIZNIEKS, I.; ANCANS, J. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. **Cytotechnology**, v. 58, n. 3, p. 153–162, 2008.

ROCHA, H. A.; LEITE, E. L.; MEDEIROS, V. P.; et al. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In *Carbohydrate Structure and Biological*

Function. In: 1st (Ed.); **Insights into carbohydrate structure and biological function**. p.51–67, 2006. Transworld Research Network.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. D. S. O.; SILVA, L. M. C. M.; et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 2, p. 282–292, 2012. Elsevier. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70766-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70766-1)>. .

SABOKBAR, A.; MILLETT, P. J.; MYER, B.; RUSHTON, N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. **Bone and mineral**, v. 27, n. 1, p. 57–67, 1994.

SALEHINEJAD, P.; ALITHEEN, N. B.; ALI, A. M.; et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 48, n. 2, p. 75–83, 2012.

SCHIENER, P.; BLACK, K. D.; STANLEY, M. S.; GREEN, D. H. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 1, p. 363–373, 2014.

SCHNEIDER, T.; EHRIG, K.; LIEWERT, I.; ALBAN, S. Interference with the CXCL12/CXCR4 axis as potential antitumor strategy: Superiority of a sulfated galactofucan from the brown alga *Saccharina latissima* and Fucoidan over heparins. **Glycobiology**, v. 25, n. 8, p. 818–824, 2015.

SENNI, K.; PEREIRA, J.; GUENICHE, F.; et al. Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. **Marine Drugs**, v. 9, n. 9, p. 1664–1681, 2011.

SHAO, J.; ZHANG, W.; YANG, T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. **Biological Research**, v. 48, p. 1–7, 2015. BioMed Central.

SILVA, T. H.; ALVES, A.; POPA, E. G.; et al. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 278–289, 2012.

SITHRANGA BOOPATHY, N.; KATHIRESAN, K. Anticancer drugs from marine flora: An overview. **Journal of Oncology**, 2010.

SKRIPTSOVA, A. V. Seasonal variations in the fucoidan content of brown algae from Peter the Great Bay, Sea of Japan. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 42, n. 4, p. 351–356, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1134/S1063074016040106%5Cnhttp://link.springer.com/content/pdf/10.1134%2FS1063074016040106.pdf>>. .

SLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016. Public Library of Science.

SOMMERFELDT, D.; RUBIN, C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **European Spine Journal**, v. 10, n. SUPPL. 2, 2001.

SONG, M. Y.; KU, S. K.; HAN, J. S. Genotoxicity testing of low molecular weight fucoidan from brown seaweeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3–4, p. 790–796, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.010>>. .

SYNYTSYA, A.; BLEHA, R.; SYNYTSYA, A.; et al. Mekabu fucoidan: Structural complexity and defensive effects against avian influenza A viruses. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 633–644, 2014. Elsevier Ltd.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TAVARES, J. C. M.; CORNÉLIO, D. A.; SILVA, N. B. DA; et al. Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. **Toxicology**, v. 262, n. 2, p. 138–145, 2009.

THIES, R. S.; BAUDUY, M.; ASHTON, B. A.; et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. **Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 1318–1324, 1992.

THOMAS, P.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 682, p. 217–234, 2011.

TSAI, P.-J.; WANG, H.-S.; SHYR, Y.-M.; et al. Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of biomedical science**, v. 19, p. 47, 2012.

TUCH, B. E. Stem cells--a clinical update. **Australian family physician**, v. 35, n. 9, p. 719–721, 2006.

VO, T.-S.; NGO, D.-H.; KIM, S.-K. Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: an overview. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 11, n. 2, p. 90–101, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22280232>>. .

WALMSLEY, G. G.; RANSOM, R. C.; ZIELINS, E. R.; et al. Stem Cells in Bone Regeneration. **Stem Cell Reviews and Reports**, p. 1–6, 2016. Stem Cell Reviews and Reports. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12015-016-9665-5>>. .

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; SONG, H.; LI, P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 6–12, 2010.

WANG, L.; WANG, X.; WU, H.; LIU, R. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Marine Drugs**, 1. Sep. 2014. MDPI AG.

WANG, Y.; ZHAO, L.; HANTASH, B. M. Support of human adipose-derived mesenchymal stem cell multipotency by a poloxamer-octapeptide hybrid hydrogel. **Biomaterials**, v. 31, n. 19, p. 5122–5130, 2010.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential

health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 14–21, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>>. .

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 13–20, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.029>>. .

WU, K.-H.; CHAN, C.-K.; TSAI, C.; et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **Transplantation**, v. 91, n. 12, p. 1412–1416, 2011.

WU, Y.; CHEN, L.; SCOTT, P. G.; TREDGET, E. E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2648–2659, 2007.

XU, H.; WANG, J.; CHANG, Y.; et al. Fucoidan from the sea cucumber *Acaudina molpadioides* exhibits anti-adipogenic activity by modulating the Wnt/[small beta]-catenin pathway and down-regulating the SREBP-1c expression. **Food & Function**, v. 5, n. 7, p. 1547–1555, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C3FO60716J>>. .

YOUNG, A. T.; KANG, J. H.; KANG, D. J.; et al. Interaction of stem cells with nano hydroxyapatite-fucoidan bionanocomposites for bone tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, , n. November, 2016.

YU, S.; LONG, J.; YU, J.; et al. Analysis of differentiation potentials and gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from periodontal ligament and Wharton's Jelly of the umbilical cord. **Cells Tissues Organs**, v. 197, n. 3, p. 209–223, 2013.

YVONNE REINWALD, J. B. AND A. E. H. Pluripotent Stem Cells and Their Dynamic Niche, Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic. .

ZHANG, Z.; TERUYA, K.; YOSHIDA, T.; ETO, H.; SHIRAHATA, S. Fucoidan extract enhances the anti-cancer activity of chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. **Marine Drugs**, v. 11, n. 1, p. 81–98, 2013.

APÊNDICES

Apêndice 1. Artigo

Evaluation of the genotoxicity and osteogenic potential of seaweed sulfated polysaccharides

Sousa, A.F.G.¹, Chaves Filho, G. P.¹, Rocha, H. A. O.², Batistuzzo, S. R.¹, Moreira, S. M. G.¹

¹ Laboratory of Molecular and Genomic Biology, Department of Biology and Genetics, Center of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal / RN; ² Laboratory of Biotechnology of Natural Polymers, Department of Biochemistry, Center of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal / RN

1. INTRODUCTION

Bone has the ability to self-regenerate, however, factors such as age, severe fractures and diseases inhibit this ability leading to loss of function (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001; WALMSLEY *et al.*, 2016). Current techniques and treatments are either inadequate or inefficient. Thereby, tissue engineering and regenerative medicine intend to reestablish the structure and function of lost or damaged tissues using cells, including stem cells, materials and biomolecules (LANGER; VACANTI, 1993; SHAO *et al.*, 2015).

Accordingly, the sulfated polysaccharides (SPs) synthesized by marine organisms, such as macroalgae, shows great potential for biomedical applications due to its biocompatibility and biodegradability (LAURIENZO, 2010; JESUS RAPOSO, DE, *et al.*, 2015). SPs are found in varying amounts in three major seaweed groups: green algae (Chlorophyceae), brown algae (Phaeophyceae), and red algae (Rhodophyceae) (CUNHA; GRENHA, 2016). These molecules are analogous to mammalian glycosaminoglycans, but due to their marine origin, they are potentially safer for pharmacological applications compared to alternatives extracted from mammals (SILVA *et al.*, 2012; SENNI *et al.*, 2011). In particular, fucoidan, which is a class of polysaccharides rich in sulfated fucoses found in brown algae and echinoderms (FITTON *et al.*, 2015), has demonstrated many biological activities. Among them we highlight anticancer activity (ATASHRAZM *et al.*), immunomodulatory (ZHANG *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2014), antileishmania (KAR *et al.*, 2011), antiviral (HAYASHI *et al.*, 2013, SYNYTSYA *et al.*, 2014), anti-inflammatory (Alsac *et al.*, 2013), anticoagulant (POMIN, 2014) antimalarial (MARQUES *et al.*, 2016). More recently, the ability of Fucoidan to modulate the differentiation of stem cell have been also described (Pereira *et al.*, 2014; KWAK, 2014; HAN *et al.*, 2015). Thus, fucoidan stimulates the production of collagen, fibroblast growth factor-2 (FGF-2), and it induces the angiogenesis and fibroblast

Apêndice 2. MTT realizado com 25, 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato total e das subfrações do fucoidan

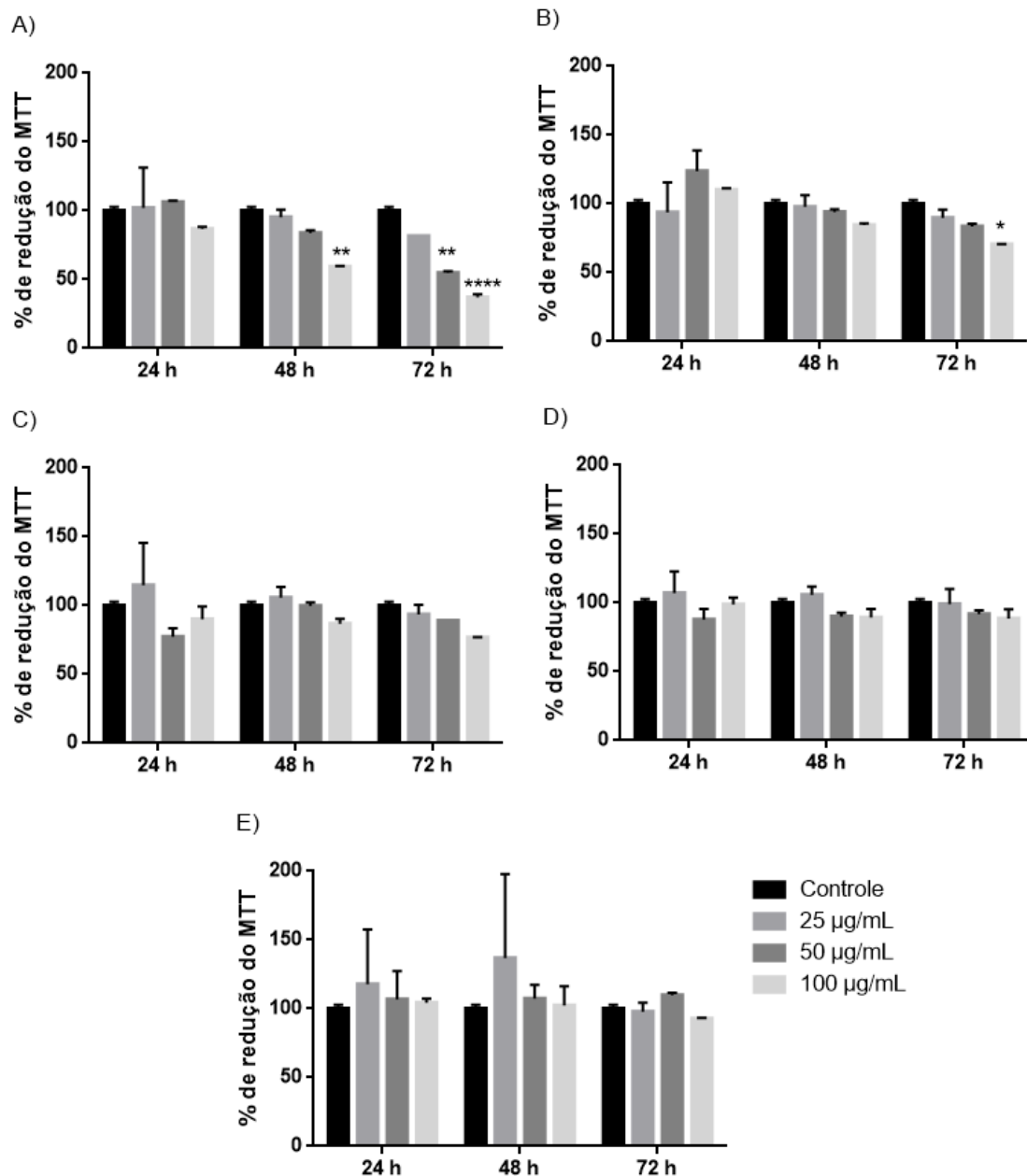


Figura 19. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) pelas CTMH-GW quando expostas ao extrato total do fucoidan e das suas subfrações. CTMH-GW foram expostas ao extrato total do fucoidan e das subfrações obtidas a partir de sua precipitação com acetona em diferentes concentrações (25-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24, 48 e 72 h. A) extrato total do fucoidan; B) Subfração Fuc 0.5, C) Subfração Fuc 0.9, D) Subfração Fuc 1.1 e E) Subfração Fuc 2.0. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ Estatisticamente significativa em relação ao controle negativo de acordo com o teste de Tukey.

Apêndice 3. Resultados do qRT-PCR dos genes BMP2 e BGLAP

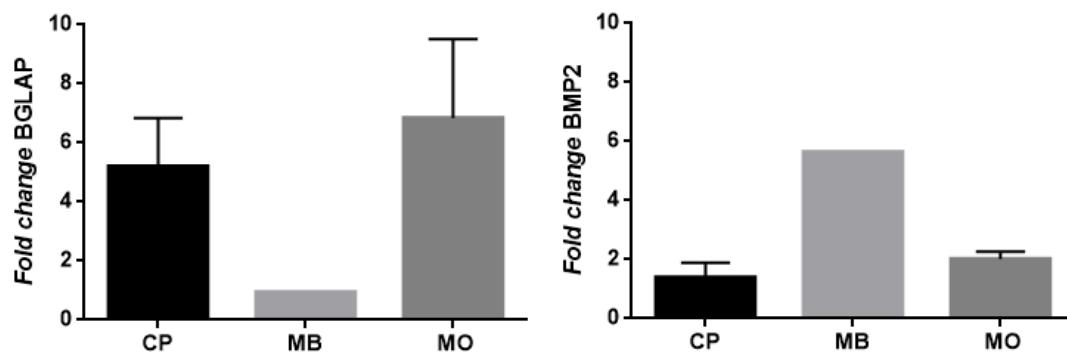


Figura 20. Análise da expressão dos genes BGLAP e BMP2 por qRT-PCR induzida pela subfração Fuc 0.5. CTMH-GW foram tratadas com a subfração Fuc 0.5 em meio osteogênico, por 10 dias. O *fold change* foi obtido por meio do cálculo $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o GAPDH para normalizar os resultados. CP: Controle positivo. MB: Células tratadas com meio basal e PSs na concentração indicada. MO: Células tratadas com meio osteogênico e PSs na concentração indicada.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da instabilidade genética e diferenciação de células tronco mesenquimais humanas

Pesquisador: Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 17613513.8.1001.5537

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 508.459

Data da Relatoria: 20/12/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto vinculado ao Departamento de Biologia Celular e Genética, que abrange trabalhos de monografia, mestrado, doutorado e pós doutorado. Constam como instituições coparticipantes o Instituto do Cérebro, a Fiocruz-BA, a PUC-RS, a UFSC e o HCFMHUSP. O projeto consiste em realizar análises genéticas durante a expansão e diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais humanas isoladas da veia e geleia de Wharton do cordão umbilical, na presença ou ausência de biomateriais. As coletas serão realizadas na Maternidade Escola Januário Cicco - MEJC. Para execução, a coleta do cordão umbilical de 30 parturientes será realizada logo após o parto, e serão isoladas células tronco dos cordões. As participantes da pesquisa deverão atender aos seguintes critérios de inclusão: (1) Apresentar histórico obstétrico normal e controles sorológicos rotineiros negativos feitos na mãe durante a gravidez; (2) Conceptos que não apresentem antecedentes médicos maternos ou paternos com algum risco de transmissão de enfermidade congênita infecciosa grave através do sangue do cordão umbilical; (3) Idade entre 18 e 36 anos, 11 meses e 29 dias (menos de 37 anos), ter feito no mínimo duas consultas de pré-natal documentadas, estar com idade gestacional acima de 35 semanas, no momento da coleta; (4) Não apresentem no histórico médico doenças neoplásicas (câncer) e/ou hematológicas; (5) Os

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.078-970

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

Fax: (84)3215-3135

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

Continuação do Parecer: 508.459

cordões umbilicais serão coletados de gestação normal e a termo.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivos primários: (1) Formar uma rede de análise de instabilidade genética em células-tronco mesenquimais dentro da Rede Nacional de Terapia Celular, visando à criação de um catálogo das alterações surgidas em decorrência da expansão in vitro, assim como investigar o significado destas alterações; (2) Analisar o perfil de diferenciação das células tronco mesenquimais humanas frente à diferentes biomateriais e nanomateriais; (3) Analisar o perfil genotóxico dos diferentes biomateriais e nanomateriais em células tronco mesenquimais humanas; (4) Compreender o mecanismo molecular de etapas iniciais da diferenciação osteogênica.

Os objetivos secundários da pesquisa são: a) Preparar um catálogo com as alterações citogenéticas encontradas após expansão in vitro das diferentes fontes de células-tronco usadas na RNTC; b) Verificar se a ocorrência de pontes nucleoplasmáticas é uma característica comum a todos os tipos de células-tronco; c) Determinar o destino das CTMH com pontes nucleoplasmáticas e o significado dessa alteração nuclear; d) superfícies de titânio por feixe de laser; e) Determinar a viabilidade das CTMH crescidas nas superfícies modificadas de titânio bem como na presença de nanohidroxiapatita, polissacarídeos sulfatados, polissacarídeos de algas marinhas e nanogéis de fucanas, via teste MTT, ensaio clonogênico e citometria de fluxo; f) Determinar o potencial de diferenciação osteogênica e antiadipogênica dos biomateriais estudados(superfície titânio tratada a laser, nanohidroxiapatitas, polissacarídeos sulfatados e nanogéis de fucanas; g) Determinar a instabilidade genética (via análise de micronúcleos, genes de reparo de DNA, estresse oxidativo) durante o processo de diferenciação osteoblástica na superfície modificada de titânio por feixe de laser e na presença de nanohidroxiapatita, polissacarídeos sulfatados e nanogéis de fucanas; h) Realizar o transcriptoma nas etapas iniciais da diferenciação osteoblástica; i) Identificar o secretoma das CTMH derivadas do cordão umbilical; j) Capacitar alunos de graduação e pós-graduação em técnicas de citogenética, biologia molecular envolvendo células-tronco mesenquimais humanas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com a metodologia proposta, a coleta do cordão umbilical será realizada logo após o parto. O corte do cordão é um procedimento padrão em todos os partos realizados e os riscos que podem ocorrer estão relacionados a incidentes que podem ocorrer no parto, e não às

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova **CEP:** 59.078-970
UF: RN **Município:** NATAL
Telefone: (84)3215-3135 **Fax:** (84)3215-3135 **E-mail:** cepufrn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 508.459

atividades desta pesquisa. O fragmento de cordão seccionado entre os pinçamentos, que seria descartado, é o que será coletado e utilizado na pesquisa. A responsável pela pesquisa menciona ainda que podem ser identificadas alterações genéticas nas células dos cordões doados, e essa informação consta no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. Nesse caso, o médico que realizou o parto da doadora do cordão será informado para entrar em contato com a família do recém nascido e solicitar amostra de sangue periférico para verificação. Em caso positivo, se houver interesse dos pais da criança, eles serão orientados a procurar um serviço de aconselhamento genético. Os benefícios superam os riscos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem fundamentada, a metodologia proposta permite atingir os objetivos pretendidos e os resultados da pesquisa podem contribuir para a melhoria das condições de saúde dos participantes da pesquisa, sobretudo se for constatada alguma alteração genética. Os resultados poderão ainda gerar novas tecnologias relacionadas ao cultivo e utilização de células tronco.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto está bem fundamentado e o cronograma está atualizado. As cartas de anuência das instituições coparticipantes foram apresentadas, bem como a carta de anuência da Maternidade Escola Januário Cicco, onde serão realizadas as coletas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado. Os demais documentos foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência foi atendida, bem como algumas recomendações e o protocolo em questão segue as recomendações éticas fundamentais.

Embora seja uma proposta de estudo de Genética Humana, o referido estudo não se insere nos itens de 1 a 1.6 da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde - CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova **CEP:** 59.078-970
UF: RN **Município:** NATAL
Telefone: (84)3215-3135 **Fax:** (84)3215-3135 **E-mail:** cepufrn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 508.459

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução 466/12 - do Conselho Nacional de Saúde - CNS e Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP é da responsabilidade do pesquisador responsável:

1. elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinatura estar na mesma folha (Res. 466/12 - CNS, item IV.5d);
2. desenvolver o projeto conforme o delineado (Res. 466/12 - CNS, item XI.2c);
3. apresentar ao CEP eventuais emendas ou extensões com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP, Brasília - 2007, p. 41);
4. descontinuar o estudo somente após análise e manifestação, por parte do Sistema CEP/CONEP/CNS/MS que o aprovou, das razões dessa descontinuidade, a não ser em casos de justificada urgência em benefício de seus participantes (Res. 446/12 - CNS, item III.2u) ;
5. elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais (Res. 446/12 - CNS, item XI.2d);
6. manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa (Res. 446/12 - CNS, item XI.2f);
7. encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto (Res. 446/12 - CNS, item XI.2g) e,
8. justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou não publicação dos resultados (Res. 446/12 - CNS, item XI.2h).

NATAL, 09 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Dulce Almeida
(Coordenador)

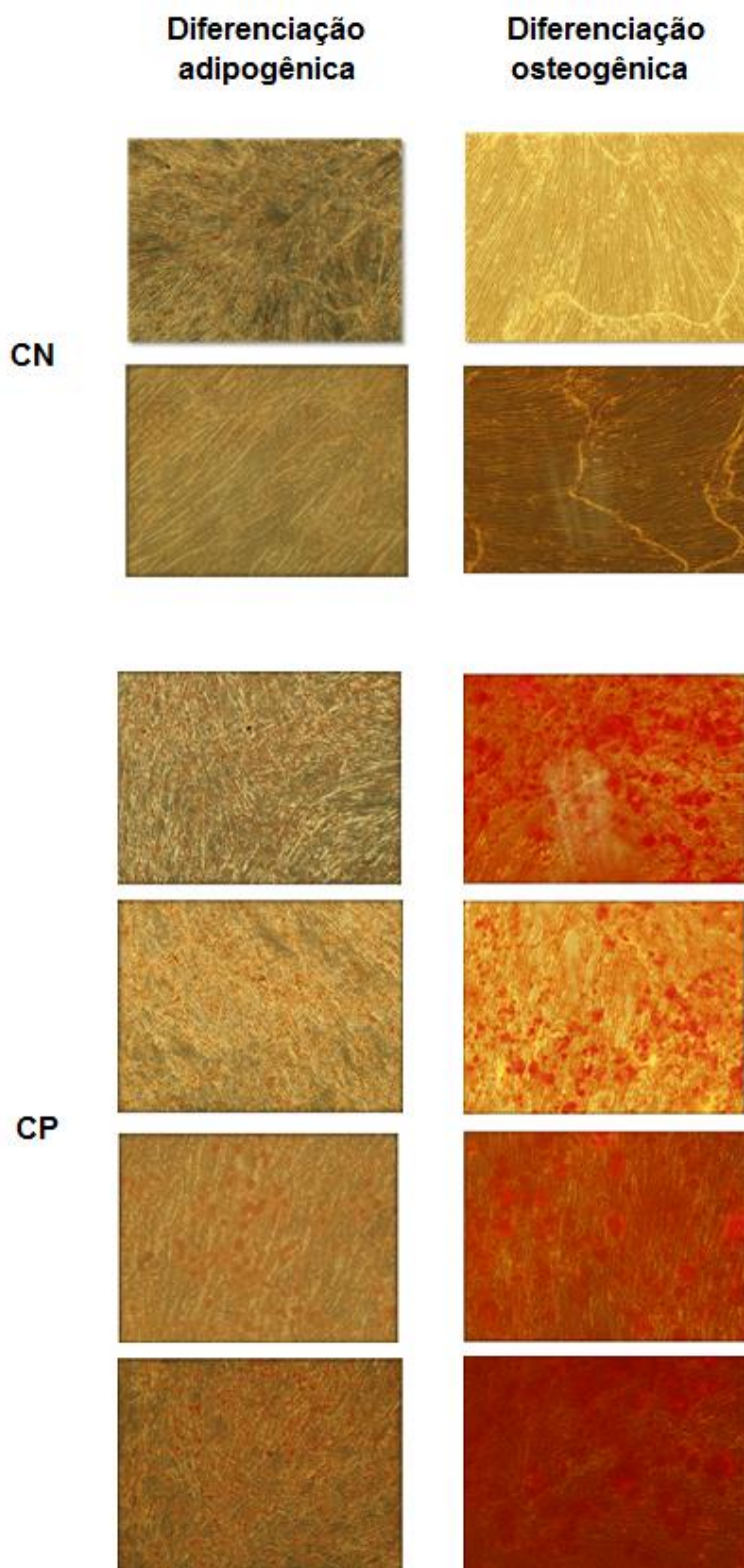
Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova **CEP:** 59.078-970
UF: RN **Município:** NATAL
Telefone: (84)3215-3135 **Fax:** (84)3215-3135 **E-mail:** cepufrn@reitoria.ufrn.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



Continuação do Parecer: 508.459

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000
Bairro: Lagoa Nova **CEP:** 59.078-970
UF: RN **Município:** NATAL
Telefone: (84)3215-3135 **Fax:** (84)3215-3135 **E-mail:** cepufrn@reitoria.ufrn.br

Anexo 2. Caracterização das CTMH-GW

Fotos: Jéssyca Fonseca

Figura 21. Caracterização das CTMH-GW por meio das diferenciações adipogênica e osteogênica. CN: controle negativo; CP: controle positivo. Ampliação 100X.

Anexo 3. Imunofenotipagem das CTMH-GW

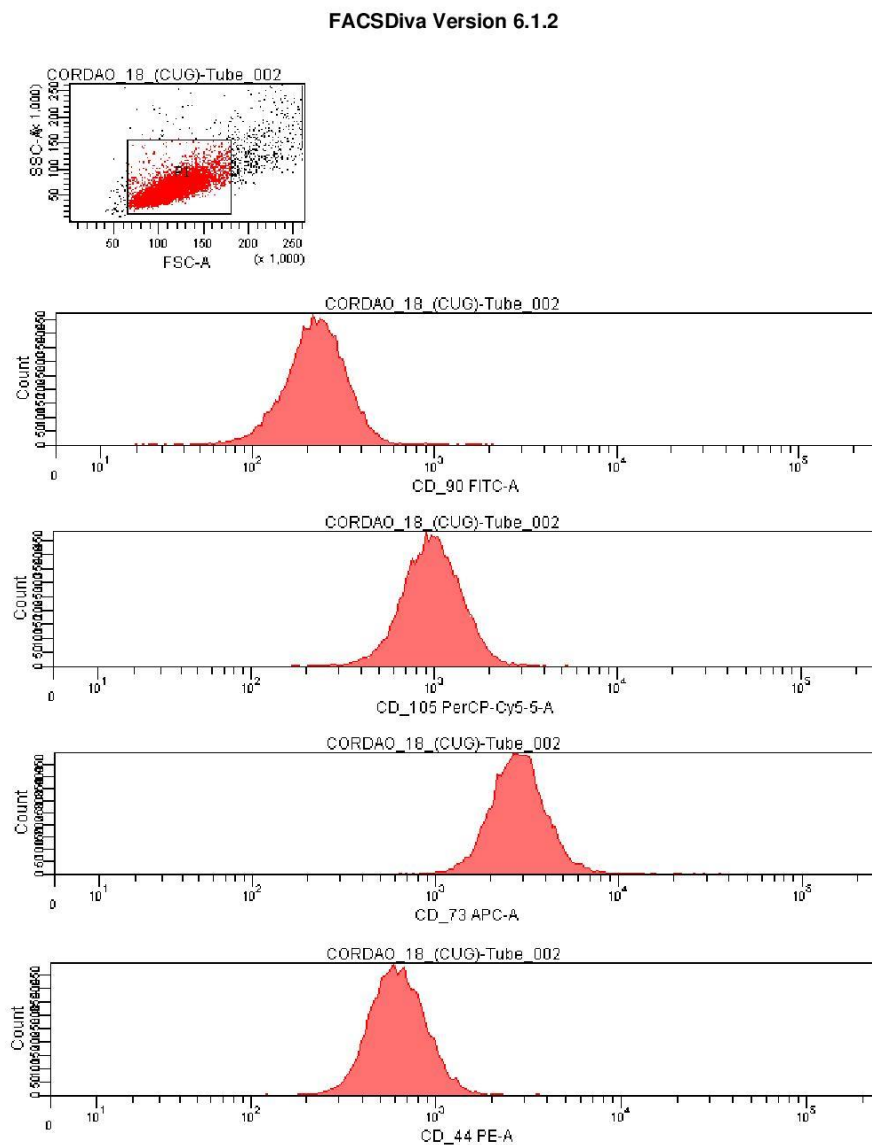


Foto: Jéssyca Fonseca

Figura 22. Imunofenotipagem das CTMH-GW sem os marcadores.

FACSDiva Version 6.1.2

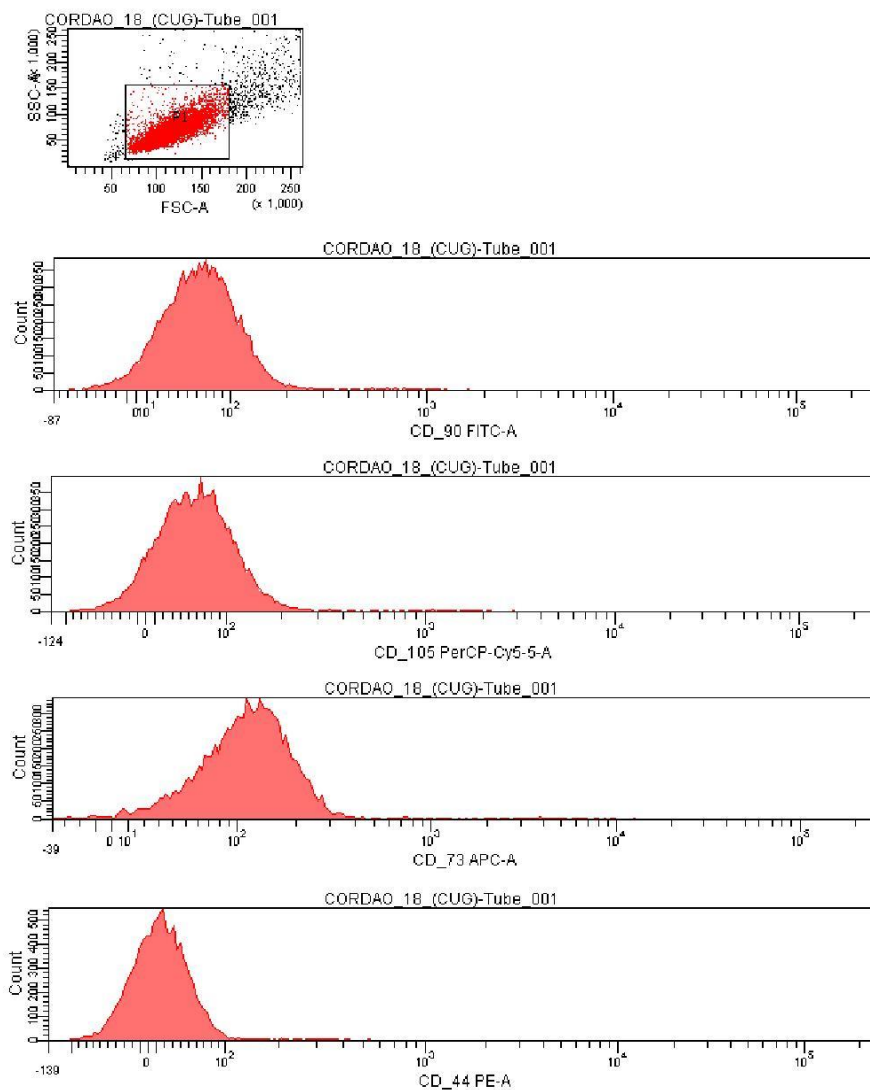


Foto: Jéssyca Fonseca

Figura 23. Imunofenotipagem das CTMH-GW com o coquetel de isótopos.

FACSDiva Version 6.1.2

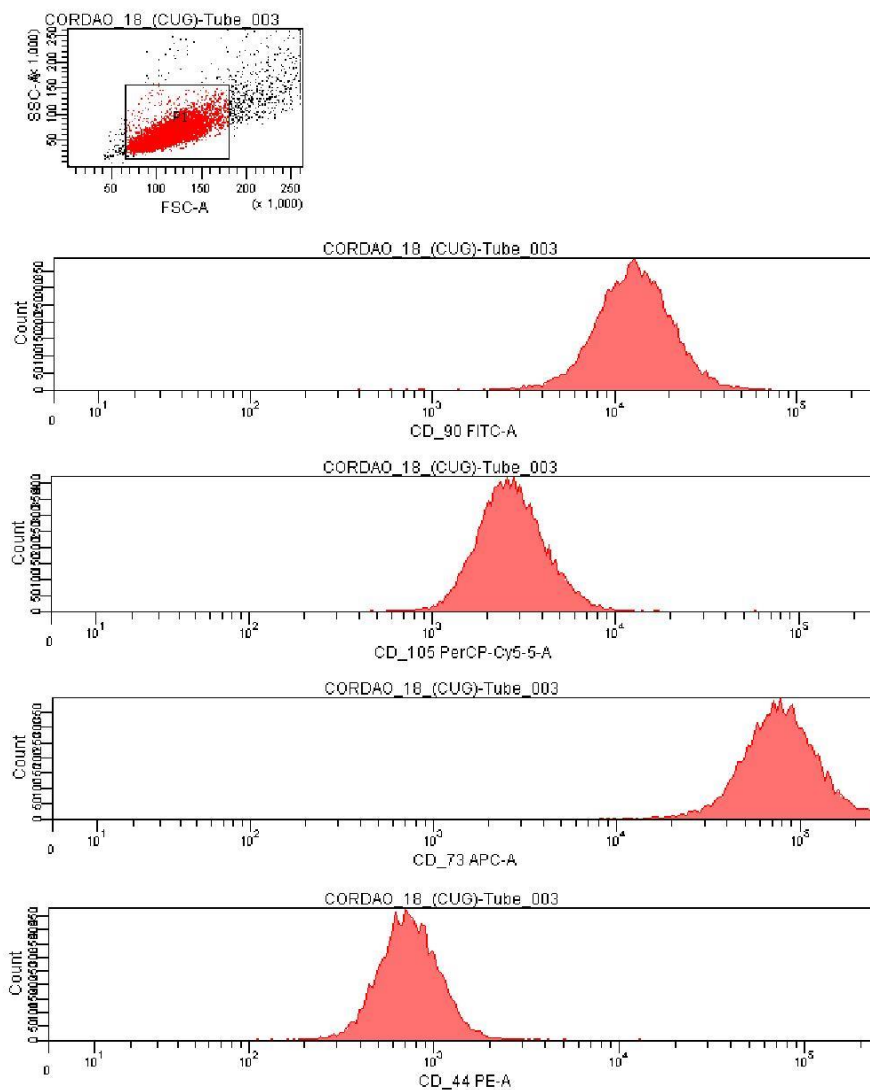


Foto: Jéssyca Fonseca

Figura 24. Imunofenotipagem das CTMH-GW com o coquetel de marcadores.