

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Davi Silveira dos Santos

Avaliação da influência do tempo de incubação na adesão das células-tronco mesenquimais quando cultivadas em matrizes de nanofibras.

Normas do Periódico *Biotechnology Progress*

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Davi Silveira dos Santos

Avaliação da influência do tempo de incubação na adesão das células-tronco mesenquimais quando cultivadas em matrizes de nanofibras.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado junto ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Profa. Dra. Patricia Pranke

Orientadora

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Co-orientador

Porto Alegre, 2012

Sumário

1 - Introdução	8
2 - Materiais e Métodos.....	10
2.1 - Obtenção e cultivo das células-tronco mesenquimais.....	10
2.2 - Caracterização das CTM.....	10
2.3 - Produção das Matrizes de Nanofibras.....	11
2.4 - Morfologia e diâmetro das fibras	12
2.5 - Semeadura das SHEDS nas matrizes	13
2.6 - Coloração com DAPI e Contagem das Células	13
2.7 - Análise Estatística.....	13
3 – Resultados	14
3.1 - Caracterização das CTM.....	14
3.2 - Morfologia e diâmetro das fibras	16
3.3 - Morfologia Nuclear.....	16
3.4 - Quantificação das CTM nas matrizes de nanofibras.....	17
4 - Discussão	18
5 - Conclusões	22
6 - Referências Bibliográficas	22
7- Anexo I – Normas do periódico científico.....	24

“O gênio é composto por 2% de talento e 98%
de perseverante aplicação.”

Ludwig Van Beethoven

**Este artigo foi escrito conforme as normas do periódico “*Biotechnology Progress*”,
apresentadas em anexo.**

Avaliação da influência do tempo de incubação na adesão das células-tronco mesenquimais quando cultivadas em matrizes de nanofibras

Davi Silveira dos Santos^a; Kerlin Quintiliano^{a, b}; Thayane Crestani^{a, b}; Virginia Helfer^a; Daikelly Iglesias^{a, c}; Diogo Pilger^a; Patricia Pranke^{a, c, d}

^aLaboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia

^bPrograma de Pós-graduação em Neurociências

^cPrograma de Pós-graduação em Ciências dos Materiais

^dInstituto de Pesquisa com Células-tronco

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

E-mail: davi.silveira@hotmail.com

Faculdade de Farmácia

Laboratório de Hematologia e Células-tronco

Av. Ipiranga, 2752, 304G

90610-000 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brasil

Telefones: (51) 3308-5257 / 5275

Resumo

A engenharia de tecidos baseia-se na utilização de biomateriais aos quais as células devem estar aderidas para que a regeneração do tecido possa ocorrer. Um dos principais métodos utilizados na avaliação da capacidade de adesão celular sobre as matrizes nanométricas é a coloração realizada com 4',2-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do tempo de incubação das células-tronco mesenquimais (CTM) sobre as matrizes de Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) na adesão celular. Amostras de CTMs foram isoladas da polpa de dentes decíduos e utilizadas entre a 5^a e 7^a passagem da cultura celular. Foram produzidas matrizes de nanofibras de PLGA puro e PLGA contendo 0,2 % de Span-80 e 0,1% de albumina através da técnica de *electrospinning*. A análise da adesão celular foi realizada após os tempos de 1, 2, 3, 6 e 8 e 10 horas de incubação celular em ambos os grupos de matrizes. Tanto para as matrizes de PLGA puro como PLGA com emulsão, a adesão após 1h e 2 horas se mostrou significativamente inferior aos outros tempos para $p < 0,05$. Nas matrizes somente com PLGA, a adesão nos tempos de 3h, 6h, 8h e 10h não mostraram diferença estatística. Nas matrizes de PLGA com emulsão, o melhor tempo de incubação foi o de 6 horas. Com isso, o estudo mostrou que um período de 6 h de incubação, já seria tempo suficiente para garantir uma boa adesão das células às matrizes de nanofibras de PLGA.

Palavras-Chave: Engenharia de Tecidos; Células-Tronco; Adesão Celular; *DAPI*.

1 - Introdução

A Engenharia de Tecidos combina duas áreas de conhecimento, as ciências de materiais e as ciências biológicas. A utilização de materiais poliméricos associados às células-tronco (CT) que sejam tolerados pelo organismo humano, bem como estimulem respostas celulares e teciduais adjacentes é, atualmente, o principal enfoque na regeneração tecidual.^{1 2 3}

As CT adultas, presentes em órgãos e tecidos formados, não encontram dificuldades éticas, como ocorre em muitos países com a utilização de CT embrionárias. As células-tronco mesenquimais (CTM) são o tipo de CTA mais utilizado na engenharia tecidual. As CTM podem ser encontradas em praticamente todos os tecidos do corpo humano, tais como o cordão umbilical, a medula óssea, o tecido adiposo, o dente decíduo e o dente permanente.⁴

Uma das vantagens do uso das células derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs – *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) é a sua facilidade de obtenção e o fato de se tratar de um método não invasivo, pois a substituição da dentição decídua pela permanente ocorre naturalmente. Por estes motivos, essas células têm sido consideradas como uma boa alternativa para a engenharia de tecidos.⁵ Além disso, as SHEDs já provaram ter capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas: osteogênica, condrogênica e adipogênica, característica essencial para serem classificadas como CTM.⁶ Miura e colegas (2003) atestaram que as SHEDs possuem uma capacidade proliferativa melhor quando comparadas às CTM da medula óssea ou até mesmo da polpa de dentes permanentes.⁷

Uma das estratégias da engenharia de tecidos é a produção de matrizes biocompatíveis e biodegradáveis que sirvam como suporte mecânico e regulem a atividade celular.⁸ A técnica de *electrospinning* (ES), ou eletrofiação, é uma das principais técnicas usadas para a produção de matrizes que mimetizem a matriz extracelular (MEC) fornecendo suporte às CTM.⁹ As matrizes produzidas por ES possuem grande área de superfície e porosidade, bem como apresentam uma rede conectada de fibras e poros que favorecem a adesão e a proliferação celular.⁸ Essa técnica envolve basicamente a criação de uma diferença de potencial entre a ponta de uma agulha, acoplada à uma seringa contendo a solução polimérica, e a placa coletora.¹⁰ No momento em que a solução sai da ponta da agulha, o solvente evapora e as fibras são depositadas sobre a placa coletora.

Atualmente, o ES de “emulsões” tem atraído bastante a atenção dos pesquisadores devido a possibilidade de incorporação e consequente liberação controlada de proteínas, peptídeos, fatores de crescimento e até mesmo de plasmídeos.¹¹ Esse processo normalmente envolve uma fase oleosa, que contém o polímero dissolvido em um solvente orgânico, e uma fase aquosa, na qual estão contidas as biomoléculas desejadas.¹²⁻¹³

O processo de adesão celular às matrizes é um dos passos mais importantes para a eficiência dessa metodologia para a engenharia de tecidos, visto que a interação célula-fibra é fundamental para a sobrevivência celular.¹⁴ Dessa forma, sabe-se que a superfície do biomaterial produzido deve conter sítios que interajam com as células exercendo papel fundamental para a fixação celular.²

Diferentes ensaios são utilizados para analisar a adesão celular, sendo a marcação fluorescente com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) um dos mais usados. O DAPI é um composto fluorescente que se interpõe preferencialmente entre os pares de bases GC ou sequências com GC e AT intercalados, sendo usado, portanto, como um marcador nuclear.¹⁵

No entanto, não há consenso em relação ao melhor tempo de incubação das células sobre as matrizes. O objetivo desse estudo foi determinar o melhor tempo de incubação das SHEDs sobre matrizes de PLGA puro e PLGA com emulsão em um ensaio de adesão com fluorescência (DAPI). Esse trabalho visa contribuir para novas abordagens da engenharia de tecidos e suas possíveis aplicações na medicina regenerativa.

2 - Materiais e Métodos

2.1 - Obtenção e cultivo das células-tronco mesenquimais

As CTM oriundas da polpa de dentes decíduos (SHEDs) foram obtidas conforme protocolo estabelecido anteriormente por Bernardi e colegas.⁶ Os dentes decíduos foram obtidos junto a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFRGS (n° 296/08).

Após extração, os dentes foram colocados em 1 mL de meio de transporte contendo DMEM *low glucose* (Sigma Aldrich), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2% penicilina-estreptomicina e gentamicina 1,12µL/mL.

A polpa do dente foi isolada e colocada em um tubo de plástico 15 mL contendo tampão de colagenase Tipo I e incubado por 1 hora em banho-maria a 37°C. Após, a solução foi centrifugada a 800g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, o *pellet* foi ressuspendido em 1mL de meio de cultivo suplementado (10% soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e colocado em 1 poço de placas de cultivo de doze poços, com adição de meio de cultivo até completar o volume final de 1,5 mL por poço. O meio foi trocado após 24 horas e, posteriormente, a cada três ou quatro dias até as células atingirem confluência de 90%. Após confluentes, as células foram cobertas com Tripsina/EDTA 0,5% para desprendimento da placa e então transferidas para subculturas conforme a necessidade. Durante toda etapa de cultivo, as células foram constantemente mantidas em estufa umidificada a temperatura de 37°C e a 5% de CO₂ na atmosfera. Para as análises de adesão, as SHEDs foram utilizadas entre a quinta e sétima passagens. Os experimentos foram realizados com três linhagens celulares diferentes (n=3) oriundas de pacientes distintos.

2.2 - Caracterização das CTM

As células foram caracterizadas como CTM por sua capacidade aderente, diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, bem como pela avaliação do perfil imunofenotípico. A análise de citometria de fluxo foi realizada nas culturas de SHEDs na quinta passagem (n= 2). Um total de 10⁵ células por tubo foram incubadas por 30 minutos a 4⁰C com os seguintes anticorpos contra as moléculas de superfície celular humana: CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD184,

HLA-DR e STRO-1 (Pharmingen-BD Biosciences), conjugados com FITC ou PE. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACS Aria III (BD Biosciences) e 10.000 eventos foram analisados com o auxílio do *software* FACS Diva versão 6.0 (BD Biosciences).

Para avaliar a capacidade de diferenciação, 10^4 células/cm², na quinta passagem, foram semeadas em placas de 12 poços. Após atingirem 80% de confluência (n=3) foram cultivadas em meios de diferenciação apropriados (adipogênico, osteogênico e condrogênico) e posteriormente coradas de acordo com Bernardi e colegas (2011).

2.3 - Produção das Matrizes de Nanofibras

Dois grupos de matrizes nanométricas foram produzidos utilizando-se a técnica de ES no equipamento demonstrado na figura 1. No grupo 1, foram produzidas matrizes com o polímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (PURAC) na concentração de 13% em 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (Sigma Aldrich). No grupo 2, foram produzidas matrizes com o polímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (PURAC) na concentração de 15% em 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (Sigma Aldrich), Span-80 na concentração de 0,2% acrescido de Albumina Sérica Bovina (BSA) a 5% em Tampão Fosfato Salino 1x (PBS 1x).

As matrizes do grupo 1 (PLGA puro) foram produzidas com os seguintes parâmetros no ES: fluxo de 0,002 mm/segundo, distância de 15 cm da agulha para a placa coletora e voltagem de 16 kV no eletrodo positivo e 2 kV no eletrodo negativo. Para as matrizes do grupo 2 (PLGA-emulsão) foram utilizados os parâmetros: fluxo de 0,002 mm/segundo, distância de 15 cm da agulha para a placa coletora e voltagem de 22 kV no eletrodo positivo e 2 kV no eletrodo negativo. O procedimento foi realizado com duas seringas de 1 mL concomitantemente visando aumentar a eficiência do processo. As fibras produzidas foram coletadas sobre lamínulas circulares de 15 mm e posteriormente esterilizadas em luz ultravioleta durante 1 hora (antes da semeadura das células). As matrizes foram então armazenadas em ambiente livre de umidade e calor para posterior utilização nos experimentos.

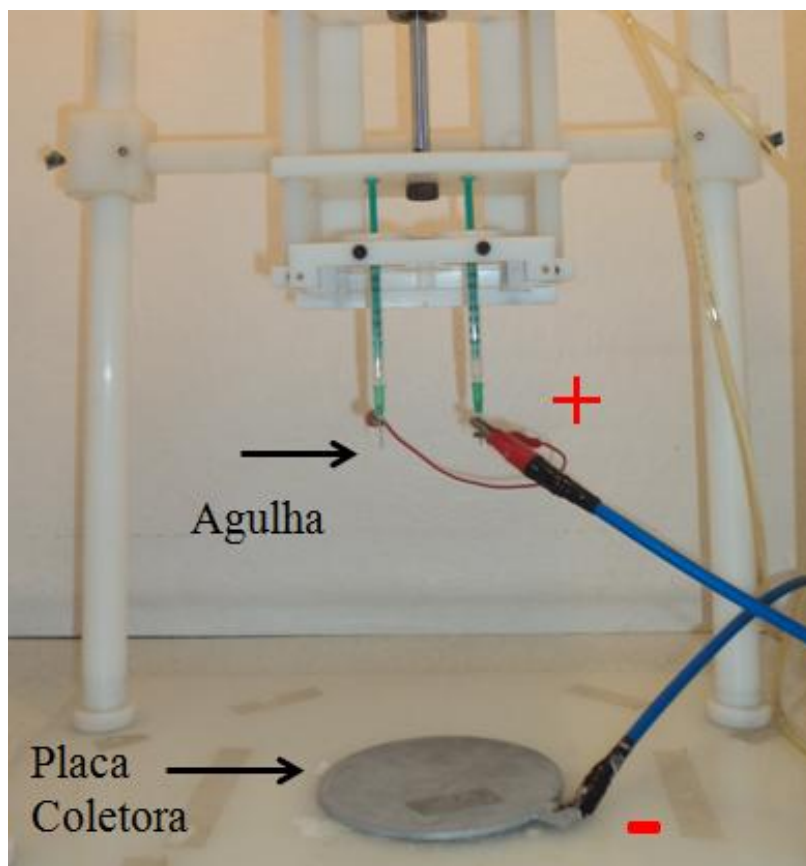


Figura 1- Aparato para realização da técnica de *Electrospinning*. Eletrodo positivo conectado na ponta da agulha e eletrodo negativo na placa coletora.

2.4 - Morfologia e diâmetro das fibras

A morfologia e o diâmetro das nanofibras foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV modelo JEOL - JSM 6060), utilizando-se a infraestrutura disponível no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os diâmetros das nanofibras foram obtidos através do software *ImageJ*. As amostras para os dois grupos de matrizes foram produzidas em dias diferentes submetidas aos seus respectivos parâmetros durante o *electrospinning* ($n=2$). Três diferentes campos de cada amostra foram utilizados para análise e três fotomicrografias avaliadas para cada campo. Em cada uma delas, trinta fibras foram medidas obtendo-se o diâmetro médio para cada grupo.

2.5 - Semeadura das SHEDS nas matrizes

Antes da semeadura das CTM, as matrizes dos dois grupos foram ambientadas com meio de cultivo suplementado em placas de cultivo de 24 poços por 20 minutos. Nesse momento, as células foram destacadas da placa de cultura com Tripsina/EDTA 0,5% e contadas em câmara de Neubauer. As células foram então semeadas homoganeamente nas matrizes na concentração de 3×10^4 células/matriz.

Após decorridos os tempos de 1, 2, 3, 6, 8, e 10 horas de semeadura, o meio de cultivo foi retirado e o poços com as matrizes foram lavados com PBS 1x. As células foram então fixadas com Paraformaldeído 4% e armazenadas em geladeira ou imediatamente utilizadas para a realização da coloração com DAPI. Todos os experimentos foram executados em triplicata.

2.6 - Coloração com DAPI e Contagem das Células

Para a realização da coloração fluorescente com DAPI, procedeu-se com a diluição do corante (1.000X) em tampão PBS 1x. Adicionou-se 400 μ L da solução de DAPI por poço de cultivo contendo as matrizes com células. Após um minuto de incubação, os poços foram lavados com PBS 1x e as placas armazenadas ao abrigo da luz para a posterior captura das imagens. Foram avaliados nove campos aleatórios por poço fotografados em um microscópio de Fluorescência Invertido Olympus CKX41 com câmera acoplada Olympus XC50 utilizando o programa *AnalySis GetIT*.

2.7 - Análise Estatística

Para a análise estatística, os dados organizados em planilhas foram exportados para o programa SPSS v. 16.0. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão. Com 95% de confiança os resultados foram submetidos a análises de medidas repetidas de dois fatores (teste de Hotelling) e para comparar os diâmetros médios das nanofibras de cada grupo, utilizou-se o teste T de Student para amostras independentes.

3 – Resultados

3.1 - Caracterização das CTM

As células em cultura demonstraram característica de aderência ao plástico e positividade superior a 88% para os marcadores de superfície CD29/PE, CD73/PE e CD90/FITC e inferior a 3% para CD34/PE, CD45/FITC, CD184/PE, HLA-DR/FITC e STRO-1/PE. A tabela 1 mostra a expressão em porcentagem de cada marcador para as duas amostras analisadas. Uma das amostras analisadas por citometria de fluxo está representada na Figura 2. Ambas as amostras foram capazes de se diferenciar nas três linhagens celulares (osteogênica, adipogênica e condrogênica). Fotomicrografias de uma amostra representativa das culturas CTM diferenciadas estão mostradas na Figura 3.

Tabela 1 – Características imunofenotípicas das CTM analisadas por citometria de fluxo. Expressão em percentual de cada marcador para as duas amostras analisadas.

Marcador	Expressão (%)		
	Amostra 1	Amostra 2	Média
CD29	95,5	99,0	97,2
CD73	99,0	99,0	99,0
CD90	98,4	99,7	99,0
CD44	92,1	85,5	88,0
STRO-1	1,0	0,5	0,7
CD14	5,3	0,8	3,0
CD34	0,0	0,4	0,2
CD45	0,1	0,4	0,2
CD184	0,0	0,0	0,0
HLA-DR	0,4	0,8	0,6

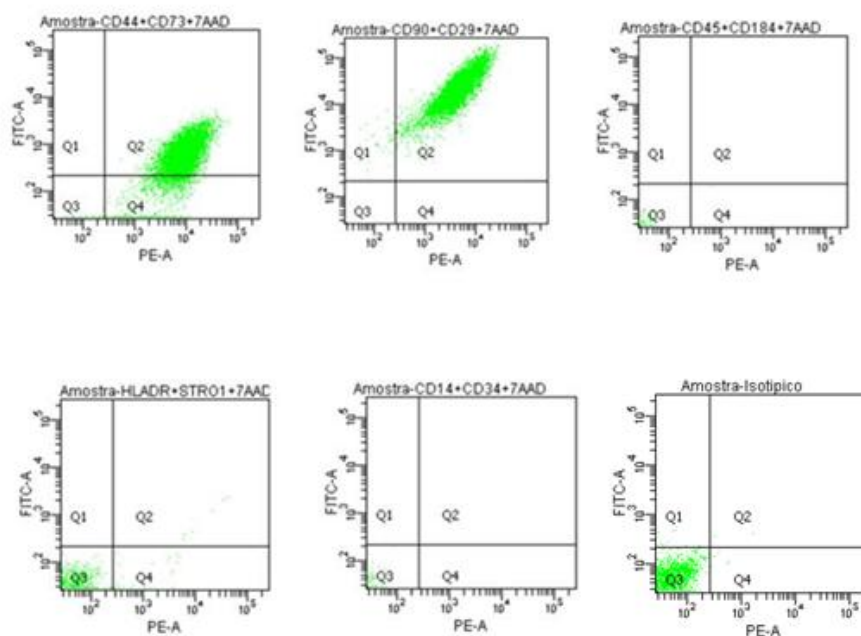


Figura 2 – Caracterização das CTM. Análise por citometria de fluxo usando os seguintes anticorpos humanos: anti-CD14/FITC, CD29/PE, CD34/PE, CD44/FITC, CD45/FITC, CD73/PE, CD90/FITC, CD184/PE, HLA-DR/FITC e STRO-1/PE.

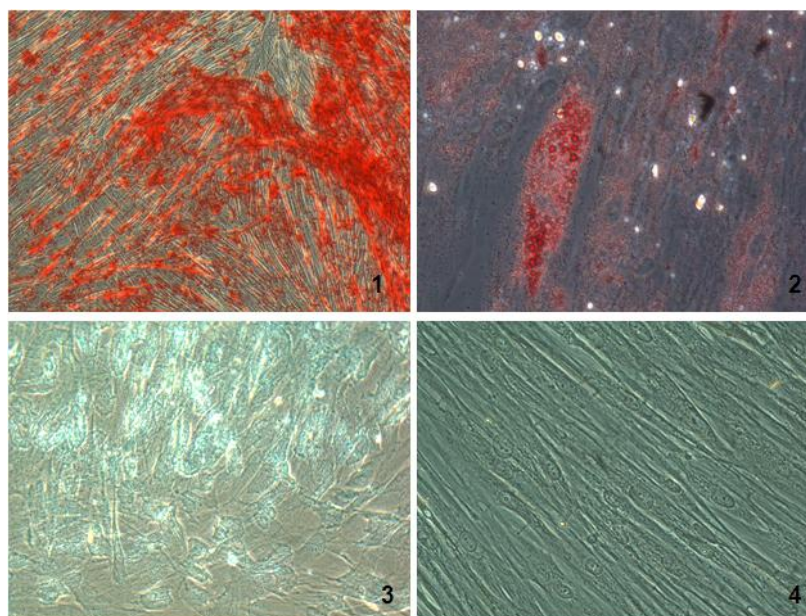


Figura 3 - Diferenciação da CTMs nas linhagens (1) osteogênica, (2) adipogênica; (3) condrogênica; coradas com *Alizarin Red*, *Oil Red* e *Alcian Blue* respectivamente; (4) controle. Aumento de 400 x.

3.2 - Morfologia e diâmetro das fibras

As fibras apresentaram morfologia lisa sem a presença de *beads*, dispostas de maneira aleatória (Figura 4). O diâmetro médio obtido foi de 906 +/- 157 nm para o grupo 1 e 970 +/- 141 nm para o grupo 2. A comparação entre os grupos não apresentou diferença estatística significativa ($P=0,472$).

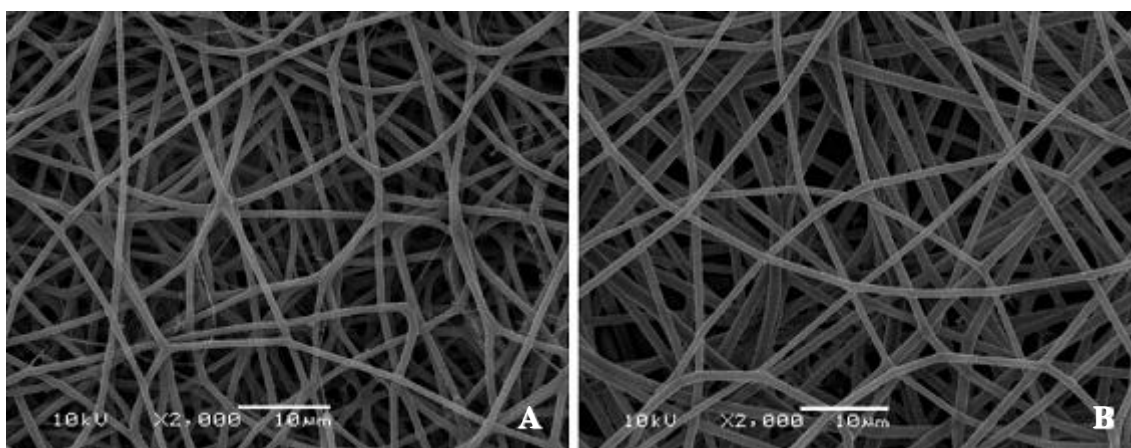


Figura 4: Fotomicrografias (MEV) das matrizes de nanofibras – grupo PLGA/emulsão (A) e grupo PLGA puro (B).

3.3 - Morfologia Nuclear

Na análise da morfologia celular, em ambos os grupos de matrizes, observou-se diferenças entre os tempos de 1h e 2 h quando comparadas aos tempos de 8h e 10 h (Figura 5). Os núcleos das células avaliadas após os tempos de 1 e 2 horas de incubação se apresentam mais arredondadas e menores em relação àquelas avaliadas após os tempos de 8h e 10h de incubação. Esses resultados foram semelhantes para todas as linhagens analisadas.

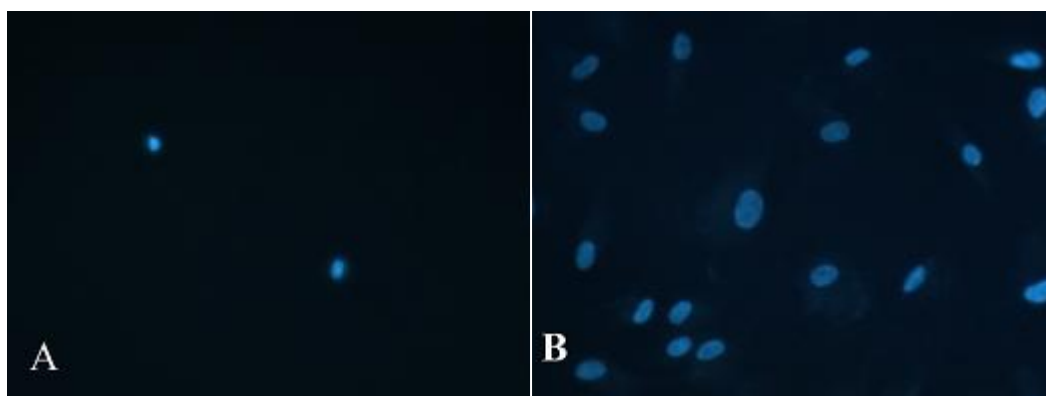


Figura 5: Coloração do núcleo das células com DAPI. (A) morfologia nuclear após 1h de incubação e (B) morfologia nuclear após 10h de incubação. Visualização em aumento de 400x.

3.4 - Quantificação das CTM nas matrizes de nanofibras

Considerando todos os tempos de incubação em conjunto, o grupo 1 de matrizes (PLGA) apresentou um número médio de células por foto de 11,56 células, enquanto que o grupo 2 de matrizes (PLGA com emulsão) apresentou um número de 16,24 células ($p < 0,05$). Em ambos os grupos, os tempos de 1h e 2h foram estatisticamente inferiores em quando comparados com os demais tempos de incubação. Nas matrizes do grupo 1 (PLGA puro) não houve diferença significativa entre os tempos de 3h, 6h, 8h e 10 horas (Figura 7). Já nas matrizes do grupo 2 (PLGA com emulsão), o tempo de 6 horas de incubação se mostrou estatisticamente superior ao tempo de 8 horas (Figura 6).

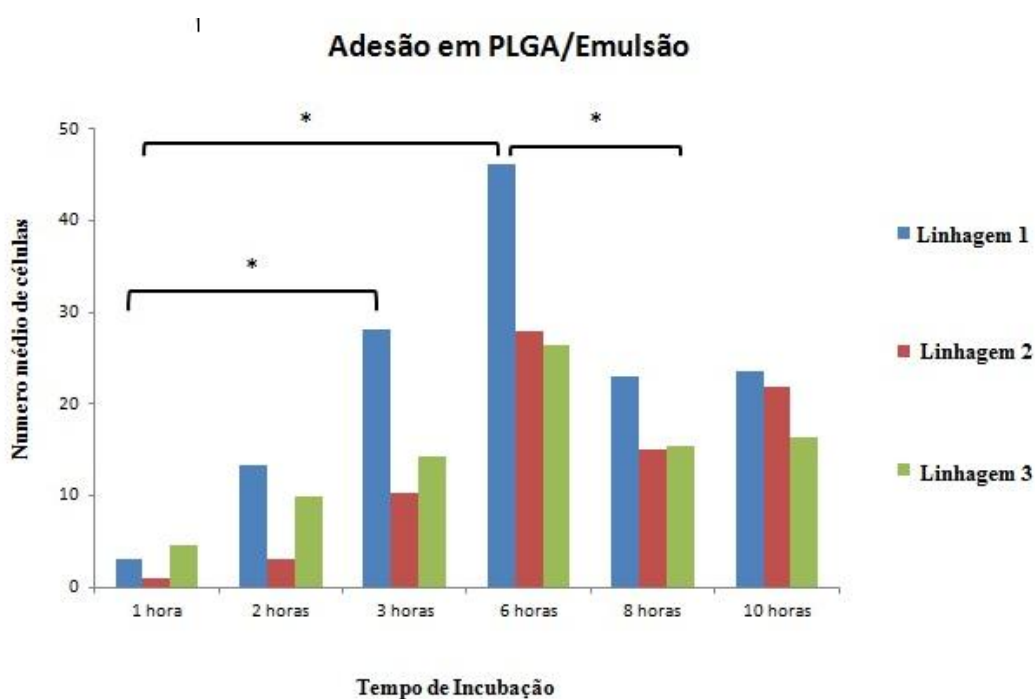


Figura 6- Adesão celular em matrizes PLGA/Emulsão nas três linhagens celulares.

Legenda: * para $p < 0,05$

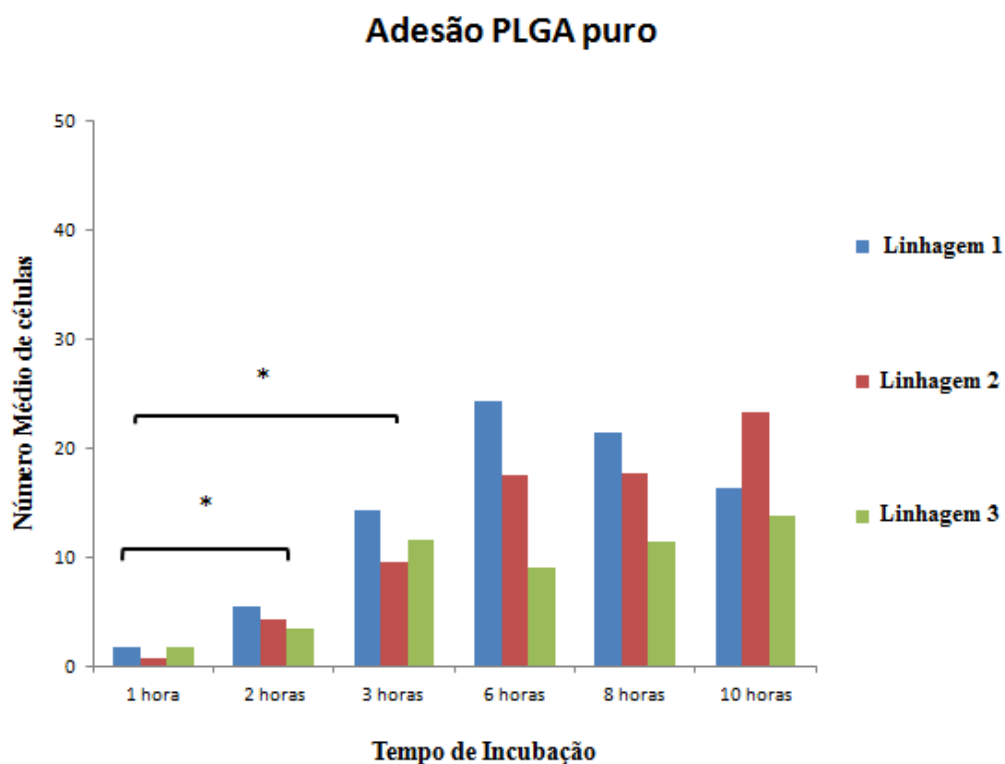


Figura 7- Adesão celular em matrizes PLGA puro nas três linhagens celulares. Legenda: * para $p < 0,05$

4 - Discussão

Vários processos fisiológicos são dependentes de uma correta adesão celular, como são exemplos a resposta imune dos tecidos, a embriogênese e, obviamente, a eficácia de implantes de biomateriais.¹⁶ O processo de adesão e consequente comunicação célula-célula são fundamentais para a viabilidade celular e sua futura diferenciação, principalmente considerando modelos de implantes de biomateriais.¹ Sabe-se que as células ancoradas à matriz não começam a proliferar sem que ocorra uma expansão sob o substrato.² Logo, um teste adequado de avaliação da área de expansão celular e da morfologia nuclear é a utilização da marcação com DAPI.

Nesse trabalho, objetivou-se avaliar o melhor tempo de incubação de matrizes poliméricas de nanofibras utilizadas como suporte para a proliferação e diferenciação celulares. Além disso, comparou-se dois grupos de matrizes, uma utilizando somente

solução polimérica e outro acrescentado de sistema de emulsão, bastante utilizado como alternativa na construção de sistemas de liberação controlada de biomoléculas.

Na análise dos resultados, observou-se que a morfologia nuclear nos tempos de 1h e 2h de incubação indicou claramente um perfil mais arredondado e de menor comprimento quando comparados aos tempos de 8h e 10 horas. Essa diferença sugere que os tempos de 1h e 2h de incubação celular não sejam suficientes para um processo de adesão completo das células às matrizes poliméricas, mesmo no grupo com emulsão. Sabe-se que na fase inicial de adesão, as células se aderem fracamente ao substrato e não se espalham na sua superfície apresentando menos pontos de interação célula-substrato. Nos tempos de 8h e 10h de incubação, as células apresentam morfologia nas quais espalham-se pelo substrato, emitem prolongamentos e apresentam adesão focal.¹⁷⁻¹⁸ A expansão nuclear participa do processo mecânico de adesão celular e proliferação, pois sua mudança de morfologia favorece uma alteração na cromatina, permitindo a atuação da maquinaria celular que realiza a replicação do DNA.²

Diversas propriedades das matrizes poliméricas influenciam na capacidade de adesão das células. Entre essas propriedades, destacam-se a hidrofiliicidade, a rugosidade, a rigidez, a maior quantidade de cargas e a presença de domínios específicos favoráveis à adesão focal no biomaterial produzido.^{2, 17} Diferentes combinações entre essas características são responsáveis pelo comportamento diferenciado da adesão celular sobre as matrizes. O presente trabalho avaliou dois grupos de matrizes que se diferenciaram pela utilização de um sistema de emulsão. As matrizes contendo Span-80 são mais hidrofílicas do que as matrizes produzidas somente com o polímero^{9, 12} e as células, naturalmente, apresentam maior adesão em superfícies com essas características. Os resultados apresentados em relação ao número médio de células observadas nos dois grupos de matrizes comprovam essa propriedade, visto que a adesão foi superior no grupo de matrizes com emulsão ($p=0,007$). Outro motivo que possivelmente contribui para esse comportamento é o excesso de cargas causado pela fase aquosa da emulsão no *Electrospinning* favorecendo um número maior de células fiquem aderidas.^{2, 12}

Quando a análise dentro de cada grupo foi realizada para avaliar o melhor tempo de incubação, observou-se que as matrizes de PLGA/emulsão apresentaram um comportamento distinto do grupo de PLGA puro. O grupo PLGA/emulsão apresentou um pico de adesão celular no tempo de 6 horas, decaindo o número de células observadas para 8h e 10 h (Figura 6). O número de células aderidas no tempo de 6 horas foi

estatisticamente superior ao tempo de 8 horas ($p=0,007$) e também apresentou uma forte tendência quando comparado ao tempo de 10 horas ($p=0,06$). Esse resultado pode ser explicado porque as superfícies mais hidrofílicas tendem a se ligar às moléculas adsorvidas das células por forças moleculares fracas, como Van der Waals, o que pode acarretar um desprendimento das células em um tempo mais avançado de incubação, principalmente quando muitas células estão aderidas.² Quando as fibras somente com PLGA foram analisadas observou-se uma tendência de aumento crescente da adesão celular do tempo 1 hora ao tempo de 10 horas nas 3 linhagens analisadas ($p<0,001$) (Figura 7). Porém, não houve diferença estatística entre os tempos a partir de 3 horas o que sugere que esse tempo é suficiente para avaliar a adesão celular neste grupo. As matrizes de PLGA puro seguiram o mesmo padrão apresentado por Schlie S e colegas, com um número crescente de células-tronco aderidas à matriz com o aumento do tempo de incubação, como seria o esperado.¹⁹ O autor mostrou um tempo de adesão de 4,73 a 13,73 horas para células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ASC), o que fornece uma evidência significativa para os dados obtidos com os experimentos apresentados no presente estudo. Pan L e colegas encontraram um resultado semelhante de adesão celular em períodos mais longos de incubação para as células de medula óssea em diversos biomateriais.²⁰ Um gradiente crescente de número de células contabilizadas foi observado pelo autor o que corrobora com os dados obtidos no estudo presente.

Para um ensaio de adesão como a marcação com 4', 2- Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) é importante ressaltar a correta utilização do tempo de incubação visando avaliar apenas a adesão celular sobre o biomaterial produzido sem antes ter havido proliferação. Os dados descritos para as SHEDs são de um tempo de duplicação da população de 25,55 horas²¹ e 21,3 a 34,6 horas.²² Schlie S e colegas também mostraram uma atividade de proliferação celular a partir de 8h e 24 horas para fibroblastos e células endoteliais em cultura.¹⁹ Diante desses dados é evidente que o ensaio de adesão não deve ser realizado com um tempo de incubação celular próximo ou superior a 24 horas, pois os resultados obtidos não estarão fornecendo dados reais de adesão celular. Com um período de incubação próximo ou superior a 24 horas, os números encontrados no ensaio não são fiéis ao processo de adesão celular somente, pois pode ter havido proliferação celular, gerando um resultado superestimado do processo de adesão celular ao substrato.

O presente trabalho avaliou a influência do tempo de incubação na adesão celular até o período de 10h. De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que para

definir com precisão o melhor tempo de incubação, apenas o ensaio com DAPI não é suficiente. Um ensaio de proliferação deve ser realizado ao mesmo tempo para constatar o tempo exato em que a fase proliferativa possa começar a interferir nos resultados de adesão. Uma alternativa interessante seria medir a expressão de Ki-67, uma proteína presente em todas as fases do ciclo celular, exceto G0, através da técnica de imunocitoquímica. Essa avaliação concomitante reforçaria os resultados obtidos nesse trabalho, confirmando que o tempo de 6h é suficiente para avaliar a adesão em matrizes de PLGA-emulsão, bem como o tempo de 3h para as matrizes de PLGA puro. A avaliação da proliferação celular excluiria resultados de adesão superestimados decorrentes dos períodos de incubação mais prolongados, visto que não se sabe exatamente em qual momento a proliferação celular das SHEDs poderia alterar significativamente os resultados da adesão.

O estudo mostrou que o tempo de 3 h de incubação celular para o grupo 1 é um período relativamente curto, mas suficiente para ocorrer a adesão celular não havendo aumento significativo do número de células em relação aos tempos seguintes (a partir de 6h). Nesse caso, não pareceu haver influência da proliferação, já que o número de células não aumentou significativamente com o tempo. No grupo 2, observou-se diminuição significativa do número de células no tempo de 8h em relação à 6h, e embora não significativo, o tempo de 6h ainda mostrou-se superior ao tempo 10 h. Esses dados poderiam indicar que também não houve influência da proliferação das SHEDs na avaliação do melhor tempo de incubação para a adesão celular. Dessa forma, o ensaio de adesão realizado com incubação de até 10h possivelmente não sofre influência da proliferação celular para os dois grupos de matrizes avaliados.

Sabe-se que o ensaio de adesão DAPI é um excelente método para avaliar a adesão celular e o presente estudo objetivou definir os melhores tempos de incubação celular para adesão sobre as matrizes de nanofibras, visto que esse dado é fundamental para o futuro uso clínico de biomateriais para a engenharia de tecidos.

5 - Conclusões

O ensaio de adesão celular com a marcação fluorescente DAPI é um dos mais utilizados nos estudos em engenharia de tecidos. O melhor tempo de incubação das CTM para matrizes PLGA com emulsão foi de 6 horas. Para matrizes de PLGA puro, o tempo de incubação superior a 3 horas não apresentou diferença significativa quando comparado com os outros períodos de observação (6, 8 e 10 horas). Portanto, pode-se definir que o período de 6 h seria tempo suficiente para garantir uma boa adesão celular nas matrizes de nanofibras de PLGA. Sabe-se que o ensaio de adesão DAPI é um excelente método para avaliar a adesão celular e o presente estudo visou definir os melhores tempos de incubação celular para adesão sobre as matrizes de nanofibras, dado esse fundamental para o sucesso do uso da associação de células-tronco com biomaterias para a medicina regenerativa.

6 - Referências Bibliográficas

1. Zhang N, Kohn D H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2012; 96; (1): 63-81.
2. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 2011; 29; (6): 739-67.
3. Lin H, Yang G, Tan J, Tuan R S. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials* 2012; 33; (18): 4480-9.
4. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011; 9; 12.
5. Cordeiro M M, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith A J, Nor J E. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008; 34; (8): 962-9.

6. Bernardi L, Luisi S B, Fernandes R, Dalberto T P, Valentim L, Bogo Chies J A, Medeiros Fossati A C, Pranke P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod* 2011; 37; (7): 973-9.
7. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher L W, Robey P G, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100; (10): 5807-12.
8. Cao D, Wu Y P, Fu Z F, Tian, Y Li C J, Gao C Y, Chen Z L, Feng X Z. Cell adhesive and growth behavior on electrospun nanofibrous scaffolds by designed multifunctional composites. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 84; (1): 26-34.
9. Liao Y, Zhang L, Gao Y, Zhu Z T, Fong H. Preparation, characterization, and encapsulation/release studies of a composite nanofiber mat electrospun from an emulsion containing poly (lactic-co-glycolic acid). *Polymer (Guildf)* 2008; 49; (24): 5294-5299.
10. Francis M P, Sachs P C, Madurantakam P A, Sell S A, Elmore L W, Bowlin G L, Holt S E. Electrospinning adipose tissue-derived extracellular matrix for adipose stem cell culture. *J Biomed Mater Res A* 2012.
11. Chai C, Leong K W. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol Ther* 2007; 15; (3): 467-80.
12. Li X, Su Y, He C, Wang H, Fong H, Mo X. Sorbitan monooleate and poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) electrospun nanofibers for endothelial cell interactions. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91; (3): 878-85.
13. Zhang J, Li L, Wang J, Sun H, Xu J, Sun D. Double inversion of emulsions induced by salt concentration. *Langmuir* 2012; 28; (17): 6769-75.
14. Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285; (5430): 1028-32.
15. Tanious F A, Veal J M, Buczak H, Ratmeyer L S, Wilson W D. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992; 31; (12): 3103-12.
16. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000; 49; (2): 155-66.
17. Lee J W Kim, Y H, Park K D, Jee K S, Shin J W, Hahn S B. Importance of integrin beta1-mediated cell adhesion on biodegradable polymers under serum depletion in mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Biomaterials* 2004; 25; (10): 1901-9.
18. Sarkar S. Focal adhesions. *Curr Biol* 1999; 9; (12): R428.

19. Schlie S, Gruene M, Dittmar H, Chichkov B N. Dynamics of Cell Attachment: Adhesion Time and Force. *Tissue Eng Part C Methods* 2012.
20. Pan L, Pei X, He R, Wan Q, Wang J. Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 93: 226-34.
21. Eslaminejad M B, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *J Dent (Tehran)* 2010; 7; (4): 185-95.
22. Nishino Y, Yamada Y, Ebisawa K, Nakamura S, Okabe K, Umemura E, Hara K, Ueda M. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy. *Cytotherapy* 2011; 13; (5): 598-605.

7- Anexo I – Normas do periódico científico

Biotechnology Progress

Author Guidelines

Scope

Biotechnology Progress, an official, bimonthly publication of the American Institute of Chemical Engineers and its technological community, the Society for Biological Engineering, features peer-reviewed research articles, reviews, and descriptions of emerging techniques for the development and design of new processes, products, and devices for the biotechnology, biopharmaceutical and bioprocess industries.

Topical areas of interest include application of biological and engineering principles in fields such as applied cellular physiology and metabolic engineering, biocatalysis and bioreactor design, bioseparations and downstream processing, cell culture and tissue

engineering, biosensors and process control, bioinformatics and systems biology, biomaterials and artificial organs, stem cell biology and genetics, and plant biology and food science. Manuscripts concerning the design of related processes, products, or devices are also encouraged. Four types of manuscripts are published in *Biotechnology Progress*: Research articles, Topical or Review Papers, Letters to the Editor, and R&D Notes. Papers will be accepted for review only if they are not under consideration by another journal.

All authors should read the [AIChE Code of Ethics](#) . (Revised January 17, 2003)

Types of Manuscripts

Research Articles are full-length expositions of extensive and significant experimental or theoretical studies.

Topical or Review Papers are short reviews or full reviews focused on areas of interest to readers of the journal. They may also be state-of-the-art reports or commentaries. These papers are peer reviewed and are accepted on the basis of technical accuracy, importance, and readability.

R&D Notes are generally eight (or fewer) double-spaced typewritten pages including figures and tables.

Submission of Manuscripts

Submit your manuscript online at <http://mc.manuscriptcentral.com/biotechprog/>. If you are a first time user, follow the instructions for creating an author account under “Create Account” (top right of the Login page).

Please submit your manuscript as a Word or rtf file (for text and tables) and tiff or eps (for figures). Other file types are not suitable for production. Please note that ScholarOne Manuscripts does not accept a single file upload from the author. Text, tables, and figures will need to be uploaded individually. Do not embed figures or tables in the document.

New Manuscript Submission Requirement: Manuscript submissions must be accompanied by a signed [Copyright Transfer Agreement](#). The completed, signed, and dated form should be uploaded to ScholarOne Manuscripts using the File Upload field and designated as a “Supplementary Material Not for Review” file.

LaTeX Users: All files must be formatted in LaTeX version 2.02 or earlier. Figures must be formatted as either .tif or .eps files and saved separately. Directory structures should not be used when referencing external files. This will cause a corrupted upload into ScholarOne Manuscripts and will result in the cancellation of manuscript submission. Class and style files may be either internal or external. ScholarOne Manuscripts provides all standard LaTeX class files for author use; however, you may create your own. Please be sure to check the log file provided at submission to see if you are missing the class file from your document.

LaTeX File Submission Guidelines: Upload a PDF version of your manuscript for review. Once a manuscript has been accepted for publication, Zip-up the directory containing all your LaTeX files. This includes the TeX document, all graphics as separate files, any class files, any bibliography files, and the PDF of the final version. This zip file can be uploaded as a single file into ScholarOne Manuscripts.

For technical assistance, please contact support@scholarone.com.

If you have any questions about the online submission process, you may also contact the Biotechnology Progress Editorial Office:

Elizabeth Gillard, Ph.D. Biotechnology Progress Editorial Office Bourns College of Engineering University of California, Riverside Riverside, CA 92521-0001 Email: biotech-prog@andrew.cmu.edu

Manuscript Preparation

Cover Letter

A cover letter should accompany each submitted manuscript and must be uploaded on the Web submission site. The letter should provide the corresponding author's name, postal and e-mail addresses, and telephone and fax numbers. The letter should address the significance of the manuscript and provide a list of 3-5 key words. Authors are also urged to provide the names and email addresses of recommended reviewers.

All editorial correspondence concerning receipt, status, review, revision, and publication of manuscripts will be sent **only** to one person who has been assigned as the "corresponding author" during the evaluation period. The corresponding author is responsible for communicating the manuscript status to all coauthors of the paper.

Copyright Transfer Agreement. Manuscript submissions must be accompanied by a signed [Copyright Transfer Agreement](#). The completed, signed, and dated form should be uploaded to ScholarOne Manuscripts using the File Upload field and designated as a "Supplementary Material Not for Review" file.

Conflict of Interest Disclosure. *Biotechnology Progress* and Wiley-Blackwell require that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editor, in the manuscript (under the Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Title. The title should accurately, clearly, and concisely reflect the emphasis and content of the paper. The title must be brief and grammatically correct.

Author List. Use first names, initials, and surnames. At least one author must be designated as the author to whom correspondence should be addressed and email information should be provided.

Address. The affiliation(s) listed should be the institution(s) where the work was conducted. If the present address of an author differs from that at which the work was done, the current address should be given in a footnote.

Abstract. All manuscripts must contain a *short* abstract (no more than 250 words), which should *briefly* state the reason for the work, the significant results, and the conclusions.

Text. The first paragraphs should explain what the motivation and import of the work are, where it fits in the development of the field, and perhaps why it should be of interest to researchers in other areas. It should be possible to do this without excessively increasing the length of the paper. Thoughtful use of schemes and diagrams (with concise and descriptive captions) is recommended, so that even casual browsers can discern the nature of the work. Well-known procedures should be designated by giving them name or literature references. Experimental results are of lasting value and should be clearly and logically presented in separate sections. The addition of a Conclusion section at the end of the paper, which briefly summarizes the principal findings of the work, is recommended. If

desired for clarification, main section headings may be given Arabic numbers and subsections numbered in decimals (example, subsection 2.1 and subsection 2.2).

Acknowledgments. Dedications and notes acknowledging financial assistance, thesis work, or oral presentations at a scientific meeting or conference should be brief and placed in the Acknowledgment section.

Supplementary Material Statement. A brief statement, listing the contents of material placed in Supplementary Material, should be included at the end of the manuscript (after the Acknowledgment and before the Literature Cited). For instructions on what material should be provided as supplementary material, see the Supplementary Material section below.

Figures. All figures must be mentioned in the text in consecutive order and be numbered with Arabic numerals. A caption giving the figure number and a brief description, preferably only one or two sentences must be included with each figure. The caption should be understandable without reference to the text.

Color Figure Preparation. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Schemes. Schemes must have brief titles describing their contents and should be numbered with Arabic numerals

Charts. Charts must contain brief titles describing their contents and should be numbered consecutively with Arabic numerals.

Tables. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each table must have a brief (one phrase) title that describes its contents. The title should be understandable without reference to the text. Details should be put in footnotes, not in the title. Tables should be used when the data cannot be presented clearly as narrative, when many precise numbers must be presented or when more meaningful interrelationships can be conveyed by the tabular format. Tables should supplement, not duplicate, information presented in the text and figures. Tables should be simple and concise. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by row rather than by column. In setting up tables, authors should keep in mind the type area of the *Biotechnology Progress* page (17.8 - 25.0 cm) and the column width (8.5 cm) and should make tables conform to the limitations of these dimensions.

Literature Cited

Literature Cited should be formatted according to the AMA style, and must be listed numerically in the order they are cited in the text. Authors will need to provide complete information for each citation, as shown in typical examples below.

Journal:

1. Wang X, Da Silva NA. Estimation of the rate of cloned gene integration via retrotransposition. *Biotechnol Prog.* 1997;13:123-131.

Book:

2. Givan AL. Flow cytometry: first principles (2nd edition). New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

Book Chapter:

3. Luketich JD, Ginsberg RJ. Diagnosis and staging of lung cancer. In: Johnson BE, Johnson DH. Lung cancer. New York: Wiley-Liss, Inc., 1995:161-73.

For a sample article with correct formatting for Literature Cited, [click here](#).

Download Reference Style for this Journal: If you use EndNote, you can [download the reference style](#) for this journal.

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com, or visit <http://www.endnote.com/support>.

Topical Areas and Key Words

Select the heading from the six topical areas listed in the ScholarOne Manuscripts pull down menu under the Table of Contents Section. (The topical areas are described in the Aims and Scope section of the journal under Overview.) Provide a minimum of two and a maximum of five key words that best capture the concepts and scope of the work.

Graphics Preparation

All illustration files should be in TIFF or EPS formats. Do not submit native application formats.

Journal quality reproduction requires the following minimum resolution standards:

grey scale files 600 dpi to 1200 dpi

color files 300dpi

Supplementary Material

Biotechnology Progress authors can publish supplementary material online in Wiley Online Library. Supplementary material may include (but is not limited to) video clips, large sections of tabular data, program code, or electronic graphical files that are otherwise

not suitable for print media. Supplementary material must be included with the initial manuscript submission so that it is available for peer review.

Additional Reprint Purchases

Should you wish to purchase additional copies of your article, please follow the instructions provided

at: <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=BTPR>

Copyright Transfer Agreement

No article can be published unless accompanied by a signed Copyright Transfer Agreement from the author(s). The Copyright Transfer Agreement is available by accessing the link at the top of this page. The completed, signed, and dated form should be included with the submitted manuscript and designated as a "Supplementary Material Not for Review" file.

Permission for Reproduction

It is the Author's responsibility to obtain written permission to reproduce material that has appeared in another publication.