

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**PRODUÇÃO DE *SCAFFOLDS* CONTENDO CÉLULAS-TRONCO PARA
USO NA ENGENHARIA DE TECIDOS ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO
DAS TÉCNICAS DE *ELECTROSPINNING* E *BIO-ELECTROSPRAYING***

Daikelly Iglesias Braghirolli

**Dissertação de Mestrado
Porto Alegre, julho de 2012**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**PRODUÇÃO DE *SCAFFOLDS* CONTENDO CÉLULAS-TRONCO PARA
USO NA ENGENHARIA DE TECIDOS ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO
DAS TÉCNICAS DE *ELECTROSPINNING* E *BIO-ELECTROSPRAYING***

Daikelly Iglesias Braghirolli

Dissertação realizada sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Patricia Pranke e co-orientação do Prof. Dr. Diogo André Pilger, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre
2012

*Dedico este trabalho a meus pais, **Aldemar** e **Marley**, “meu tudo”, por todo o esforço e sacrifício que fizeram para a minha formação e por tudo o que sou. Por todo o amor, paciência e carinho dedicados a mim. Obrigada pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões e por me ensinarem a sempre buscar a realização dos meus sonhos. Os exemplos de princípio e de caráter de vocês me fazem, a cada dia, uma pessoa melhor. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A toda a **minha família**, em especial a minha querida **avó Lais** (in memorian), pela constante presença e apoio em todas as etapas da minha vida. Obrigada por todo o carinho, dedicação e zelo despendidos em minha educação. Ainda choro sua partida, mas sinto que está sempre comigo.*

Saudades imensas!

*Aos meus irmãos **Aldemarzinho**, **Carlos** e ao meu “tozinho” **Thobias**. Obrigada simplesmente por existirem e fazerem parte da minha vida. Tenho muito orgulho de vocês, *meus gatos!**

*À professora e orientadora **Dr^a. Patricia Pranke**, por há 5 anos ter me apresentado ao mundo científico. A sua paixão pela pesquisa envolvendo células-tronco e engenharia de tecidos é um incentivo a todos os seus alunos. Obrigada por toda a credibilidade e liberdade na execução deste trabalho. Todo o ensinamento recebido desde a graduação e oportunidades oferecidas só contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo!*

*Ao professor e co-orientador **Dr. Diogo André Pilger**, não tenho palavras para agradecer toda a dedicação dispensada no desenvolvimento deste trabalho. Sua acessibilidade e atenção durante toda a execução e principalmente escrita desta dissertação foram de extrema importância. Seu exemplo de profissional é motivador. Obrigada por todo o apoio. Fica expresso meu desejo de continuarmos a trabalhar juntos!*

AGRADECIMENTOS

*A todos os queridos **membros do Laboratório de Hematologia e Células-tronco**. É muito importante saber que ao entrar no laboratório 304G encontro não só colegas de trabalho, mas sim amigos. Amigos com os quais pude compartilhar vários momentos de descontração e que também sempre estiveram disponíveis para ouvir inúmeros desabaços. “Corroborando com o que foi proposto por Steffens (2012), vocês são pessoas especiais e juntos formamos um grupo muito bom, seja na bancada do laboratório ou na mesa de um bar!”*

*Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a **Dani** e principalmente a **Anne**, “companheira fiel” de PGCIMAT. Viver a angústia dos momentos de pré-prova ou pré-dissertação foi muito mais fácil na companhia de vocês.*

Aos também co-autores deste trabalho.

***Pedro**, pela tranquilidade e auxílio durante todos os experimentos com suas “1001 centrifugações” e, **Gerson**, por até mesmo trocar seu “futebolzinho” do sábado à tarde por uma sala fechada de laboratório. Obrigada!*

*Às queridas bolsistas **Fernanda Zamboni** e **Virgínia Helfer**. *Fer*, sua ajuda durante a execução deste trabalho foi indispensável. Obrigada por toda a paciência dedicada aos experimentos, tanto os que realizamos juntas, como aqueles que, competentemente, realizou sozinha. *Virgi*, não poderia deixar de agradecer o auxílio em inúmeros momentos de correria e que disponibilmente me “socorreu”. *Thanks!**

*Ao doutorando **Douglas Gamba**, pelas inúmeras explicações e conhecimento na área de polímeros.*

*Ao mestre **Vinicius Piztor** e à Prof.^a **Raquel Santos Mauler**, pela ajuda com as análises de DMA.*

*Aos alunos **Gabriela Lando** e **Matheus Titton**, pelo auxílio com os testes de ângulo de contato.*

AGRADECIMENTOS

*Ao professor **Dr. João Antônio Pegas Henriques**, do departamento de Biofísica da UFRGS, e ao laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, representado pela **Dr^a. Dinara Moura** e pela professora **Dr^a. Jenifer Saffi**, pelas análises de ensaio cometa.*

*À técnica **Fabiana Grosser** e ao Prof. **Dr. César Petzhold**, pelas análises de GPC.*

*Às técnicas **Simone e Fernanda**, por manterem o bom funcionamento do laboratório. A ajuda de vocês é indispensável.*

*Às “divas”: **Marina, Pri, Flávia, Jéssica, Vanessa** e, em especial, **Ju, Laura, Manu e Pati**. Agradeço o privilégio que a vida me concedeu de tê-las como amigas. Obrigada por me acolherem e serem minha segunda família em Porto Alegre. Pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Vocês são os grandes presentes que a faculdade me trouxe, obrigada por sempre poder contar com vocês!*

*À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais** pela excelência em ensino.*

*À **CAPES**, pelo apoio financeiro com a bolsa de Mestrado.*

*Ao **Instituto de Pesquisa com Células-tronco** pelo apoio financeiro, contribuindo com a aprendizagem e formação de profissionais mais capacitados.*

*A **Deus**, por colocar pessoas tão maravilhosas em meu caminho.*

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Engenharia de tecidos	3
2.2. Células-tronco	4
2.3. Biomateriais e <i>scaffolds</i>	5
2.4. Poli(ácido láctico- <i>co</i> -ácido glicólico)	6
2.5. <i>Electrospinning</i>	7
2.6. Semeadura de células em <i>scaffolds</i> e o <i>bio-electrospraying</i>	9
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1. Obtenção, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais	15
4.2. <i>Bio-electrospraying</i> de células-tronco mesenquimais e avaliação da viabilidade celular	155
4.3. Impacto do tempo de <i>bio-electrospraying</i> sobre as células-tronco mesenquimais	16

4.4. Produção de <i>scaffolds</i> contendo células-tronco através da associação dos métodos de <i>electrospinning</i> e <i>bio-electrospraying</i> _____	188
4.5. Caracterização físico-química dos <i>scaffolds</i> contendo células-tronco _____	19
4.6. Caracterização biológica dos <i>scaffolds</i> contendo células-tronco _____	211
4.7. Análise estatística _____	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	24
5.1. Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais _____	24
5.2. <i>Bio-electrospraying</i> de células-tronco mesenquimais e avaliação da viabilidade celular _____	25
5.3. Impacto do tempo de <i>bio-electrospraying</i> sobre as células-tronco _____	29
5.4. Produção dos <i>scaffolds</i> contendo células-tronco _____	37
5.5. Características físico-químicas dos <i>scaffolds</i> contendo células-tronco _____	40
5.6. Características biológicas dos <i>scaffolds</i> contendo células-tronco _____	51
6. CONCLUSÃO _____	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	63
ANEXOS _____	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação da estrutura química do poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico).
- Figura 2. Representação do aparato básico para o *electrospinning* (adaptado de Boudriot e colaboradores, 2006).
- Figura 3. Representação do aparato para *electrospinning* e *bio-electrospraying*.
- Figura 4. Fluxograma da metodologia experimental para a produção de *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT).
- Figura 5. Diferenciação celular *in vitro*: (A) grupo controle – células não submetidas à diferenciação, (B) condrogênica, (C) adipogênica (setas indicam os depósitos lipídicos) e (D) osteogênica.
- Figura 6. Influência da tensão elétrica de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais; Valor significativo em relação ao controle (0kV) com *P<0,05 e *** P<0,001 (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).
- Figura 7. Influência da vazão de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais; *** Valor significativo em relação ao controle com P<0,001 (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).
- Figura 8. Influência da distância de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais mostrando não haver diferença significativa (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

- Figura 9. Influência da distância de *bio-electrospraying* sobre o número de células recuperadas; ^a Valor significativo entre os grupos com $P < 0,05$ (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).
- Figura 10. Influência do tempo de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais mostrando não haver diferença significativa (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).
- Figura 11. Células-tronco mesenquimais submetidas ao *bio-electrospraying* após 1 dia de cultivo. (A) grupo controle, (B) CTMs submetidas a 15 minutos de BES, (C) CTMs submetidas a 30 minutos de BES e (D) CTMs submetidas a 60 minutos de BES.
- Figura 12. Avaliação do metabolismo/proliferação das células-tronco mesenquimais após *bio-electrospraying*; *** Valor significativo entre os períodos de cultivo com $P < 0,001$. Dentro de cada período de cultivo não foram observadas diferenças significativas intergrupos (ANOVA de medidas repetidas).
- Figura 13. Diferenciação condrogênica, adipogênica (setas indicando vacúolos lipídicos) e osteogênica de CTMs submetidas a 15, 30 e 60 minutos de *bio-electrospraying* (BES); Controle positivo: células não submetidas ao BES; Controle negativo: células mantidas em meio de expansão e não induzidas à diferenciação.
- Figura 14. Análise da população celular por citometria de fluxo: (A) controle, (B) células submetidas a 15 minutos de *bio-electrospraying* (BES), (C) células submetidas a 30 minutos de BES e (D) células submetidas a 60 minutos de BES. (SSC: *side scatter*, FSC: *forward scatter*)
- Figura 15. Avaliação de dano ao DNA nas células-tronco mesenquimais após 15, 30 e 60 minutos de *bio-electrospraying* (n=3). (A) células cultivadas por 1h antes da realização do ensaio cometa, (B) células cultivadas por 3h antes da realização do

ensaio cometa e (C) células cultivadas por 5h antes da realização do ensaio cometa. Valor significativo entre os grupos com * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

Figura 16. Avaliação de dano ao DNA nas células-tronco mesenquimais submetidas ao *bio-electrospraying* após 1, 3 e 5 horas de incubação (n=3). Valor significativo entre os grupos com * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (ANOVA seguido do pós-teste Tukey). A redução do ID sugere reparo do DNA.

Figura 17. Análise de produção de espécies reativas de oxigênio em células-tronco mesenquimais após *bio-electrospraying* (BES) mostrando não haver diferença significativa (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

Figura 18. Produção de *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT), (A) aparato utilizado para a sua produção, (B) SCCT produzido.

Figura 19. Morfologia apresentada pelas fibras nos *scaffolds* controle (A e B) e nos *scaffolds* contendo células-tronco (C e D).

Figura 20. Distribuição do diâmetro das fibras nos *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT) e nos *scaffolds* controle (SC).

Figura 21. Distribuição do tamanho dos poros nos *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT) e nos *scaffolds* controle (SC).

Figura 22. Perfil de degradação: avaliação de perda de massa molecular no período de 45 dias (SCCT=*scaffolds* contendo células-tronco; SC=*scaffolds* controle).

Figura 23. Análise termogravimétrica de uma amostra de *scaffold* controle de PLGA.

- Figura 24. Curvas de tensão-deformação representativas do comportamento mecânico dos *scaffolds* controle (SC) e dos *scaffolds* contendo células-tronco X (SCCT-X) e Y (SCCT-Y).
- Figura 25. Caracterização mecânica dos *scaffolds* controle (SC) (n=5) e dos *scaffolds* contendo células-tronco X (SCCT-X) (n=3) e Y (SCCT-Y) (n=2). (A) Módulo de Young; (B) Tensão máxima; (C) Elongação máxima; ^{a, c} Valor significativo entre os grupos com P<0,05; ^b Valor significativo entre os grupos com P<0,01 (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).
- Figura 26. Viabilidade celular após *bio-electrospraying* (BES) e após associação do BES ao *electrospinning* (ES); * Valor significativo entre os grupos com P<0,001 (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).
- Figura 27. (A) Proliferação celular nos *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT) no período de 15 dias; ^{a,b} Valor significativo entre os grupos (a = P<0,001 e b = P<0,01) (ANOVA seguido do pós-teste Tukey); (B) cristais de formazan impregnados nos SCCT (indicados pelas setas pretas) após adição de DMSO para 15 dias de cultivo.
- Figura 28. Análise em microscopia eletrônica de varredura da integração celular nos *scaffolds* contendo células-tronco ao longo de seu cultivo *in vitro*. (A e B) 0 horas em cultivo, (C e D) 1 dia em cultivo (setas vermelhas demonstram as células em meio a rede de fibras, setas amarelas indicam as expansões celulares formando “pontes” entre fibras adjacentes dos *scaffolds*), (E e F) 7 dias em cultivo e (G e H) 15 dias em cultivo.
- Figura 29. Análise em microscópio confocal dos *scaffolds* contendo células-tronco em (A) e (B) 1 dia de cultivo, (C) e (D) 7 dias de cultivo, (E) e (F) 15 dias de cultivo. As imagens foram capturadas com objetiva de 40x e zoom de 2x e mostraram a

marcação nuclear com DAPI e a marcação do citoesqueleto com faloidina/rodamina.

Figura 30. Corte histológico dos *scaffolds* contendo células-tronco após 1 dia de cultivo demonstrando que as células se distribuíram heterogeneamente por toda a espessura do biomaterial. (A) fragmento do SCCT e (B) SCCT reconstituído.

Figura 31. Corte histológico dos *scaffolds* contendo células-tronco após 15 dias de cultivo demonstrando que as células estavam distribuídas homogeneamente em toda a arquitetura do biomaterial.

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Estudos realizados com *bio-electrospraying*

Tabela II. Perfil imunofenotípico das células-tronco mesenquimais (CTMs) após *bio-electrospraying* (BES) (n=3)

Tabela III. Parâmetros utilizados para a produção de *scaffolds* contendo células-tronco

Tabela IV. Características dos *scaffolds* produzidos

LISTA DE ABREVIATURAS

Asap	Ácido ascórbico-2 fosfato
ANOVA	Análise de variância
BES	do inglês <i>Bio-electrospraying</i>
CMF-PBS	Solução tampão de fosfato salino livre de cálcio e magnésio
CT	Célula-tronco
CTM	Células-tronco mesenquimais
DAPI	do inglês <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DCF	Diclofluoreceína
DCM	Diclorometano
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ES	do inglês <i>Electrospinning</i>
ET	Engenharia de tecidos
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FSC	do inglês <i>Forward Scatter</i>
GPC	do inglês <i>Gel Permeation Chromatograph</i>
FITC	do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HE	Hematoxilina e eosina
Hepes	n-2 hidroxietil piperazine- n'- 2 ácido sulfônico etano
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
ID	Índice de dano
IMDM	Meio de Dulbecco modificado por Iscove
kDa	Quilo Dalton
kN	Quilo Newton

kV	Quilo volt
mg/mL	miligrama por mililitro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
m/v	Massa/volume
MTT	Método do sal de tretazolium
N	Newtons
n	número de amostra
°C	Graus Celsius
°C/min	Graus Celsius por minuto
OCT-4	do inglês <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PBS	Solução tampão de fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffer solution</i>)
PE	do inglês <i>Phycocitrin</i>
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLLA	Poli(L-ácido láctico)
PM	Peso molecular
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
SC	<i>Scaffolds</i> controle
SCCT	<i>Scaffolds</i> contendo células-tronco
SFB	Soro fetal bovino
Sox2	do inglês <i>Sex-determining region Y-box 2</i>
SSC	do inglês <i>Side Scatter</i>
SSEA-1	do inglês <i>Stage-specific embryonic antigen-1</i>
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês <i>Termogravimetric Analysis</i>)
TGFb1	do inglês <i>Transforming growth factor beta 1</i>
THF	Tetrahidrofurano
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V	Volt
WST	do inglês <i>Water soluble Tetrazolium salts</i>
XTT	do inglês (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)
7AAD	7-Amino Actinomicina D

RESUMO

Os *scaffolds* produzidos por *electrospinning* (ES) são ferramentas bastante atrativas para a engenharia de tecidos (ET). Mimetizando fisicamente a matriz extracelular natural, esses *scaffolds* atuam como suportes para o desenvolvimento celular. Contudo, uma ocupação celular uniforme nesses *scaffolds* permanece sendo um problema a ser resolvido. Neste trabalho, células-tronco foram integradas a *scaffolds* de PLGA ainda durante a sua produção com o objetivo de se obter uma melhor distribuição celular por toda a estrutura do biomaterial. Para a obtenção desses *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT), as técnicas de ES e *bio-electrospraying* (BES) foram associadas. Os SCCT foram caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas e biológicas. As fibras produzidas apresentaram-se lisas, bem distribuídas e com características mecânicas e de degradação adequadas a diferentes aplicações na ET. As células integradas aos SCCT mantiveram-se viáveis e foram capazes de se proliferar dentro dessa estrutura ao longo do período de cultivo. Cortes histológicos dos SCCT demonstraram que as células estavam bem distribuídas em toda a arquitetura do biomaterial. Esses resultados sugerem que a associação do ES e BES é uma técnica interessante para a produção de *scaffolds* tridimensionais integrados a células, tornando-se uma alternativa viável para uso na engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Scaffolds produced by electrospinning (ES) are very attractive tools for tissue engineering (TE). These scaffolds act by mimicking physically the native extracellular matrix as carriers for cell growth. However, a uniform cell occupation of scaffolds remains a problem to be solved. In this study, stem cells were integrated into the PLGA scaffolds during their production in order to obtain better cell distribution throughout the biomaterial structure. The ES and bio-electrospraying (BES) techniques were associated to obtain these scaffolds containing stem cells (SCCT). The SCCT were characterized by their physicochemical and biological properties. Smooth and well distributed fibers, with suitable mechanical and degradation characteristics were obtained which allows different applications in TE. The cells incorporated onto SCCT remained viable and are capable of proliferating in this structure during cell culture. The cells were well distributed throughout the biomaterial architecture as observed in histological sections of SCCT. These results suggest that association between ES and BES is an interesting technique to produce 3D cell integrated scaffolds, making it a viable alternative for tissue engineering.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma área emergente, com aplicações clínicas encorajadoras. Através da combinação da terapia celular ao uso de biomateriais, essa tecnologia se mostra uma importante ferramenta a ser utilizada na reconstituição de órgãos e tecidos. Essa área tem atraído grande atenção como uma nova alternativa terapêutica para doenças de difícil tratamento pelos métodos atualmente existentes.¹

De natureza eminentemente interdisciplinar, a área de engenharia de tecidos inclui conceitos e tecnologias que vão da biologia celular à engenharia e ciências dos materiais. Essa área envolve o uso de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que atuam como matrizes para o crescimento celular, chamadas de *scaffolds*. Os *scaffolds* são suportes nos quais células, como por exemplo, as células-tronco, podem ser cultivadas com o propósito de construir um tecido *in vitro*. A estrutura do *scaffold* fornece sustentação mecânica ao desenvolvimento celular bem como permite o transporte de nutrientes, metabólitos, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias, tanto no sentido do meio extracelular para as células como o contrário.

Dentre as tecnologias existentes para a produção dos *scaffolds*, destaca-se a de *electrospinning*, que se caracteriza pela produção de *scaffolds* formados por fibras que conseguem mimetizar, fisicamente, a matriz extracelular natural, proporcionando um microambiente favorável ao desenvolvimento celular. O *electrospinning* tem seu funcionamento baseado no princípio eletrostático. Nessa técnica, fibras com diâmetros variando de micrometros até poucos nanômetros são formadas a partir de soluções poliméricas sob aplicação de um campo elétrico.²

O poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) é um polímero que tem sido amplamente empregado na produção de *scaffolds* pelo método de *electrospinning*. Esse polímero, além de biodegradável, bioreabsorvível e biocompatível, já foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em humanos. Ainda, diferentes estudos mostraram que *scaffolds* produzidos a partir de PLGA foram capazes de suportar o crescimento de diferentes tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, condrócitos e células-tronco.^{3, 4, 5, 6,}

Muitos problemas ainda desafiam a engenharia de tecidos como a semeadura e colonização celular homogênea dos *scaffolds*. Essas duas etapas são cruciais para que se tenha sucesso na construção de um tecido *in vitro*. Sabe-se que é fundamental que as células ocupem uniformemente toda a unidade do *scaffold* para assim proporcionar a completa formação do tecido a ser regenerado.⁸

Atualmente, a maior parte dos grupos de pesquisa utiliza o modo estático de semeadura celular como método de integração das células aos *scaffolds*. Nesse método convencional, primeiramente o *scaffold* é produzido e posteriormente as células são semeadas sobre o mesmo. Apesar de ser bastante simples, essa técnica apresenta algumas desvantagens que estão relacionadas à pobre infiltração celular por toda a profundidade da matriz e, ainda, à distribuição não homogênea das células na estrutura tridimensional do biomaterial.⁹ Com base nesse fato, outras técnicas de integração das células aos biomateriais têm sido propostas.

O *bio-electrospraying* é uma tecnologia utilizada para o processamento de suspensões contendo células ou, até mesmo, organismos multicelulares. Essa técnica também se baseia no princípio eletrostático, onde a bio-suspensão é submetida a um campo elétrico de alta intensidade e, então, ao passar por uma fina agulha, é fragmentada, gerando pequenas gotículas contendo os organismos vivos.¹⁰⁻¹¹

Dessa forma, a combinação das técnicas de *bio-electrospraying* e *electrospinning* mostra-se uma alternativa interessante para a integração de células a biomateriais. A partir da associação desses dois métodos, as células são integradas aos *scaffolds* durante a sua construção. Enquanto as fibras são formadas por *electrospinning*, as células vão sendo liberadas pelo *bio-electrospraying*, formando, ao final desse processo, um *scaffold* já celularizado.¹²⁻¹³ Nesse contexto, o presente trabalho científico visa produzir *scaffolds* biocompatíveis, já incorporados com células-tronco mesenquimais através da combinação desses dois métodos. A expectativa é que as células consigam ser distribuídas homogeneamente por toda a arquitetura do *scaffold*, formando um verdadeiro sistema tridimensional para ser utilizado na engenharia de tecidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENGENHARIA DE TECIDOS

O aumento da expectativa de vida, assim como a busca por sua melhor qualidade, cria a necessidade do desenvolvimento de alternativas para o reparo ou substituição de tecidos ou órgãos gravemente danificados ou perdidos por patologias e traumas.^{1, 14}

Tradicionalmente, para o tratamento de quadros envolvendo perdas teciduais ou falências de órgãos, as alternativas mais utilizadas são os transplantes, a reconstrução cirúrgica ou a utilização de implantes. Apesar de esses métodos apresentarem enormes aplicações, agregando funcionalidade, os mesmos apresentam limitações, tornando-se soluções imperfeitas.^{1, 14} Nesse contexto, uma nova área na medicina, a bioengenharia, vem se tornando cada vez mais importante e liderando as pesquisas na área de desenvolvimento de tecidos artificiais.

A bioengenharia, ou engenharia de tecidos, é uma ciência interdisciplinar, baseada na fusão dos princípios da engenharia, ciências dos materiais e das ciências da saúde, tendo como objetivo criar, reparar ou substituir tecidos e órgãos lesados. Com isso, é fundamentada no uso de três ferramentas básicas: células, biomateriais e fatores de crescimento.¹⁵ As células são responsáveis pela secreção de matriz para a formação do novo tecido enquanto que o biomaterial tem a função de fornecer suporte e um ambiente adequado para que as células cumpram eficazmente seu propósito. Já, as moléculas biologicamente ativas podem ser adicionadas ao conjunto a fim de auxiliar e estimular as células na regeneração tecidual.¹

A expectativa atual é que a engenharia de tecidos revolucione o tratamento de pacientes com algum tipo de comprometimento tecidual e contribua, significativamente, com as ciências da saúde no próximo milênio. Espera-se que essa ferramenta possibilite a regeneração de tecidos danificados por doenças como câncer, diabetes, lesões medulares, tratamento dentários, queimaduras, traumas e outras.¹⁶

2.2. CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) são um tipo celular não especializado, com capacidade de autorrenovação e que podem manter-se por longos períodos de tempo com o potencial de diferenciação em uma linhagem celular com funções especializadas. Esse fato faz com que as CT representem uma parcela muito importante da medicina regenerativa e da engenharia de tecidos.¹⁷

As CT são divididas basicamente em dois grandes grupos: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas. As células-tronco adultas têm sido consideradas uma alternativa ao uso das células-tronco embrionárias, devido à sua maior disponibilidade, facilidade de obtenção, cultivo e menores implicações bioéticas.

Dentre as células-tronco adultas, encontram-se as células-tronco mesenquimais (CTMs), que estão presentes na medula óssea e em muitos outros tecidos. A CTM é um dos tipos mais interessantes de células-tronco adultas. Essa célula exibe grande plasticidade, podendo diferenciar-se em diferentes tipos celulares como os que originarão ossos, cartilagens, músculos, derme, gordura, estroma de medula óssea e de outros tecidos. Assim, as CTMs podem ser utilizadas para o reparo de diversos tecidos através dos princípios e práticas da engenharia de tecidos. Além disso, as CTMs secretam um amplo espectro de moléculas bioativas com funções imunorreguladoras que atuam auxiliando na estruturação de um microambiente regenerativo no local da lesão tecidual.¹⁸ Devido a essas características, esse tipo celular foi escolhido para ser empregado no presente estudo, tendo como fonte de isolamento, o tecido pulpar de dentes decíduos.

O dente decíduo é uma fonte atraente para obtenção de CTMs visto que é um material que seria naturalmente descartado, sendo assim considerado um processo de obtenção não invasivo. Além disso, as CTMs de dentes decíduos são facilmente isoladas e cultivadas *ex vivo*.¹⁹ Em seu estudo, Miura e colaboradores atribuíram a essas células maior potencial de proliferação e clonogenicidade, quando comparadas às células-tronco de polpa de dentes permanentes e às células-tronco da medula óssea.²⁰

2.3. BIOMATERIAIS E SCAFFOLDS

Um biomaterial pode ser definido como um material destinado a fazer a interface com os sistemas biológicos, com intuito de avaliar, tratar, aumentar ou substituir um órgão, tecido ou função do organismo.²¹ Na engenharia de tecidos, os biomateriais atuam como *scaffolds*, estruturas que agem como um suporte para o crescimento celular a fim de auxiliar na regeneração ou construção de um novo tecido.

Os *scaffolds* fornecem uma arquitetura tridimensional onde as células semeadas podem se organizar, desenvolvendo um tecido artificial para posterior uso clínico. Essas estruturas fornecem um suporte biomecânico inicial para o tecido implantado até que as células consigam produzir uma matriz extracelular adequada. Durante a formação, deposição e organização da matriz recém-gerada, espera-se que o *scaffold* vá sendo degradado e metabolizado, deixando que o tecido ou órgão seja reestabelecido, mantendo ou melhorando sua função.²² Idealmente, para que possa ser aplicado na engenharia de tecidos, um *scaffold* deve apresentar diferentes propriedades consideradas essenciais: (1) conter poros interligados, com escala adequada, a fim de favorecer a conexão das células ao tecido em desenvolvimento, bem como o transporte de nutrientes e metabólitos; (2) ser desenvolvido a partir de materiais com taxas de biodegradação ou bioabsorção controladas para que assim possam ser degradados à medida que ocorre a formação do novo tecido; (3) apresentar uma superfície química adequada que favoreça a adesão, proliferação e a diferenciação celular; (4) apresentar propriedades mecânicas adequadas ao manuseio e ao local de implantação; (5) ser biocompatível, não levando a qualquer resposta adversa e (6) ser facilmente produzido em uma variedade de formas e tamanhos.²³ O sucesso do desenvolvimento e organização dos tecidos depende dessas propriedades já que elas podem, eventualmente, ditar a adesão, diferenciação e viabilidade celular, o transporte de nutrientes e resíduos, e, ainda, a síntese e organização da matriz extracelular.

Dessa forma, a combinação da estrutura química do biomaterial e a técnica de processamento do mesmo proporcionam a formação de matrizes altamente complexas. Assim, a escolha de ambos deve ser feita rigorosamente a fim de se obter um *scaffold* com características ideais para o uso ao qual se destina.

Diferentes tecnologias podem ser empregadas para o processamento de biomateriais e produção de *scaffolds* porosos como, *foaming*, liofilização, *electrospinning*, entre outras.^{23,24}

De uma maneira geral, os biomateriais utilizados para a reconstrução tecidual são divididos em duas categorias: naturais e sintéticos.²⁵ Os biomateriais naturais, utilizados para a produção de *scaffolds* incluem componentes encontrados naturalmente na matriz extracelular natural como o colágeno, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos, hidroxiapatita. Os *scaffolds* produzidos a partir desses materiais apresentam semelhança com os componentes do tecido hospedeiro, além de bioatividade. Entretanto, os biomateriais naturais apresentam algumas desvantagens que limitam o seu uso na medicina regenerativa. Entre as desvantagens incluem-se o controle restrito de suas propriedades físico-químicas, a dificuldade de controlar sua taxa de degradação *in vivo*, os desafios envolvendo a esterilização do biomaterial e também as questões de purificação, as quais são necessárias para torná-los livres de contaminantes e patógenos em função das fontes de obtenção.^{26, 27}

Enquanto isso, os materiais sintéticos fornecem a versatilidade de criar microambientes tridimensionais com características ajustáveis, incluindo propriedades mecânicas, hidrofília/hidrofobicidade e degradabilidade.^{25, 27}

2.4. POLI(ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO)

Os poli(α -hidróxi-ácidos) são polímeros poliésteres alifáticos sintéticos, biodegradáveis e biocompatíveis que já são bastante utilizados nas diferentes áreas médicas. Como parte dessa classe, encontra-se o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), polímero já aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em humanos.²¹

O PLGA é um copolímero de ácido glicólico e ácido L ou DL lático (Figura 1) que apresenta suas propriedades conforme sua proporção de composição. O copolímero PLGA exibe a vantagem de ter um tempo de degradação intermediário entre o poli(ácido glicólico) (PGA) e o poli(L-ácido lático) (PLLA). O PLLA, em função de sua estrutura química, é menos suscetível à reação de hidrólise, implicando um maior tempo de degradação dessa macromolécula, quando comparado aos polímeros PGA e PLGA. Com a degradação do PLLA, partículas cristalinas são geradas, podendo essas, permanecer por longos períodos no interior das células bem como no espaço extracelular. A permanência dessas partículas pode ocasionar uma resposta celular no hospedeiro, com atração contínua de macrófagos e fibrócitos para o local onde o biomaterial está localizado.²⁸ Por outro lado, o PGA degrada tão

rapidamente que se torna inconveniente para a maioria das aplicações. Assim, o uso do copolímero PLGA apresenta a vantagem de se ter um tempo de degradação intermediário entre o PGA e o PLLA. Conforme a proporção existente entre os meros provenientes do ácido lático e do ácido glicólico, o PLGA pode apresentar tempos de degradação variando entre 1 e 6 meses, direcionando-o para aplicações mais específicas.²⁹⁻³⁰

No presente estudo, foi utilizado o poli(D,L-ácido lático-*co*-ácido glicólico) (75:25), um polímero amorfo, com temperatura de transição vítrea entre 50-55°C e que apresenta massa molecular na faixa de 66.000 a 107.000.³⁰

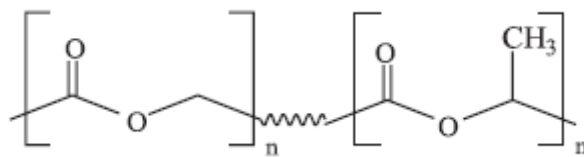


Figura 1. Representação da estrutura química do poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico).

O polímero PLGA degrada-se através da hidrólise das ligações ésteres, gerando como subprodutos os metabólitos orgânicos: ácido lático e ácido glicólico. A degradação segue com a metabolização desses subprodutos através do Ciclo de Krebs e eliminação através da urina e da respiração como CO₂ e H₂O. Dessa forma o polímero é reabsorvido e metabolizado.³⁰⁻³¹

O PLGA já foi utilizado como veículo para a produção de *scaffolds* com fatores de crescimento e drogas encapsuladas, como suporte para o crescimento de diferentes células tais como fibroblastos, osteoblastos, condrócitos e células-tronco em estudos para a regeneração de diferentes tecidos como pele, ossos e cartilagens.^{32, 3, 4, 5, 6, 7}

Pesquisas demonstram que os *scaffolds* produzidos a partir de PLGA exibem adesão e proliferação celular apropriadas, tornando esse polímero um substrato adequado para a engenharia de tecidos.^{6, 33}

2.5. ELECTROSPINNING

O *electrospinning* é uma técnica empregada por diversas áreas para a produção de estruturas formadas por fibras com diâmetros que podem variar de 3 nm até mais que 25 µm.

Entre as potenciais aplicações dos produtos obtidos por essa técnica estão membranas para filtração, eletrodos, indústria têxtil, catálise e *scaffolds* para uso na bioengenharia.^{34, 35}

Dois características atrativas do *electrospinning* são a versatilidade do método e a simplicidade de seu aparato. A técnica pode ser aplicada a um grande espectro de materiais tais como diferentes polímeros sintéticos ou naturais, ligas poliméricas, polímeros carregados com nanopartículas, cromóforos, enzimas, fatores de crescimento, metais, cerâmicas, assim como drogas ou outras moléculas biologicamente ativas.³⁶

Em geral, o sistema de *electrospinning* consiste em três componentes principais: uma fonte de alta tensão em corrente contínua, ligada eletricamente a um fluido (polímero em solução ou fundido), um dispositivo de infusão para realizar a injeção do fluido armazenado em seringa dotada de agulha metálica e um coletor.³⁷ A figura 2 ilustra o aparato básico para *electrospinning*.

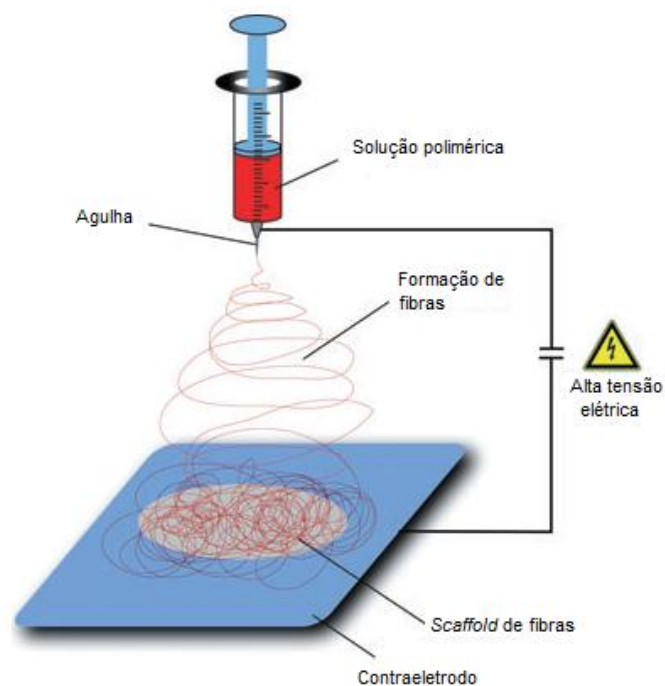


Figura 1. Representação do aparato básico para o *electrospinning* (adaptado de Boudriot e colaboradores, 2006).

O processo de *electrospinning* funciona pelo princípio eletrostático. Uma alta tensão é aplicada por meio de um eletrodo e um contraeletrodo, conectados à agulha metálica e ao prato coletor respectivamente. Dessa forma, um campo elétrico é criado entre os dois, ao

mesmo tempo em que a bomba de infusão força a saída da solução polimérica a um fluxo constante e controlado. Quando a alta tensão é aplicada, a gota de solução polimérica pendente se torna eletrificada e as cargas elétricas são distribuídas por toda a sua superfície. Como resultado, tem-se a deformação cônica da gotícula que colapsa, formando um jato que é libertado da agulha e acelerado em direção ao eletrodo oposto. Durante esse trajeto se tem a alongação do jato e evaporação do solvente, resultando em fibras que vão sendo depositadas sobre o prato coletor.³⁶⁻³⁷

Fibras com diferentes morfologias e diâmetros podem ser formadas através da manipulação dos diferentes parâmetros que controlam o processo de *electrospinning*. A força eletrostática, o fluxo da solução, a distância da agulha ao coletor, o *design* do coletor, as condições ambientais e as propriedades da solução polimérica são exemplos de tais parâmetros.^{34, 38}

Na bioengenharia, a técnica de *electrospinning* destaca-se pela produção de *scaffolds* que conseguem mimetizar estruturalmente e dimensionalmente as fibras de colágeno da matriz extracelular natural. Esses *scaffolds* são formados por nano e microfibras, apresentam um elevado número de poros interconectados e oferecem uma extensa área superficial em relação ao seu volume, favorecendo a adesão celular. Essas características fazem com que esses suportes artificiais formem microambientes biomiméticos para a cultura de células-tronco *ex vivo*.³⁹

2.6. SEMEADURA DE CÉLULAS EM SCAFFOLDS E O BIO-ELECTROSPRAYING

Para que o desenvolvimento de tecidos artificiais pela bioengenharia obtenha sucesso, é importante que as células consigam colonizar o *scaffold*. Isto é, além de as células se aderirem à superfície do *scaffold*, deverão conseguir migrar, proliferar e se diferenciar dentro dessa estrutura.¹² Assim, a semeadura celular, processo de incorporação de células no *scaffold*, realizado anteriormente ao cultivo ou implante deste, torna-se uma etapa fundamental na engenharia de tecidos. Um dos principais desafios dos pesquisadores dessa área é o desenvolvimento de uma técnica eficiente de semeadura celular, que garanta uma ocupação uniforme das células nos *scaffolds*, proporcionando a rápida e completa formação e remodelamento do tecido a ser regenerado.⁸ As características desejáveis para um método de

semeadura incluem uma distribuição celular homogênea, danos mínimos às células, tempo de semeadura reduzido e uma alta reprodutibilidade.⁴⁰

A semeadura celular estática, também chamada de semeadura de superfície, tem sido o método prevalentemente empregado na engenharia de tecidos. Esse procedimento sequencial consiste, primeiramente, na produção do *scaffold*, seguido, então, pela semeadura das células em sua superfície, com auxílio de uma micropipeta.⁸ Contudo, esse método apresenta algumas limitações relacionadas à infiltração celular por toda a espessura do *scaffold* e, ainda, à distribuição não uniforme das células pela estrutura tridimensional do mesmo.^{9, 41} Nos *scaffolds* produzidos por *electrospinning*, a permeação das células por entre suas fibras pode ser ainda mais complexa. O *electrospinning* apresenta uma tendência a formar fibras densamente empacotadas, influenciando na porosidade e tamanho dos poros dos *scaffolds*, muitas vezes inferior ao próprio tamanho celular.^{35, 42} Dessa forma, as células acabam se desenvolvendo somente sobre a superfície do biomaterial, comprometendo a sua distribuição através de toda a estrutura do *scaffold*.

Além disso, alguns trabalhos têm sugerido que o uso de uma elevada densidade celular inicial no biomaterial pode aumentar a estabilidade estrutural e a composição bioquímica dos tecidos artificiais. A alta celularidade aumenta o contato e a comunicação celular, essenciais para as funções dos tecidos *in vivo* e para a expressão fenotípica das células.⁴³ Mesmo em matrizes altamente porosas e com tamanho de poros adequados à migração celular, a obtenção de *scaffolds* com densidade celular elevada e homogênea em todo o seu volume seria um processo lento a partir da semeadura estática.

Para superar essas limitações, técnicas dinâmicas de semeadura e procedimentos de incorporação direta de células em *scaffolds* têm sido propostos. As técnicas de semeadura dinâmica utilizam biorreatores e agitação mecânica, onde as células, por convecção, são transportadas em direção aos *scaffolds*.⁴¹ Porém, o emprego desses dispositivos pode provocar danos celulares por envolver o uso de forças mecânicas que podem resultar em lise celular por cisalhamento, além de desencadarem a ativação de vias de apoptose celular.⁸

Os métodos de incorporação direta propõem que as células sejam integradas aos *scaffolds*, enquanto os mesmos ainda estão sendo produzidos. O jato aerodinâmico não elétrico⁴⁴, a liberação de células por aerosol⁴⁵, o *electrospinning* de células⁴⁶ e o *electrospraying* são alguns exemplos desses métodos. O *electrospraying* é uma técnica particularmente interessante pela possibilidade de combiná-la à de *electrospinning*.¹²

O *electrospraying*, também denominado “jato aerodinâmico”, é uma tecnologia na qual um meio líquido é submetido a um campo elétrico de alta intensidade e que, ao passar por uma fina agulha, é fragmentado, gerando gotas de tamanhos micrométricos. O tamanho e a distribuição das gotículas podem ser controlados com base na modulação da diferença de potencial elétrico e fluxo aplicados e, também, conforme as características do meio líquido utilizado.⁹ Em 2005, pela primeira vez, essa técnica foi utilizada para o processamento de células vivas, pelo grupo de Jayasinghe e colaboradores.^{47, 11} Nos últimos anos, essa metodologia tem sido explorada pelas áreas biológicas como uma maneira de processar suspensões contendo organismos vivos, chamando-a de *bio-electrospray* (BES).^{10,48}

Diferentes estudos já evidenciaram a capacidade do BES em manipular com sucesso diferentes tipos celulares, bem como organismos multicelulares. Na tabela I, destacam-se alguns dos principais estudos realizados com BES e seus resultados.

Tabela I. Estudos realizados com *bio-electrospraying*

Autor	Tipo celular	Principais resultados encontrados
J D Clarke e S N Jayasinghe ¹⁰	Embriões de zebrafish	Apresentaram desenvolvimento normal após submetidos ao BES
S Sahoo et. al ⁹	CTM de medula óssea de coelhos	Não tiveram redução significativa de sua viabilidade, proliferação ou plasticidade sob tensões entre 7,5 e 15 kV
R P Hall et. al ⁴⁹	Linfócitos T humanos	A cariotipagem demonstrou que os linfócitos não tiveram aumento significativo de danos aos cromossomos após o BES
A Eddaoudi et. al ⁵⁰	Astrocitomas	O BES não causou alterações na viabilidade, proliferação, perfil de ciclo celular e eletrofisiologia dessas células. Na análise proteômica, 3 proteínas tiveram alterações sutis em sua expressão, porém, todas inferiores a 1,5x o valor de <i>cut-off</i>
N A Carter et. al ⁵¹	Células de baço	Quando injetadas em ratos, essas células (após o BES) mantiveram a capacidade de migrar para os nódulos linfáticos inguinais sem causar qualquer sinal de estresse ou outro dano no animal
A Abeyewickreme et. al ⁵²	Células-tronco embrionárias murinas	O BES manteve inalterada a viabilidade e pluripotência (expressão de fosfatase alcalina, SSEA-1 e transcrição de Oct4, Sox2 e Nanog) dessas células

Esses estudos sugerem o desenvolvimento do BES como uma tecnologia viável a ser utilizada na terapia celular e no desenvolvimento de culturas tridimensionais para a engenharia de tecidos.

A associação das técnicas de *bio-electrospraying* e *electrospinning* mostra-se uma alternativa interessante para a produção de *scaffolds* já celularizados. Através da combinação dos dois métodos, as células podem ser integradas ao *scaffold* ainda durante a sua produção.¹²⁻¹³ Para isso, é adicionado ao aparato básico de *electrospinning*, um segundo dispositivo de infusão que realizará a injeção da suspensão celular armazenada em uma segunda seringa. Dessa forma, enquanto as fibras são formadas por *electrospinning*, as células vão sendo dispersas em jato pelo *bio-electrospraying*. Nesse aparato, deve ser utilizado um coletor giratório que garantirá o encontro das células e do biomaterial. Assim, ao final do processo, *scaffolds* já contendo células intercaladas entre suas fibras são obtidos, garantindo um verdadeiro sistema tridimensional para a bioengenharia. A figura 3 ilustra o aparato modificado para *electrospinning* e *bio-electrospraying*.

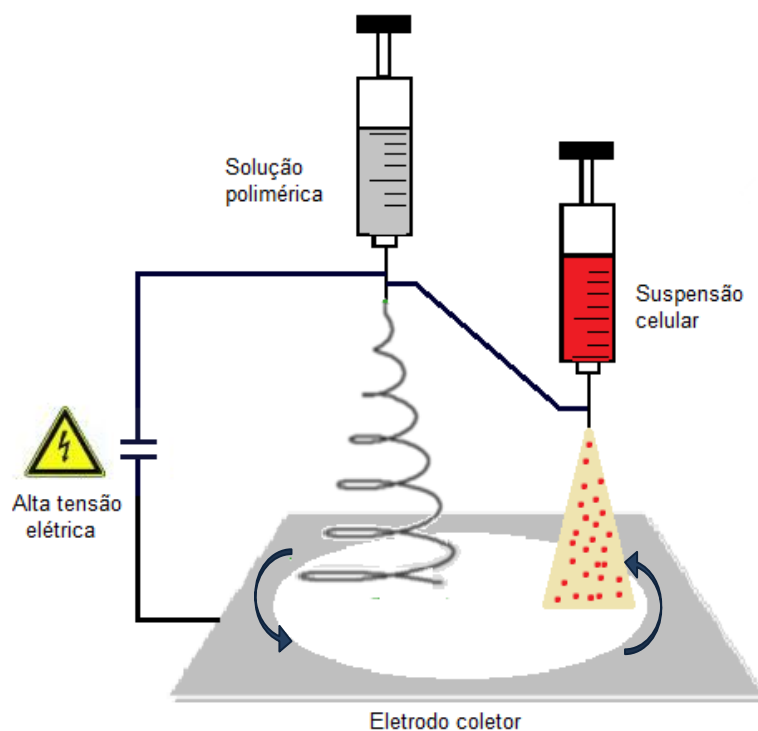


Figura 3. Representação do aparato para *electrospinning* e *bio-electrospraying*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir um *scaffold* já incorporado com células-tronco em sua estrutura, através da associação das técnicas de *bio-electrospraying* e *electrospinning*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Isolar, cultivar e caracterizar as células obtidas de dentes decíduos como células-tronco mesenquimais;
- 3.2.2. Avaliar o impacto da técnica de *bio-electrospraying* sobre as células-tronco mesenquimais de dentes decíduos em termos de viabilidade, metabolismo/proliferação celular, manutenção da plasticidade, perfil imunofenotípico, genotoxicidade e estresse oxidativo;
- 3.2.3. Construir *scaffolds* de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) contendo células-tronco mesenquimais em sua estrutura através da combinação das técnicas de *electrospinning* e *bio-electrospraying* para servir como base na engenharia de tecidos;
- 3.2.4. Determinar as propriedades físico-químicas dos *scaffolds* desenvolvidos tais como morfologia, diâmetro das fibras, espessura, perfil de degradação, propriedades mecânicas e ângulo de contato;
- 3.2.5. Estudar a interação das células-tronco mesenquimais com o biomaterial através de ensaios biológicos como proliferação, morfologia celular e análise histológica do *scaffold* produzido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia desse trabalho será descrita conforme os objetivos específicos propostos e está esquematizada no fluxograma da Figura 4. Cada etapa apresentada será detalhada nas seções subsequentes.

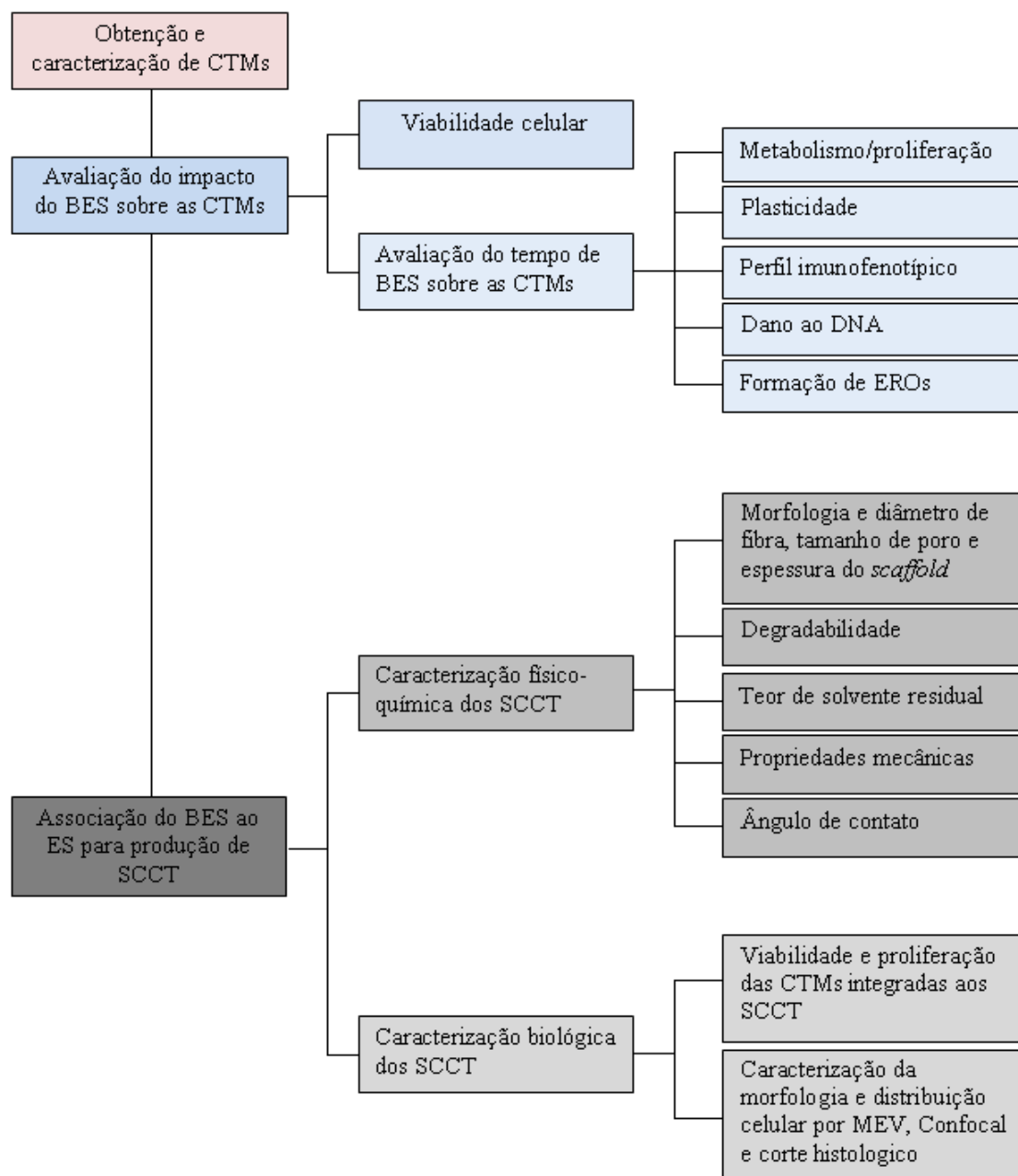


Figura 4. Fluxograma da metodologia experimental para a produção de *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT).

4.1. OBTENÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Para o desenvolvimento do presente trabalho, cinco culturas primárias de células-tronco mesenquimais de tecido pulpar foram estabelecidas. A obtenção, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais foram realizados conforme protocolos descritos no Anexo I.

4.2. *BIO-ELECTROSPRAYING* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para a manipulação das CTMs, o aparato de *electrospinning/bio-electrospraying* foi alocado no interior da capela de fluxo laminar vertical e, previamente a cada experimento celular, o equipamento foi desinfetado com álcool 70% e exposto à radiação ultravioleta durante 30 minutos.

Primeiramente, foram estabelecidos os parâmetros a serem utilizados para formação do *spray* a partir de suspensão celular. Os parâmetros – distância da agulha à placa coletora (4-8 cm), voltagem aplicada (15-30 kV) e vazão (0,28-2,60 mL.h⁻¹) – foram testados em função da viabilidade celular (n=4, em triplicata). Cada parâmetro foi avaliado individualmente, isto é, enquanto um variou, os demais foram mantidos constantes. As suspensões de CTMs em meio de cultivo com concentrações variando de 1 a 3x10⁶ células/mL foram preparadas, submetidas ao *bio-electrospraying* durante 15 minutos e então coletadas em placa de petri contendo também meio de cultura. Anteriormente a esse processo, a viabilidade celular foi determinada com Azul de Tripán 4% (Gibco) em hemocitômetro. Após, as células foram coletadas e centrifugadas a 300g por 5 minutos e então, a viabilidade foi novamente analisada com o corante. Células não submetidas ao procedimento de *bio-electrospraying* foram utilizadas como controle. Para melhor interpretação, os resultados foram expressos na forma de viabilidade corrigida. A viabilidade do grupo controle foi considerada 100% e, a partir dessa, a viabilidade dos grupos testes foi normalizada.

4.3. IMPACTO DO TEMPO DE *BIO-ELECTROSPRAYING* SOBRE AS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O tempo de BES que pode ser aplicado para manipulação de CTMs sem que essas sofram algum tipo de dano foi estudado em termos de viabilidade, proliferação celular, manutenção da plasticidade, perfil imunofenotípico, danos ao DNA e formação de espécies reativas de oxigênio. Para essas avaliações, o BES foi realizado a partir de uma suspensão celular com concentração de 3×10^6 células/mL com os parâmetros: 15 kV de voltagem, $0,46 \text{ mL.h}^{-1}$ de vazão e 4 cm de distância da agulha ao coletor, considerados adequados no experimento anterior. Os testes foram realizados em três diferentes tempos de BES: 15, 30 e 60 minutos. Após serem submetidas ao BES, as CTMs foram coletadas em placa de petri contendo meio de cultura e então centrifugadas a 300g por 5 minutos para obtenção de um concentrado celular. O número de células recuperadas após cada tempo de BES foi determinado em hemocitômetro e, então, as células foram ressuspensas novamente em meio de cultura e plaqueadas em placas de 24 poços. Para os ensaios de proliferação celular e avaliação da plasticidade, as células foram plaqueadas a uma densidade de $5.000 \text{ células/cm}^2$. Para a avaliação de dano ao DNA e formação de espécies reativas de oxigênio, foi utilizada uma densidade de $22.000 \text{ células/cm}^2$. Para a imunofenotipagem, as células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm^2 a uma densidade mínima de $5.000 \text{ células/cm}^2$. Como controle, foram utilizadas células não submetidas ao BES.

4.3.1. Avaliação do metabolismo/proliferação celular após o *bio-electrospraying*

O metabolismo/proliferação das células submetidas aos diferentes tempos de *bio-electrospraying* foi avaliado pelo método colorimétrico do Sal de Tetrazólium (MTT) (n=5). Após 1, 7, e 15 dias de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas com MTT $0,25 \mu\text{g/mL}$ em tampão CMF durante 2h a 37°C . Após esse período, a solução de MTT foi removida e os cristais formados foram solubilizados em $400 \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância obtida foi lida em espectrofotômetro (Wallac EnVision – Perkin Elmer) nos comprimentos de onda de 560 nm e 630 nm e os resultados foram calculados através da diferença entre as duas leituras (560nm – 630 nm). O princípio desse método se baseia na redução do sal tetrazólio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio) a cristais de MTT-formazan pela enzima mitocondrial succinil desidrogenase, ativa apenas em células vivas. A quantidade de cristais formados é proporcional ao metabolismo e

viabilidade celular, sendo esse teste utilizado como uma medida indireta de proliferação celular.⁵³

4.3.2. Avaliação da plasticidade celular após *bio-electrospraying*

Após atingirem a confluência adequada, as células foram induzidas à diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica da mesma maneira como descrito no Anexo I, item 3.2. Células não submetidas ao BES foram similarmente induzidas a diferenciar-se nas três linhagens (controle positivo) ou mantidas em meio HDMEM (controle negativo) (n=3).

4.3.3. Avaliação da manutenção do perfil imunofenotípico após *bio-electrospraying*

Após o *bio-electrospraying*, as CTMs foram avaliadas quanto à manutenção de seu perfil imunofenotípico. Para isso, foram plaqueadas e incubadas a 37°C a 5% de CO₂ durante 24h para exteriorização de seus marcadores. Após, foi seguido o protocolo de imunofenotipagem, conforme já descrito no Anexo I, item 3.3. (n=3).

4.3.4. Avaliação de dano ao DNA após *bio-electrospraying*

Após o *bio-electrospraying*, as CTMs foram avaliadas em termos de dano ao DNA através de ensaio cometa (n=3). Após permanecerem por 1, 3 e 5h em cultivo, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura completo. Então, 20 µL da suspensão celular foram misturados a agarose *low-melting* 0,75% e imediatamente aplicados em lâmina de vidro pré-tratada com agarose *normal melting* 1%. As lâminas foram deixadas a 4°C por aproximadamente 10 minutos para secagem da agarose. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de lise gelada (NaCl 2.5 M, Tris 10 mM, EDTA 100 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10.0) a 4°C durante, no mínimo, 1h, a fim de remover as membranas nucleares, deixando o DNA na forma de nucleóides. Após, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese horizontal e incubadas com solução de tampão (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH 13,0) a 4°C durante 15 minutos, a fim de permitir o desenrolamento do DNA e a expressão dos sítios lábeis-alcálico. Transcorrido esse período, a eletroforese foi conduzida por 20 min a 25 V (94 V/cm). Todas as etapas descritas acima foram realizadas sob luz amarela ou no escuro a fim de evitar danos adicionais ao DNA. As lâminas foram então neutralizadas (Tris 0,4M, pH 7,5) e coradas, utilizando coloração de prata conforme protocolo descrito por Nadin e colaboradores.⁵⁴ Terminada a etapa de coloração, as lâminas ficaram secando em temperatura ambiente e, então, foram analisadas em microscópio de luz. Foram

selecionadas e analisadas 100 células de cada amostra (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas que foram produzidas para cada amostra) em relação à migração de DNA. Essas células foram visualizadas e pontuadas conforme a extensão da cauda em 4 classes: (1) classe 0: não danificada, sem cauda; (2) classe 1: cauda mais curta que o diâmetro da cabeça do núcleo; (3) classe 2: cauda com comprimento 1 a 2 vezes maior que o diâmetro da cabeça; (4) classe 3: cauda 2 vezes maior que o diâmetro da cabeça; (5) Classe 4: cometas sem cabeças. A cada amostra, foi atribuído o índice de dano (ID). O ID é uma pontuação arbitrária que se baseia no número de células com diferentes classes de danos. A faixa de ID varia de 0 (células sem danos: 100 x 0) a 400 (células com migração máxima: 100 x 4). Quando selecionadas, as células em torno de bolhas de ar foram desconsideradas.

4.3.5. Avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio após *bio-electrospraying*

A produção de espécies reativas de oxigênio, nas células submetidas ao BES, foi investigada pelo ensaio de diclorofluoresceína (DCF) (n=3). Após 1h de cultivo, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 300g por 5 minutos. Após, o meio de cultura foi retirado e as células foram ressuspensas em 1mL de PBS 1X. Uma solução de DCF foi adicionada de forma que sua concentração final em cada amostra foi de 10 µM. Após, as amostras foram incubadas ao abrigo da luz, por 30 minutos. Transcorrido esse período, as amostras foram centrifugadas, lavadas com meio HDEM suplementado com 10% de SFB, centrifugadas novamente e ressuspensas em 400 µL de PBS 1x. Então, a leitura de fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo (FACS Aria) no canal FL1.

4.4. PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS CONTENDO CÉLULAS ATRAVÉS DA ASSOCIAÇÃO DOS MÉTODOS DE *ELECTROSPINNING* E *BIO-ELECTROSPRAYING*

A fim de produzir *scaffolds* já contendo células, os métodos de *electrospinning* e de *bio-electrospraying* foram associados. Para a combinação dos dois métodos, utilizou-se um aparato composto por dois sistemas de infusão independentes, dispostos em paralelo. As fibras foram produzidas a partir de uma solução polimérica pelo *electrospinning* enquanto que o *bio-electrospraying*, a partir de uma suspensão celular, fez a liberação das células que foram

se intercalando entre as fibras, formando um *scaffold* tridimensional. Para o encontro das fibras e das células, foi utilizado um coletor giratório.

As fibras foram produzidas utilizando-se poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (75:25) (PLGA) (Sigma-Aldrich). O polímero foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro-2-propanol (Sigma-Aldrich) de modo que a concentração final da solução foi de 20% (m/v). A seguir, a solução foi mantida em agitador magnético durante 24 horas para completa homogeneização. A solução de PLGA 20% (m/v) foi colocada em seringa de 1 mL equipada com agulha de diâmetro interno de 0,6 mm e então submetida ao processo de *electrospinning*. Para tal, foi utilizada uma diferença de voltagem de 15kV, vazão de 0,54 mL.h⁻¹ e distância da agulha ao coletor de 7,5 cm.

Paralelamente à formação das fibras, o BES foi realizado a partir de uma suspensão de CTMs de dentes decíduos com concentração variando entre 3 a 7,5 x 10⁶ células/mL. A suspensão celular foi preparada em meio de cultura HDMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina e estreptomicina e acondicionada em seringa de 2 mL acoplada à agulha com diâmetro interno de 0,45 mm. Para o BES, utilizou-se uma vazão de 2,60 mL.h⁻¹, distância da agulha ao coletor de 4cm e tensão de 15kV.

As fibras e as células foram coletadas em placa de petri, que estava disposta sobre prato coletor giratório a uma rotação de 60 rpm. Após 15 minutos, os *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT) em sua estrutura foram cobertos com meio de cultura e incubados a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂.

Para caracterização das fibras, análise termogravimétrica, ensaio de degradabilidade e propriedades mecânicas, “*scaffolds* controle” foram produzidos. Esses *scaffolds* foram confeccionados utilizando a mesma solução polimérica e parâmetros de *electrospinning* usados para a produção dos SCCT, contudo, sem realizar a combinação do ES com o BES.

Todos os experimentos foram realizados em condições ambientais controladas, com temperatura ambiente em torno de 25°C e com umidade relativa do ar em torno de 35%, no interior de capela de fluxo laminar vertical.

4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SCAFFOLDS CONTENDO CÉLULAS-TRONCO

4.5.1. Espessura dos *scaffolds*, tamanho de poro, morfologia e diâmetro das fibras

A morfologia das fibras foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM-6060). As imagens de MEV para os SCCT e *scaffolds* controle foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 kV, após as amostras terem sido metalizadas com camada de ouro. O diâmetro médio das fibras foi determinado utilizando o software ImageJ 1.38x. A partir das imagens obtidas por MEV, foram medidas 30 fibras de cada amostra (n=3). Para análise do tamanho de poro, o mesmo software foi utilizado. Para essa estimativa, 10 poros de cada imagem foram analisados, sendo que 2 medidas, em direções opostas, foram tomadas de cada poro. A espessura dos *scaffolds* foi medida com micrômetro digital (Digimatic Micrometer MDC-25MY - Mitutoyo) (n=3).

4.5.2. Degradabilidade

Após produzidos, os SCCT foram lavados vigorosamente com PBS para a remoção das células, colocados em tubos falcon contendo 10 mL de PBS 1X e então mantidos sob agitação (100 rpm) a 37°C e pH 7,4 durante períodos de 0 (amostra não submetida a teste de degradabilidade), 1, 7, 15, 30 e 45 dias. Após esses períodos, os *scaffolds* foram retirados do tampão, lavados repetidamente com água destilada e secados a 30°C. A cada 4 dias, o tampão foi trocado para manutenção do pH, evitando que a degradação fosse acelerada. As amostras foram avaliadas quanto às mudanças de peso molecular em cromatógrafo de permeação em gel (GPC) (Viscotek VE 2001) equipado com detector de índice de refração, viscosimétrico e por espalhamento de luz. Os *scaffolds* foram dissolvidos em tetrahidrofurano (THF) e eluídos a uma vazão de 1 mL/min, a 45°C. Um padrão de poliestireno foi utilizado para obtenção da curva de calibração primária. O mesmo estudo de degradabilidade foi conduzido com amostras de *scaffolds* controle (n=3).

4.5.3. Teor de solvente residual

O teor de solvente residual foi avaliado através da análise termogravimétrica (TGA) dos *scaffolds* controle (n=3). Os *scaffolds* de PLGA foram submetidos à temperatura de 25°C, durante 5 minutos, em atmosfera de nitrogênio. Após, seguiu-se um programa de aquecimento de 20°C/min, na faixa de temperatura compreendida entre 25 a 750°C e após, 70°C/min até 800°C. Para cada análise foram utilizadas matrizes com aproximadamente 10-12 mg (n=3). O equipamento utilizado foi o SDT Q600 – DSC – TGA simultâneo (TA Instruments) no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica – LAMAT da UFRGS.

4.5.4. Propriedades mecânicas

O módulo de Young e a tensão máxima foram determinados em SCCT e em *scaffolds* controle para caracterização mecânica desses materiais (n=5). Os ensaios de tensão-deformação foram realizados no Laboratório de Polímeros Avançados do Instituto de Química da UFRGS, no aparelho de análise dinâmico-mecânica (DMA) Q800 AT equipado com o dispositivo (*clamp*) *tension film* no modo DMA *Controlled Force*. Para essas análises, os *scaffolds* foram recortados com bisturi para obtenção de amostras retangulares com dimensões de 5 x 12 mm. Os testes foram realizados à temperatura constante de 37°C, com uma rampa de força de 0,5N/min até carga máxima de 18N, sob uma força estática de 0,005N.

4.5.5. Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato foi realizada em 3 amostras de filmes poliméricos de PLGA. O ângulo de contato foi medido em 3 locais diferentes de cada amostra. Em cada local, com auxílio de uma seringa, uma gota de água (aproximadamente 10 µL) foi instilada sobre a sua superfície e, em 5 segundos, uma imagem foi capturada. A partir dessa imagem, utilizando o *software* Surftens 3.0, o ângulo de contato foi determinado através da medida de 5 pontos dispostos ao redor da gota. Foram realizadas três medidas de cada imagem e o resultado foi apresentado na forma de média±desvio padrão. Os filmes poliméricos foram preparados a partir da solução polimérica de PLGA 20% m/v. Essa solução foi derramada sobre lamínulas de vidro e então, deixadas secar à temperatura ambiente durante 24h. Após, essas amostras foram armazenadas em dessecador até o momento da análise.

4.6. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS SCAFFOLDS CONTENDO CÉLULAS-TRONCO

4.6.1. Avaliação da viabilidade celular após combinação do *electrospinning* e *bio-electrospraying*

Após produzidos, os SCCT foram lavados com PBS 1X para remoção das células. O tampão de lavagem foi então centrifugado a 300g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o *pellet* obtido foi analisado em hemocitômetro com o corante azul de tripan. A viabilidade celular obtida foi comparada à viabilidade celular determinada anterior aos procedimentos de ES e BES (n=3, em triplicata).

4.6.2. Avaliação do metabolismo/proliferação das células integradas aos *scaffolds* por *electrospinning*/bio-*electrospraying*

Após sua produção, os SCCT foram incubados a 37°C, em atmosfera a 5% de CO₂, durante 4h. Após esse tempo, fragmentos com aproximadamente 1cm² foram cortados, colocados em placas de 24 poços e então ensaio de MTT foi conduzido utilizando protocolo descrito anteriormente. Simultaneamente, diferentes densidades de células da mesma linhagem utilizada para a produção dos *scaffolds* foram plaqueadas, incubadas durante 4h e analisadas por MTT. Assim, através da comparação das absorbâncias lidas para os *scaffolds* e para a curva de calibração celular, foi possível estimar o número de células integradas às fibras.

O metabolismo/proliferação nos *scaffolds* foi acompanhado ao longo de 15 dias. Seções de 1cm² foram cortadas no 1º, 7º e 15º dia de cultivo e analisadas pelo ensaio de MTT (n=3, em triplicata).

4.6.3. Distribuição celular nos *scaffolds* contendo células-tronco

A integração e distribuição das células nos *scaffolds* produzidos foi observada em MEV. Em 1, 7 e 15 dias de cultivo, as amostras de SCCT foram cortadas e fixadas com glutaraldeído 3% (n=3). Depois de lavadas uma vez com PBS, a desidratação das amostras foi realizada através de troca lenta de água, usando uma série de diluições de etanol (25%, 30%, 45%, 55%, 70%, 80%, 96%) por 2h com desidratação final em etanol absoluto por 2h, permitindo que as amostras secassem à temperatura ambiente. Os parâmetros utilizados para obtenção das imagens bem como a metalização das amostras foram realizadas da mesma maneira como descrito anteriormente (tem 4.5.1)

4.6.4. Morfologia celular

A morfologia das células integradas aos *scaffolds* foi observada através de microscopia confocal. Fragmentos de SCCT com aproximadamente 1cm² foram cortados no 1º, 7º e 15º dia de cultura (n=3). As células nos *scaffolds* foram lavadas uma vez com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS por 10 minutos e então coradas com 50 µg/mL de faloidina conjugada com rodamina por 40 minutos, para evidenciar os filamentos de actina do citoesqueleto. A coloração do núcleo celular foi realizada com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Após coloração com faloidina, as amostras foram lavadas 4 vezes com PBS e coradas com 0,5 µg/mL de DAPI durante 1

minuto. Imagens representativas de cada amostra foram capturadas através de microscópio confocal Olympus SV1000 com objetiva de 40x. A partir dessas imagens, selecionaram-se locais representativos para obtenção de zoom digital de 4x.

4.6.5. Análise histológica

A distribuição das células na estrutura dos SCCT foi analisada através de cortes histológicos desses *scaffolds* após 1 e 15 dias de cultivo (n=3). Após esses períodos, amostras de SCCT foram fixadas com paraformaldeído 4%, durante 30 minutos, desidratadas em uma série de diluições de etanol (30%, 55%, 70%, 88%, 96%, 100% por 30 minutos cada) e embebidas em parafina. Cortes de 5 µm foram realizados em micrótomo (E.Leitz Wetzlar), corados com hematoxilina e eosina (HE) e então analisados em microscópio óptico acoplado à câmera Olympus® - Qcolor 5, Coolet, RTV.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através da média±desvio padrão e o estudo de simetria de suas distribuições ocorreu pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de análise de variância (ANOVA) de uma via foi aplicado para avaliar as diferenças entre as médias das seguintes variáveis dependentes: propriedades mecânicas, viabilidade celular, número de células recuperadas após BES, genotoxicidade, formação de espécies reativas de oxigênio após BES e metabolismo/proliferação das células integradas aos SCCT. O teste de Tukey foi usado para comparações entre os diferentes grupos. Para análise do metabolismo/proliferação celular após BES, foi utilizado o teste de ANOVA – medidas repetidas. O perfil imunofenotípico foi avaliado através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. As comparações: tamanho de poro, diâmetro de fibras, espessura de *scaffolds* e degradabilidade entre os SCCT e os *scaffolds* controle foram analisadas através do teste de Mann-Whitney. Utilizou-se o software Prism 5. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células isoladas de dentes decíduos foram cultivadas e caracterizadas com sucesso. As células foram aderentes ao plástico e apresentaram morfologia tipo mesenquimal no cultivo *in vitro* (Figura 5A). Essas células foram diferenciadas em condrócitos, adipócitos e osteócitos de maneira bem sucedida.

Após 30 dias de cultivo em meio indutor, a coloração com Alcian Blue demonstrou a diferenciação condrogênica, revelando a presença de mucopolissacarídeos, característicos de condrócitos (Figura 5B). Posteriormente à indução adipogênica, o corante Oil Red mostrou a presença de depósitos lipídicos no citoplasma das células. Os depósitos lipídicos começaram a aparecer em torno de 6 dias de cultivo com meio indutor e aumentaram gradualmente a cada troca de meio até a fixação das células, após 21 dias (Figura 5C). Da mesma forma, após 15 dias de cultivo em indução, o corante Alizarin Red demonstrou a diferenciação osteogênica através da coloração dos depósitos de cálcio nas células (Figura 5D).

A análise de caracterização fenotípica mostrou que 99,6±2% das células expressaram CD29, 74±28% expressaram CD44, 99,5±0,5% expressaram CD73 e 99,6±2,3% das células expressaram CD90. Já, os marcadores CD14, CD34, CD45, CD184 e HLA-DR foram expressos em menos que 0,1% das células. O marcador STRO-1, marcador conhecido de células-tronco mesenquimais, praticamente não apresentou expressão, estando presente em apenas 0,1% das células. Já foi mostrado que as células-tronco mesenquimais isoladas a partir de dentes decíduos em processo de rizólise apresentam uma baixa expressão desse marcador. Contudo, a expressão de STRO-1 pode ser maior nessas células, visto que esse marcador pode estar internalizado na célula, como proposto por Bernardi e colaboradores.¹⁹ Sabe-se ainda que a expressão de STRO-1 é perdida durante a expansão das células em cultura, o que também pode ter contribuído para o resultado encontrado.⁵⁵

Dessa forma, a caracterização das células isoladas de polpa de dentes decíduos, através de sua morfologia, capacidade de aderência e de diferenciação e perfil imunofenotípico, comprovou seus atributos de células-tronco mesenquimais.

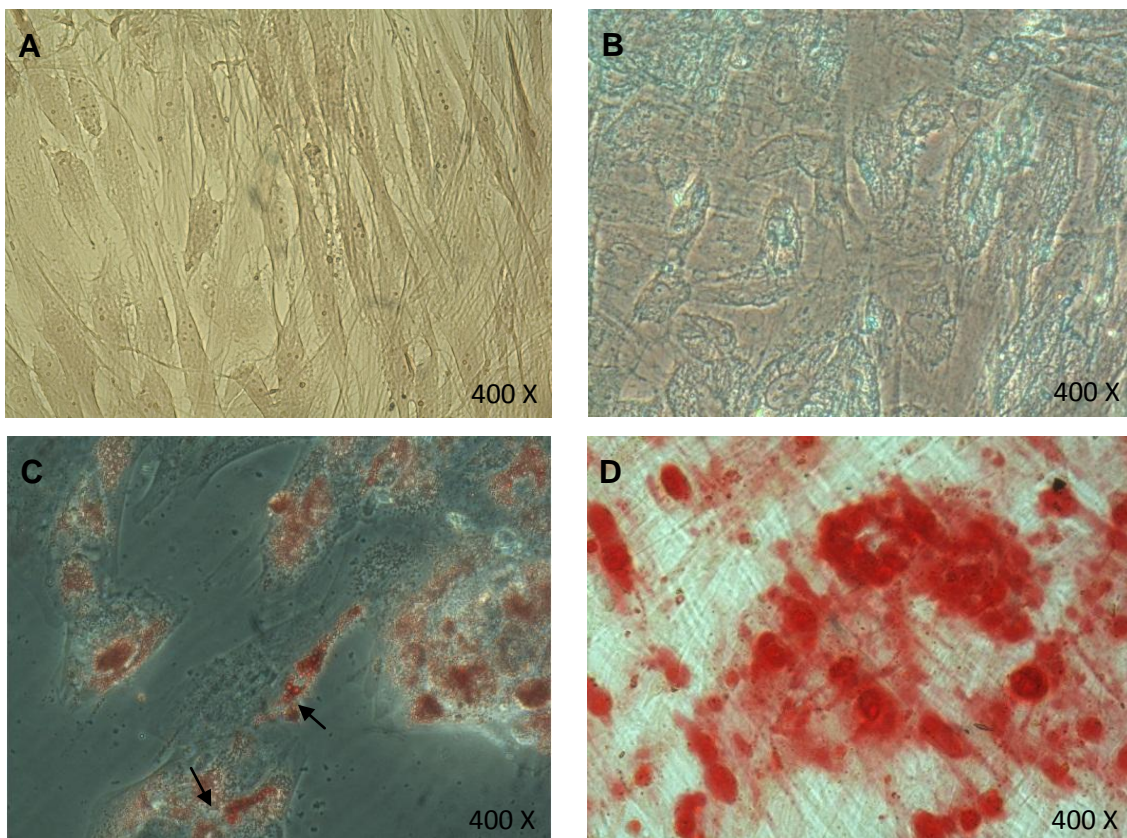


Figura 5. Diferenciação celular *in vitro*: (A) grupo controle – células não submetidas à diferenciação, (B) condrogênica, (C) adipogênica (setas indicam os depósitos lipídicos) e (D) osteogênica.

5.2. *BIO-ELECTROSPRAYING* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para o *bio-electrospraying*, concentrações de suspensão celular entre 1×10^6 e 3×10^6 células/mL foram testadas. A concentração de 3×10^6 células/mL foi escolhida por fornecer um número adequado de células coletadas para as análises de viabilidade celular.

A viabilidade celular foi avaliada após variação dos diferentes parâmetros do BES. Essa etapa foi realizada com o intuito de padronizar esse procedimento através da escolha de parâmetros que fossem condizentes com a formação do *spray* e que, ao mesmo tempo, não acarretassem danos celulares. Dessa forma, quando a técnica de BES fosse associada à de ES, obter-se-ia uma otimização da sobrevivência celular e um maior número de células viáveis seria integrado aos *scaffolds*.

Tensões elétricas entre 15 e 30 kV para o BES foram examinadas, sendo que, no contraeletrodo, sempre foi utilizada a tensão de -1kV. Quando tensões elétricas mais baixas que 15kV foram aplicadas, o *bio-electrospraying* não foi gerado ou tornou-se instável, com poucas gotas se dirigindo ao prato coletor. O uso de tensões elétricas entre 15 e 20kV para o BES não acarretou queda da sobrevivência celular das CTMs. Já, quando a tensão aplicada foi aumentada para 25 e 30 kV, a viabilidade celular foi reduzida significativamente em relação à viabilidade apresentada antes das células serem submetidas ao BES (0kV) ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente) (Figura 6). Resultados similares já foram previamente relatados, nos quais a aplicação de 30 kV de tensão elétrica ocasionou redução da viabilidade e também da proliferação de células-tronco mesenquimais de medula óssea.⁹ A aplicação de um potencial elétrico intenso durante o BES pode induzir a formação de poros e causar danos à membrana celular de maneira semelhante à técnica de eletroporação.⁹ Os mecanismos relacionados a esse dano celular envolvem fenômenos elétricos e térmicos. Sabe-se que a aplicação de uma tensão elétrica intensa provoca um potencial supra-fisiológico através da membrana celular, gerando uma alta corrente transmembrana. Resultados desse estresse incluem o aumento da permeabilização da membrana e disfunção das proteínas de membrana celular, especialmente as proteínas de membrana sensíveis à voltagem, como as bombas eletrogênicas e os canais iônicos dependentes de voltagem.⁵⁶ A permeabilidade aumentada da membrana por períodos prolongados gera a saída de potássio e de outros metabólitos, bem como a entrada de sódio e água, ocasionando um desequilíbrio osmótico na célula.⁵⁶ Esses efeitos se traduzem na perda da homeostasia celular e subsequente morte celular.⁹ Em função da tensão de 15 kV permitir a formação de um jato estável de BES e a viabilidade celular não ter sido alterada, essa foi a tensão utilizada para os demais experimentos.

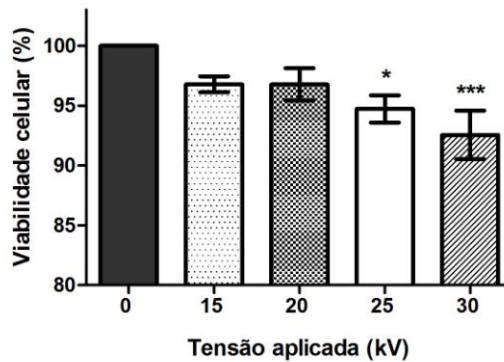


Figura 6. Influência da tensão elétrica de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais; Valor significativo em relação ao controle (0kV) com *P<0,05 e * P<0,001 (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).**

Na avaliação da influência da vazão utilizada para o BES sobre a viabilidade celular, observou-se que houve uma queda quando vazões de 0,28 e 0,65 mL.h⁻¹ foram utilizadas (p<0,001) (Figura 7). Contudo, acredita-se que não exista uma relação da sobrevivência celular e da vazão de BES já que não se observou aumento ou diminuição da viabilidade celular em função da variação desse parâmetro. Apesar de ser observada essa redução nos dois valores de vazão, deve-se destacar que a viabilidade celular foi mantida elevada, acima de 93%, para todos os grupos testados. Portanto, embora a diminuição tenha sido estatisticamente significativa, essa diminuição não tem importância fisiológica. A vazão de 0,46 mL.h⁻¹ foi utilizada para os demais experimentos.

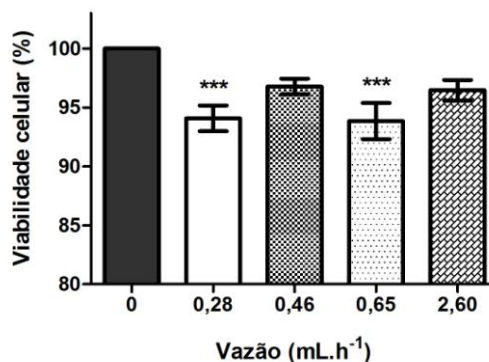


Figura 7. Influência da vazão de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais; * Valor significativo em relação ao controle com P<0,001 (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).**

A viabilidade celular elevada também foi mantida com o aumento da distância entre a agulha e o prato coletor (Figura 8). Um estudo anterior mostrou que a sobrevivência das células diminuiu significativamente ao se utilizar maiores distâncias para o BES. Quando a distância da agulha ao prato coletor foi aumentada de 6 para 11 cm, a viabilidade celular exibiu uma redução de cerca de 10%.¹² Nas condições em que o presente trabalho foi realizado, distâncias de até 8 cm foram favoráveis ao BES, não acarretando redução da sobrevivência das células ($p>0,05$). Contudo, quando as células coletadas foram contadas (recuperação celular), verificou-se que um maior número de células foi recuperado, quando a distância de 4 cm foi utilizada (Figura 9). Dessa forma, essa distância foi a escolhida para os demais experimentos.

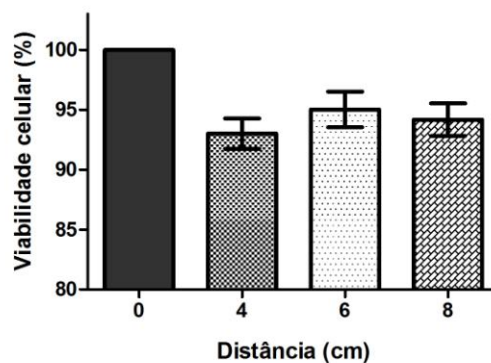


Figura 8. Influência da distância de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais mostrando não haver diferença significativa (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

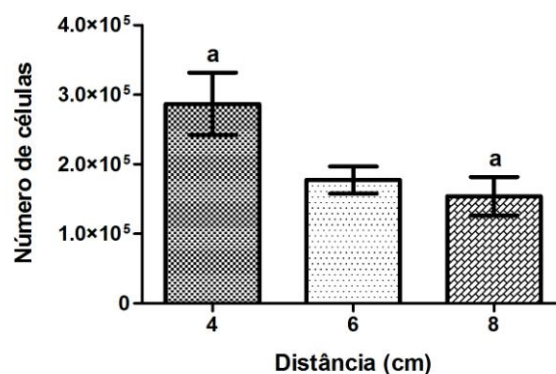


Figura 9. Influência da distância de *bio-electrospraying* sobre o número de células recuperadas; ^a Valor significativo entre os grupos com $P<0,05$ (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

Como pode ser visualizado na figura 10, quando as células foram submetidas a tempos mais prolongados de BES não houve redução da sobrevivência celular, não ocasionando diferenças em relação à viabilidade celular inicial.

O Anexo II demonstra os resultados de viabilidade, obtidos para cada um dos parâmetros avaliados anteriormente.

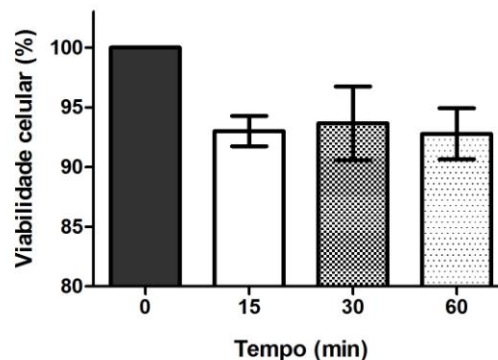


Figura 10. Influência do tempo de *bio-electrospraying* sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais mostrando não haver diferença significativa (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

5.3. IMPACTO DO TEMPO DE *BIO-ELECTROSPRAYING* SOBRE AS CÉLULAS-TRONCO

O impacto do tempo de BES sobre as CTMs foi avaliado com o intuito de verificar o período no qual as técnicas de *electrospinning* e *bio-electrospraying* poderiam ser associadas para a produção de SCCT sem que houvesse danos às células. Além disso, notou-se que, apesar de já se ter vários estudos envolvendo os efeitos do BES sobre diferentes tipos celulares, nenhum dos trabalhos analisados na revisão bibliográfica realizada fez esse tipo de avaliação. Ainda, quando citados, os tempos de BES utilizados em tais trabalhos, em sua grande maioria, não ultrapassavam 8,3 minutos.^{11, 47, 57} Visando à associação do BES ao *electrospinning*, com o aparato de ES disponível para a realização do presente trabalho, esse período de processamento acabaria sendo muito reduzido para a formação de um *scaffold* com estrutura adequada à manipulação e à engenharia de tecidos. Embora períodos mais prolongados de tempo de BES não tenham alterado a viabilidade das CTMs, esses fatores

contribuíram para a necessidade de uma investigação mais criteriosa em relação aos efeitos desse parâmetro no presente trabalho.

Após terem sido submetidas aos diferentes tempos de BES, as CTMs mantiveram a capacidade de aderência ao plástico, já observada logo após 1h do procedimento. As células submetidas ao BES apresentaram morfologia normal, tipo mesenquimal (Figura 11) e tornaram-se confluentes em 15 dias de cultivo, exibindo comportamento igual ao grupo controle. Em estudo onde células de astrocitoma foram utilizadas, demonstrou-se que o BES, apesar de aplicado por um período inferior aos testados no presente trabalho, não acarretou alterações na morfologia e na capacidade de aderência e proliferação desse tipo celular, corroborando com os resultados encontrados.⁵⁸

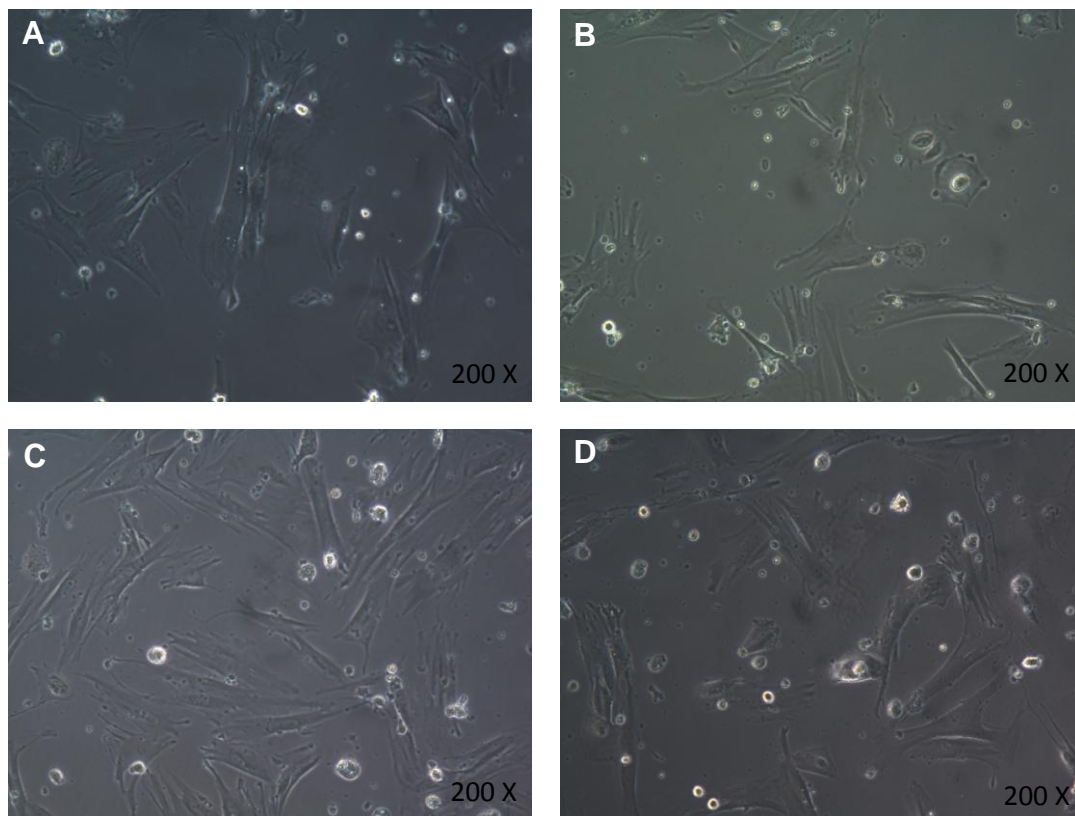


Figura 11. Células-tronco mesenquimais submetidas ao *bio-electrospraying* após 1 dia de cultivo. (A) grupo controle, (B) CTMs submetidas a 15 minutos de BES, (C) CTMs submetidas a 30 minutos de BES e (D) CTMs submetidas a 60 minutos de BES.

5.3.1. Avaliação de metabolismo/proliferação celular após *bio-electrospraying*

O teste de MTT mostrou que as células submetidas aos diferentes tempos de BES mantiveram-se viáveis ao longo dos 15 dias de cultivo, apresentando um aumento significativo de seu metabolismo/proliferação entre 1 e 7 dias e entre 7 e 15 dias. Todos os grupos avaliados apresentaram o mesmo perfil de metabolismo/proliferação. Como pode ser visualizado na figura 12, dentro de cada período de tempo avaliado, não foram encontradas diferenças no metabolismo/proliferação entre as células submetidas aos diferentes tempos de BES e entre essas e o grupo controle.

Esses resultados demonstram que as células não apresentam alteração em sua capacidade proliferativa, mesmo após terem sido expostas à tensão elétrica por períodos de tempo prolongados.

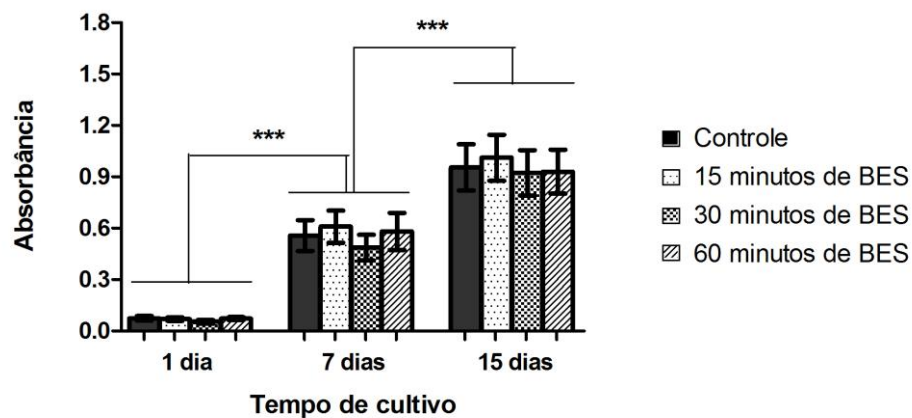


Figura 12. Avaliação do metabolismo/proliferação das células-tronco mesenquimais após *bio-electrospraying*; * Valor significativo entre os períodos de cultivo com $P < 0,001$. Dentro de cada período de cultivo não foram observadas diferenças significativas intergrupos (ANOVA de medidas repetidas).**

5.3.2. Avaliação da plasticidade celular após *bio-electrospraying*

Após o cultivo em meios indutores, as células submetidas ao BES mativeram sua plasticidade, sendo capazes de se diferenciar nas linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica, ao mesmo tempo em que as células não submetidas ao BES (controle positivo) (Figura 13). Esses resultados estão de acordo com estudo de outros autores que demonstraram

a capacidade de células-tronco mesenquimais em se diferenciar em condrócitos, adipócitos e osteócitos após submissão ao BES.⁹

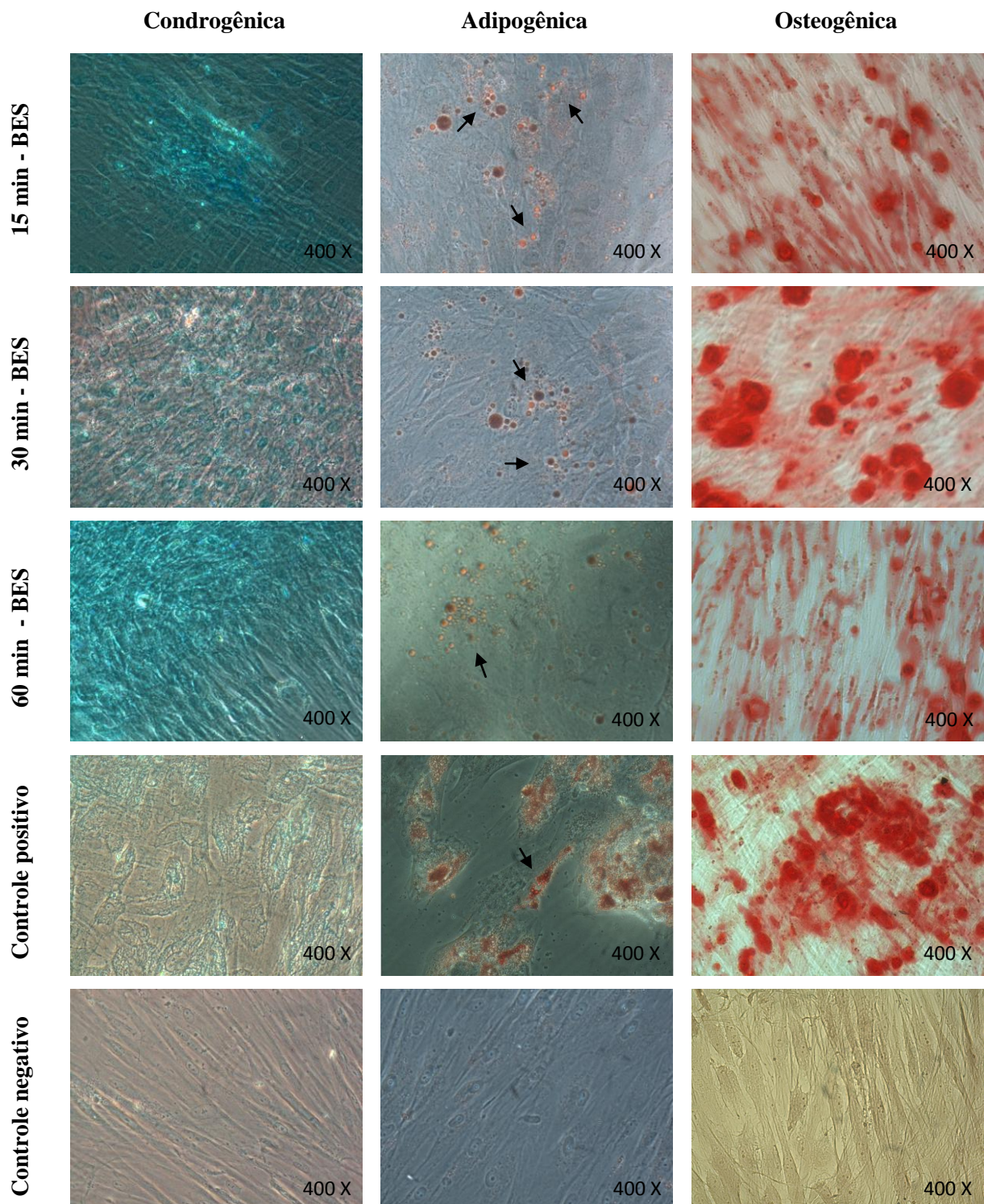


Figura 13. Diferenciação condrogênica, adipogênica (setas indicando vacúolos lipídicos) e osteogênica de CTMs submetidas a 15, 30 e 60 minutos de *bio-electrospraying* (BES); Controle positivo: células não submetidas ao BES; Controle negativo: células mantidas em meio de expansão e não induzidas à diferenciação.

5.3.3. Perfil imunofenotípico celular após *bio-electrospraying*

A análise por citometria de fluxo demonstrou que as células submetidas ao BES mantiveram as mesmas características de tamanho e granulosidade que o grupo controle, formando uma população celular homogênea (Figura 14).

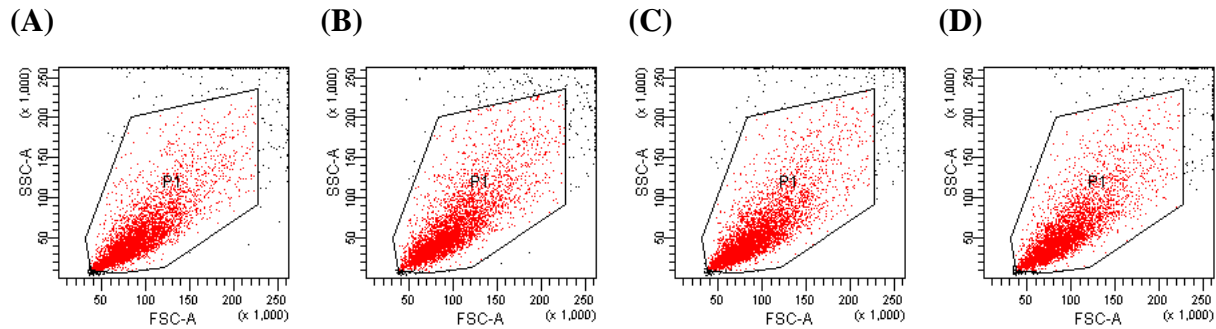


Figura 14. Análise da população celular por citometria de fluxo: (A) controle, (B) células submetidas a 15 minutos de *bio-electrospraying* (BES), (C) células submetidas a 30 minutos de BES e (D) células submetidas a 60 minutos de BES. (SSC: *side scatter*, FSC: *forward scatter*)

Corroborando com a diferenciação *in vitro*, a análise por citometria de fluxo mostrou que as CTMs submetidas ao BES continuaram exibindo a mesma taxa de positividade para marcadores típicos de células-tronco mesenquimais e negatividade para marcadores não mesenquimais, não diferindo do grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela II). Mesmo períodos prolongados de BES não alteraram o perfil imunofenotípico das CTMs, indicando que a multipotência dessas células foi preservada após o processamento por *bio-electrospraying*. Esse resultado já havia sido observado por Abeyewickreme e colaboradores, os quais demonstraram que, após o BES, células-tronco embrionárias murinas continuaram expressando os genes Oct4, Sox2 e Nanog, mantendo sua pluripotência. Entretanto, destaca-se que o tempo de processamento dessas células por BES não foi citado pelos autores.⁵²

Tabela II. Perfil imunofenotípico das células-tronco mesenquimais (CTMs) após *bio-electrospraying* (BES) (n=3)

	Tempo de processamento das CTMs por BES			
	Controle (zero)	15 minutos	30 minutos	60 minutos
CD29	99,6±2,0%	98,9±1,2%	98,6±2%	98,4±2%
CD44	74,0±28%	74,6±23%	71,4±32%	69,8±38%
CD73	99,5±0,5%	99,3±0,7%	99,0±1%	99±1%
CD90	99,6±2,3%	99,3±0,7%	98,7±2,1%	99,1±1,4%
CD14	0,1±0,1%	0,2±0,3%	0,1±0,2%	0,1±0,06%
CD34	0%	0%	0%	0%
CD45	0,1±0,2%	0,1±0,1%	0%	0%
CD184	0%	0%	0%	0%
HLA-DR	0%	0,1±0,1%	0,1±0,2%	0%
STRO-1	0,1±0,1%	0,1±0,1%	0,1±0,2%	0,1±0,1%

*Resultados inferiores a 0,1% foram considerados 0%.

5.3.4. Avaliação de dano ao DNA após *bio-electrospraying*

O ensaio cometa, também conhecido por eletroforese de células únicas em gel, é amplamente empregado para avaliação de dano ao DNA e reparo em células eucarióticas. A realização da eletroforese em condições alcalinas é uma versão mais abrangente desse ensaio e foi a utilizada no presente estudo. Esse protocolo possibilita a detecção de quebras simples e duplas, como também de sítios álcali-lábeis na macromolécula de DNA.⁵⁹ Assim, o ensaio cometa foi realizado com o intuito de verificar se o BES implicava genotoxicidade para as CTMs.

As células foram submetidas a 15, 30 e 60 minutos de BES. Posteriormente à realização do BES, as CTMs foram incubadas por 3 diferentes períodos (1, 3 e 5 horas) e o ensaio cometa foi realizado.

Na avaliação, após 1h de incubação, detectou-se um aumento na migração do DNA nas células submetidas a 30 e 60 minutos de BES (Figura 15A), indicando a formação de quebras no DNA. Esses resultados sugerem que a aplicação de tensões elétricas por períodos mais prolongados acarretam genotoxicidade celular. Na avaliação dos demais tempos de incubação (3 e 5 horas), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos

testados e o controle (Figuras 15B e C). Esses resultados sugerem que, de maneira geral, as células incubadas por mais tempo em meio de cultura, antes da realização do ensaio cometa, tenham tempo de realizar o reparo de potenciais alterações do seu DNA.

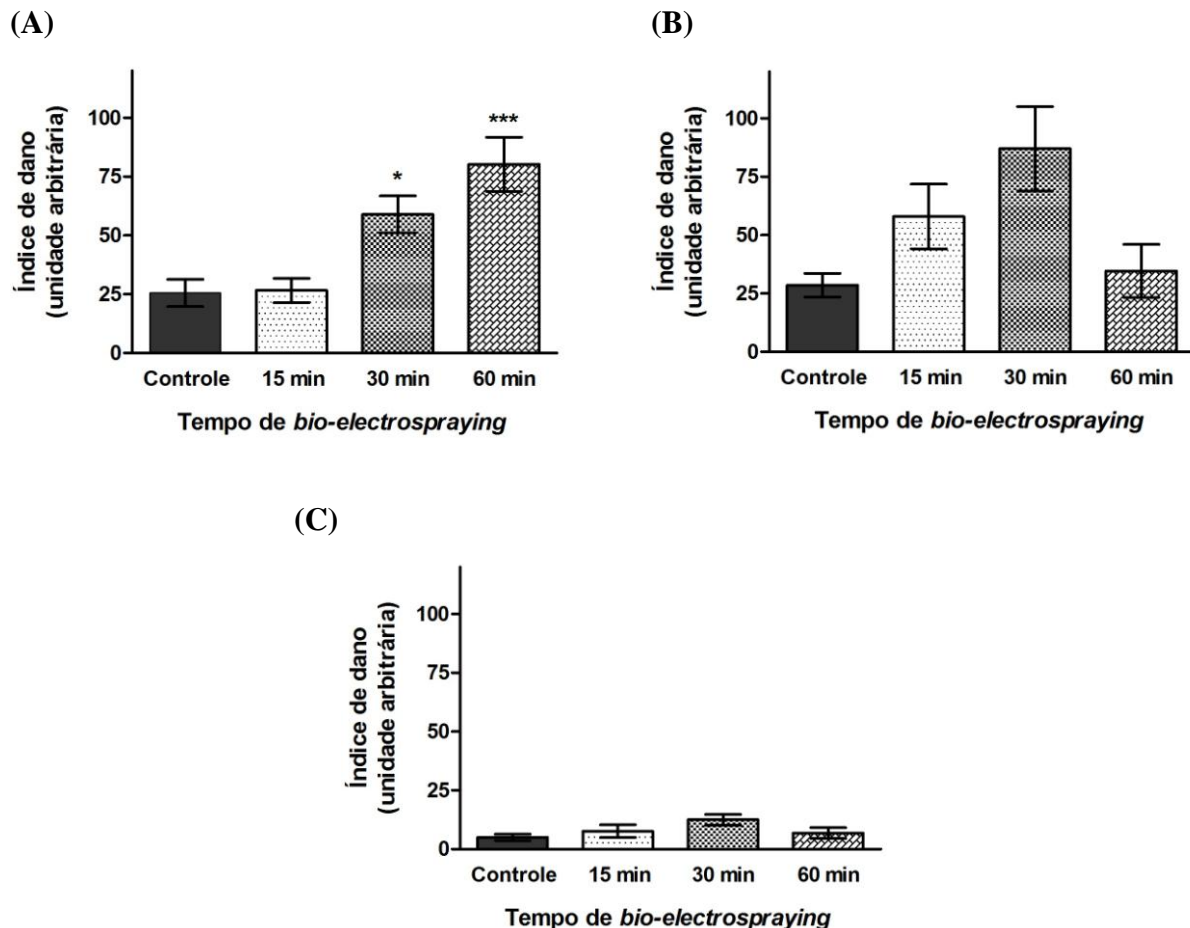


Figura 15. Avaliação de dano ao DNA nas células-tronco mesenquimais após 15, 30 e 60 minutos de *bio-electrospraying* (n=3). (A) células cultivadas por 1h antes da realização do ensaio cometa, (B) células cultivadas por 3h antes da realização do ensaio cometa e (C) células cultivadas por 5h antes da realização do ensaio cometa. Valor significativo entre os grupos com * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

Para avaliar a possibilidade do reparo do DNA, posteriormente, os dados foram analisados de modo a comparar o ID nos mesmos tempos de BES para os diferentes tempos de incubação (análise intragrupo). Após 3 e 5 horas de incubação, verificou-se que o ID, no grupo 60 minutos de BES, foi reduzido significativamente em relação a 1 hora, corroborando novamente para um provável processo de reparo da molécula de DNA (Figura 16).

Apesar de não ser significativo, um aumento do ID foi observado entre 1 e 3 horas de incubação para o grupo de células submetidas a 15 e 30 minutos de BES (Figura 16). Alguns tipos de danos ao DNA como oxidação e redução de bases não causam, diretamente, a quebra da macromolécula e, com isso, não são detectados pelo ensaio cometa. Contudo, no mecanismo celular de reparo, ocorre a quebra da fita de DNA e excisão dessas bases seguida pela restauração da sequência original do DNA.⁶⁰ Portanto, durante essa etapa, o ensaio cometa pode exibir um aumento da migração do DNA celular. Esse é um efeito que pode estar acontecendo entre 1 e 3 horas de incubação para os grupos de 15 e 30 minutos de BES. Após 5h de incubação, o ID foi reduzido em todos os grupos. Dessa forma, acredita-se que o dano causado pelo BES é passível de reparo e o mesmo acontece em até 5 horas após esse procedimento. Também foi observado que o ID apresentou-se reduzido no grupo controle, após 5h de incubação. Acredita-se que a manipulação das células para o preparo da suspensão celular possa ter aumentado o ID basal, justificando seu valor aumentado nos primeiros períodos avaliados (1h e 3h). Contudo, a incubação por um período mais prolongado (5h) pode ter favorecido o reparo do DNA e a restauração da normalidade celular, contribuindo para a redução do ID observado após 5h de incubação. Outro fator que pode ter contribuído para essa observação é o fato do ensaio cometa ter sido realizado em diferentes momentos, conforme os tempos de incubação, podendo ter ocorrido alguma variação durante a sua execução.

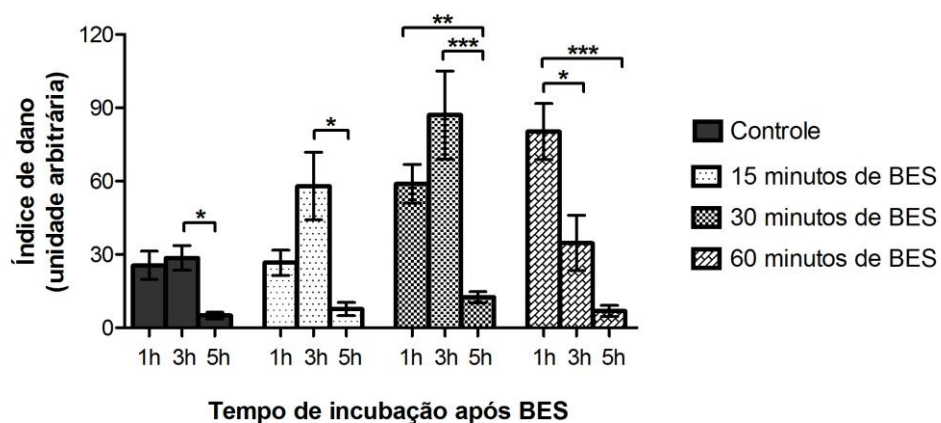


Figura 16. Avaliação de dano ao DNA nas células-tronco mesenquimais submetidas ao *bio-electrospraying* após 1, 3 e 5 horas de incubação (n=3). Valor significativo entre os grupos com *P<0,05, **P<0,01 e *P<0,001 (ANOVA seguido do pós-teste Tukey). A redução do ID sugere reparo do DNA.**

5.3.5. Avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio após *bio-electrospraying*

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo celular e tem importante função biológica. No entanto, quando a produção de EROs é exacerbada e o sistema celular antioxidante não consegue restabelecer um equilíbrio, a célula acaba sendo exposta a uma situação de estresse oxidativo. Danos celulares resultam do ataque de EROs sobre macromoléculas, tais como açúcares, DNA, proteínas e lipídios. Esses efeitos ocasionam principalmente danos à membrana celular e às membranas de organelas intracelulares, além de interferirem em muitos eventos intracelulares como transdução de sinal, síntese proteica e metabolismo energético. Ainda, as EROs podem atacar o DNA celular, causando, por exemplo, oxidação ou redução das bases nucleicas. Dessa forma, a produção de EROs foi avaliada nas células submetidas ao BES com intuito de verificar se esse método ocasionava estresse oxidativo e, ainda, se era o mecanismo responsável pelo dano ao DNA celular, demonstrado no ensaio cometa. Como pode ser visualizado na figura 17, o procedimento de BES não acarretou aumento da produção de radicais livres pelas CTMs.

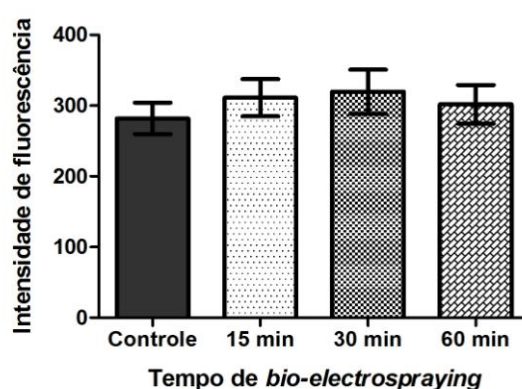


Figura 17. Análise de produção de espécies reativas de oxigênio em células-tronco mesenquimais após *bio-electrospraying* (BES) mostrando não haver diferença significativa (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

5.4. PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS CONTENDO CÉLULAS-TRONCO

5.4.1. Padronização do *bio-electrospraying*

Para a formação de SCCT, as técnicas de *electrospinning* e *bio-electrospraying* foram associadas. A escolha dos parâmetros a serem utilizados para o BES foi tomada com base nos

resultados dos experimentos nos quais os efeitos desse procedimento foram avaliados sobre as CTMs. Portanto, inicialmente foram utilizados os parâmetros 15kV de tensão elétrica, 4 cm de distância da agulha ao prato coletor, 0,46 mL.h⁻¹ de vazão e uma suspensão celular com concentração de 3x10⁶ células/mL. Contudo, ao se associar com o ES, inicialmente uma quantidade celular muito baixa foi obtida nos SCCT. Estudos prévios deste grupo de pesquisa indicam que, para um melhor desenvolvimento das células, é muito importante existir uma densidade celular mínima nos *scaffolds* a fim de favorecer o contato e comunicação celular. Dessa forma, a concentração da suspensão de células e a vazão do BES foram aumentadas para 7,5x10⁶ células/mL e 2,60 mL.h⁻¹, respectivamente. Essa última modificação foi adotada com segurança, visto que a viabilidade celular se manteve inalterada quando este parâmetro foi utilizado (Figura 7).

5.4.2. Padronização do *electrospinning*

Para a produção dos SCCT, uma tensão elétrica de 15 kV foi utilizada para o *electrospinning*, sendo esse, o valor de tensão padronizado para o *bio-electrospraying*. O aparato de ES/BES emprega uma única fonte alimentadora, dessa forma, a mesma tensão elétrica é aplicada para os dois métodos.

A partir da tensão elétrica fixada em 15kV, diversos parâmetros de *electrospinning* foram avaliados para a obtenção dos SCCT. Soluções poliméricas com diferentes concentrações (12-20% m/v) foram testadas, assim como diferentes parâmetros do processo: vazão da solução polimérica e distância entre a agulha e o prato coletor.

Para a formação de fibras ser possível, é necessário que haja uma distância mínima entre a agulha e o prato coletor, garantindo uma total evaporação do solvente antes que as fibras alcancem o contraeletrodo.³⁴ A distância de 7,5 cm foi a distância mínima da agulha ao prato coletor em que a construção dos SCCT foi possível. Apesar de se ter a formação de fibras, o uso de distâncias superiores a 7,5 cm implicou um não total direcionamento das fibras ao prato coletor, não sendo possível uni-las às CTMs que estavam sendo liberadas pelo BES. Com isso, a distância de 7,5 cm foi adotada para o *electrospinning*.

Concentrações poliméricas inferiores a 20% de PLGA não obtiveram sucesso para a formação de fibras, assim como fluxos inferiores a 0,54 mL.h⁻¹. Com esses parâmetros, um jato instável foi formado e um gotejamento foi observado.

A redução no diâmetro interno da agulha constitui uma forma de reduzir o diâmetro das fibras produzidas por *electrospinning*. O diâmetro interno da agulha influencia o volume

do material submetido ao campo elétrico. Menores diâmetros atenuam o volume da gota situada na extremidade da agulha, aumentando a tensão superficial. Dessa forma, para uma tensão aplicada, são necessárias mais forças de Coulomb para dar origem ao início do jato. Como resultado, a aceleração do jato de solução polimérica diminui possibilitando mais tempo para essa se alongar antes de chegar ao coletor. Entretanto, se o diâmetro interno da agulha for muito reduzido, abaixo de 0,50 mm, a gota de solução polimérica dificilmente será formada pois a sua tensão superficial será muito elevada.⁶¹ Com base nesses fatos, para a produção dos SCCT, o *electrospinning* foi conduzido com uma agulha de diâmetro interno de 0,60 mm.

Para o *electrospinning*, a solução de PLGA foi preparada com o solvente HFIP. Propriedades como ponto de ebulição, taxa de evaporação e pressão de vapor do solvente utilizado influenciam a morfologia das fibras. Também já foi mostrado que o solvente tem grande influência sobre as propriedades mecânicas dos *scaffolds*.⁶²

O HFIP tem sido bastante utilizado para o preparo de biomateriais. Em estudo comparando *scaffolds* de PLLA produzidos a partir de HFIP e diclorometano (DCM), foi verificado que o HFIP levou a produção de *scaffolds* com maior resistência à tensão e deformação e, assim, proporcionou uma maior estabilidade para o crescimento celular que os *scaffolds* produzidos a partir de DCM.⁶² Além disso, quando comparado também ao DCM em termos de efeitos de solvente residual, filmes poliméricos produzidos com HFIP, apesar de não serem estatisticamente diferentes, causaram uma menor morte celular (1-25%) que os filmes produzidos com DCM (9-57%).¹²

Esses fatores, associados ao fato do HFIP já ter sido utilizado com sucesso para a produção de *scaffolds* de PLGA em trabalhos anteriores do presente grupo de pesquisa, culminaram com a escolha desse solvente para a produção dos SCCT.

5.4.3. Associação das técnicas de *bio-electrospraying* e *electrospinning*

A partir da padronização dos parâmetros a serem utilizados para o *bio-electrospraying* e para o *electrospinning* (resumidos na tabela III), as duas técnicas foram paralelamente associadas (Figura 18A) e SCCT foram produzidos (Figura 18B). Durante a formação dos SCCT, percebeu-se que a área de convergência de *electrospinning* e do *bio-electrospraying* acabava sendo mais central à formação das fibras. Com isso, a cada 5 minutos, o êmbolo do BES era girado para que houvesse uma maior uniformidade da distribuição celular.

Tabela III. Parâmetros utilizados para a produção de *scaffolds* contendo células-tronco

	Tensão elétrica	Vazão	Distância agulha-coletor	Concentração
ES	15 kV	0,54 mL.h ⁻¹	7,5 cm	20% PLGA m/v
BES	15 kV	2,60 mL.h ⁻¹	4 cm	7,5x10 ⁶ células/mL

ES: *electrospinning*

BES: *bio-electrospraying*

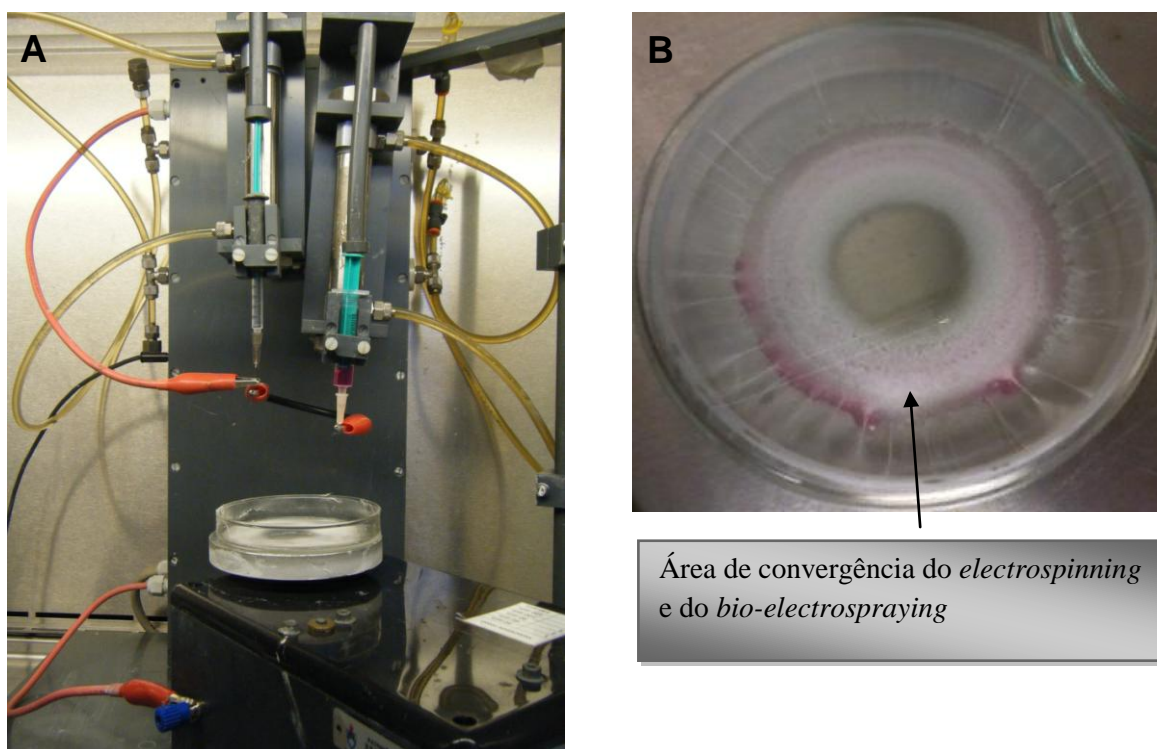


Figura 18. Produção de *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT), (A) aparato utilizado para a sua produção, (B) SCCT produzido.

5.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS *SCAFFOLDS* CONTENDO CÉLULAS-TRONCO

5.5.1. Espessura dos *scaffolds*, tamanho de poro, morfologia e diâmetro das fibras

Como pode ser visto na figura 19, tanto os SCCT como os *scaffolds* controle apresentaram fibras bem formadas, com superfície lisa e sem *beads*. As fibras apresentaram-

se distribuídas de maneira aleatória por toda a estrutura dos *scaffolds*, que apresentaram poros interconectados. O diâmetro médio das fibras de PLGA nos SCCT e nos *scaffolds* controle foi significativamente diferente ($p < 0,0001$) (Tabela IV). Além disso, os SCCT apresentaram um maior intervalo de distribuição de diâmetro de fibras que os *scaffolds* controle (Tabela IV, Figura 20). O aumento do diâmetro nos SCCT pode ser explicado pela exposição das fibras ao meio de cultivo, proveniente do BES. Apesar do PLGA ser um polímero hidrofóbico, o contato constante do biomaterial com o fluido pode ter ocasionado a absorção do mesmo pelas fibras. Isso poderia provocar o inchamento das fibras e, conseqüentemente, o aumento de seu diâmetro médio.

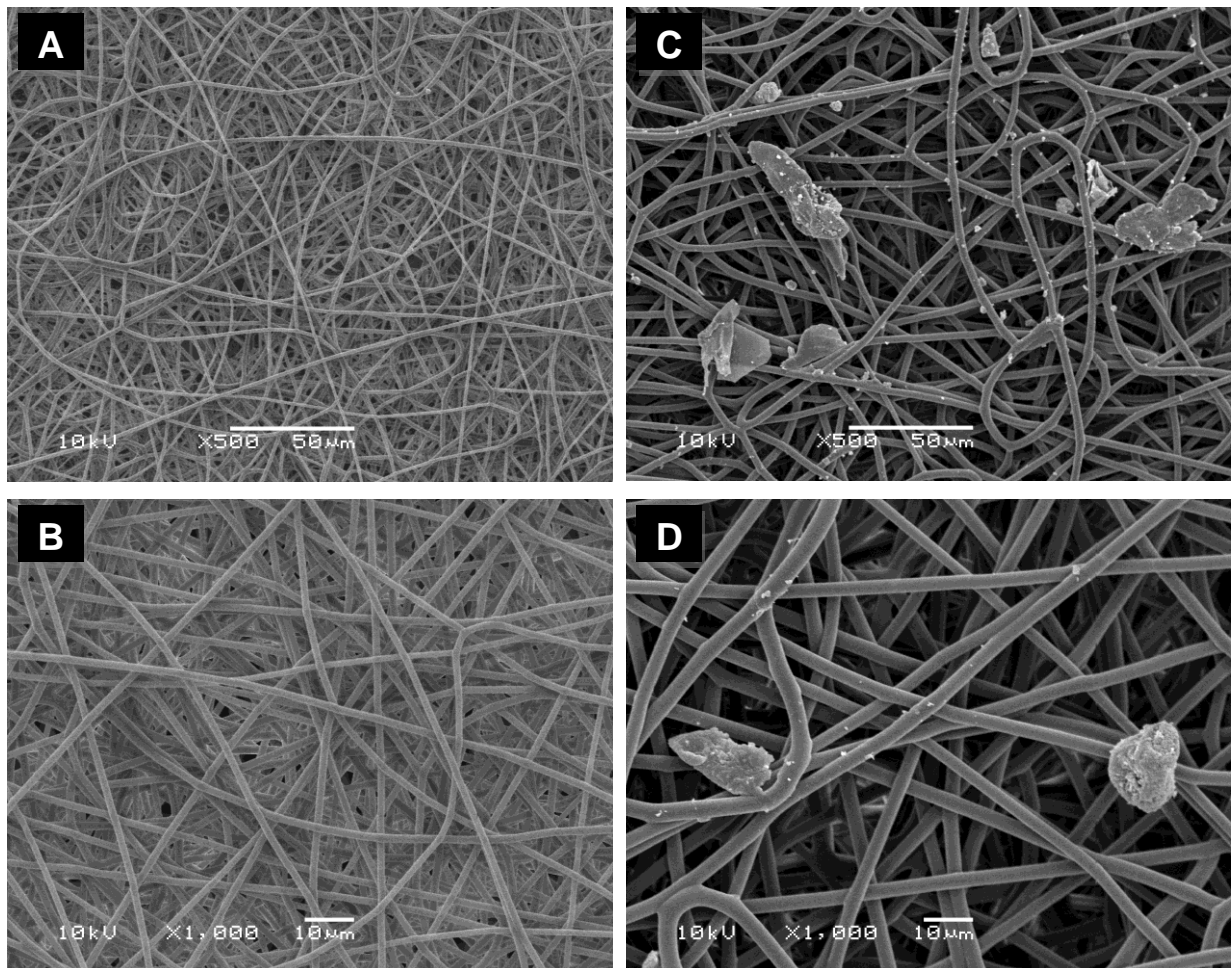


Figura 19. Morfologia apresentada pelas fibras nos *scaffolds* controle (A e B) e nos *scaffolds* contendo células-tronco (C e D).

Tabela IV. Características dos *scaffolds* produzidos

	Diâmetro das fibras (μm)	Tamanho de poro (μm)	Espessura do <i>scaffold</i> (μm)
SCCT	3,5 \pm 6,1	16,2 \pm 9,9	129,4 \pm 47,5
SC	1,5 \pm 2,2	14,2 \pm 5,3	56,6 \pm 13,3

SCCT: *scaffolds* contendo células-tronco

SC: *scaffolds* controle

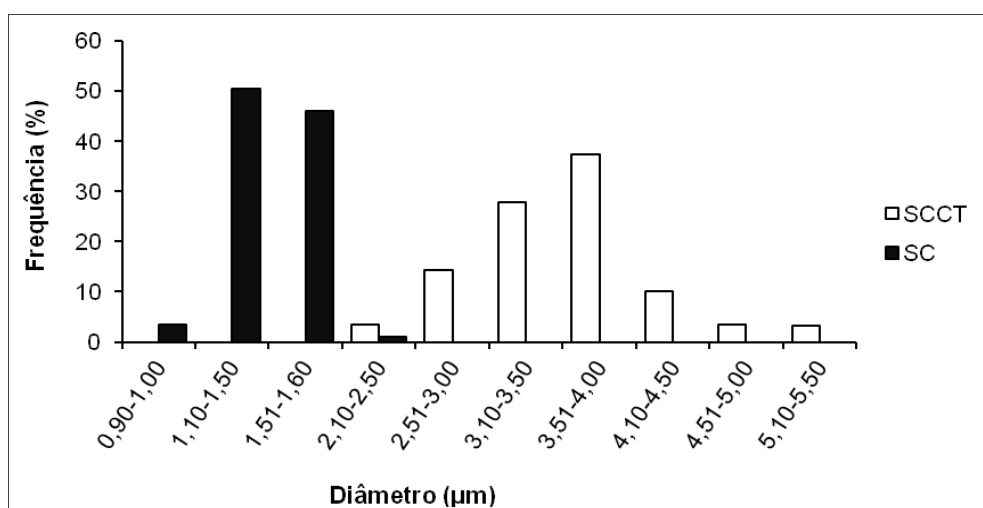


Figura 20. Distribuição do diâmetro das fibras nos *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT) e nos *scaffolds* controle (SC).

O diâmetro médio de fibra tanto nos SCCT como nos *scaffolds* controle apresentou-se elevado em relação ao que normalmente se observa em trabalhos envolvendo a técnica de *electrospinning* na área de engenharia de tecidos. O diâmetro das fibras obtidas por *electrospinning*, assim como sua morfologia, é resultado da combinação dos parâmetros utilizados, das propriedades da solução polimérica e ainda das condições ambientais. Contudo, estudos têm demonstrado que a concentração da solução polimérica é talvez o parâmetro com maior influência sobre o diâmetro das fibras formadas. O aumento da viscosidade da solução por aumento da concentração de polímero leva à formação de fibras mais largas.³³⁻³⁴ Além de ter sido utilizada uma solução polimérica bastante concentrada, a distância relativamente pequena entre a agulha e a placa coletora pode ter contribuído para a formação de fibras micrométricas nos *scaffolds* produzidos. O efeito da distância é fortemente dependente das características da solução. Entretanto, a aproximação da agulha ao coletor

favorece o aumento do diâmetro das fibras devido à redução do tempo de voo da solução polimérica.⁶¹

Normalmente *scaffolds* com fibras entre 300 e 500 nm são utilizados em estudos de engenharia tecidual. Fibras nanométricas têm sido preferidas por fornecerem uma ampla área superficial para a adesão e desenvolvimento celular. No entanto, normalmente os *scaffolds* formados por nanofibras também apresentam poros com tamanhos reduzidos, o que acaba dificultando o espalhamento, proliferação e infiltração das células nos *scaffolds*. Em seu estudo, Hsia e colaboradores demonstraram que fibroblastos cultivados sobre fibras micrométricas (diâmetro médio > 1,0 µm) apresentaram morfologia espalhada, com os filamentos de actina estendidos ao longo das microfibras. Enquanto isso, nos *scaffolds* formados por fibras nanométricas (diâmetro médio < 1µm), o citoesqueleto se mostrou pouco desenvolvido. Nesse mesmo estudo, a proliferação celular e a deposição de matriz de fibronectina sobre os *scaffolds* foram observadas. Apesar de, inicialmente, as células sobre *scaffolds* de fibras nanométricas apresentarem uma maior proliferação e deposição de fibronectina, ao final de 15 dias de cultivo, o número de células nos *scaffolds* de fibras micrométricas era superior ao primeiro grupo e continuava em ascensão assim como a deposição da matriz de fibronectina.⁶³

Em estudo paralelo, *scaffolds* de PLGA com fibras com diferentes intervalos de diâmetro foram produzidos por *electrospinning* e avaliados em termos de adesão e proliferação celular. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, mostrando que fibras micrométricas também são apropriadas para o crescimento celular e podem ser utilizadas na engenharia de tecidos (Anexo III).

Os SCCT foram significativamente mais espessos que os *scaffolds* controle (p=0,016). Além de apresentarem fibras de maior diâmetro que os *scaffolds* controle, a presença de células entre suas fibras contribuiu para o aumento da espessura nos SCCT. Essa característica se mostra bastante atraente para a engenharia de tecidos. Normalmente, o método de *electrospinning* forma *scaffolds* pouco espessos. Esse parâmetro pode ser melhorado por um aumento da deposição de fibras sobre a placa coletora, através da utilização de um maior período de realização do ES.³⁵ A associação do BES ao ES formou, em apenas 15 minutos, *scaffolds* com espessura de aproximadamente 130 µm. Os SCCT apresentaram estrutura de fácil manipulação, apresentando uma espessura favorável a uma posterior implantação *in vivo*.

No presente trabalho, o tamanho de poro foi estimado também através da medida da largura dos poros (medida bidimensional), utilizando o software Image J e as imagens obtidas por MEV. Os dois grupos analisados apresentaram intervalo de distribuição de tamanho de poros (Figura 21) e tamanho médio de poros semelhantes ($p=0,576$) (Tabela IV). Apesar de não se tratar da medida real, já que o software utilizado realiza uma medida bidimensional e os poros são estruturas tridimensionais, essa avaliação permitiu estimar se os poros formados ao menos eram condizentes com o desenvolvimento celular. O tamanho de poro (profundidade e área), número de poros e conectividade de poros nos *scaffolds* são “fatores-chave” na determinação de sua funcionalidade. Tamanhos de poros em escala de comprimento variando de micrômetros para alguns milímetros afetam fortemente o tráfego de células. O tamanho extremamente grande de poros pode prejudicar a vascularização do biomaterial por dificultar o contato entre as células. Células endoteliais, por exemplo, não conseguem formar “pontes” entre si quando o tamanho de poro supera o seu próprio diâmetro. Em contraste, poros menores do que 100 nm podem influenciar negativamente a difusão de nutrientes, resíduos e oxigênio, reduzindo a sobrevivência das células nos *scaffolds*.²⁷ Dessa forma, a avaliação com o software Image J sugere que os poros existentes nos SCCT são adequados para a manutenção das células presentes em sua estrutura, possibilitando assim, a chegada de nutrientes e oxigênio até elas, bem como a saída de restos metabólicos. Ainda, com base no tamanho de uma célula-tronco mesenquimal (11-19 μm)⁶⁴, acredita-se que os poros existentes na estrutura dos SCCT possibilitarão o desenvolvimento e movimentação celular.

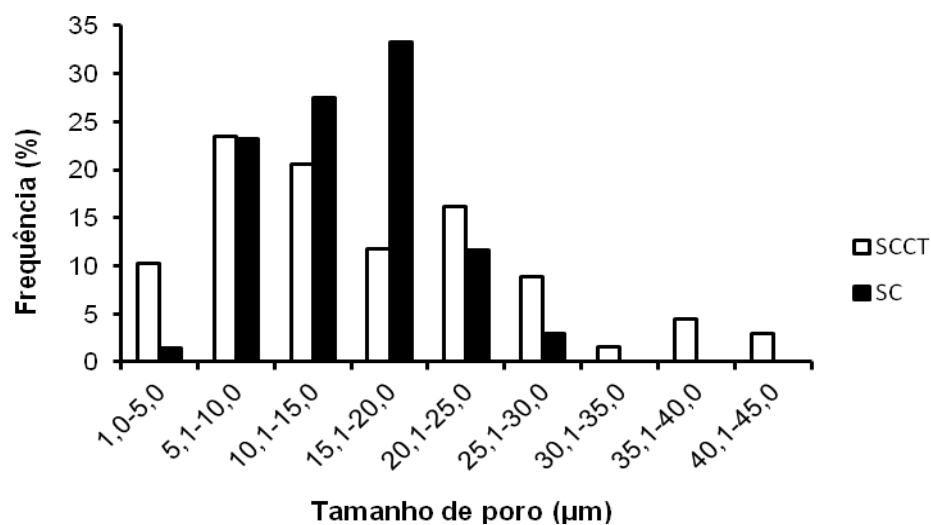


Figura 21. Distribuição do tamanho dos poros nos *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT) e nos *scaffolds* controle (SC).

5.5.2. Degradabilidade

O uso de materiais biodegradáveis é uma característica muito vantajosa na engenharia de tecidos. A remoção fisiológica do substrato pelo organismo do hospedeiro evita que uma segunda cirurgia seja realizada nesse paciente para remoção do biomaterial implantado.²⁵

A degradabilidade dos biomateriais está estreitamente relacionada à sua solubilidade. Se a solubilidade do material for bastante elevada, o mesmo acabará sendo reabsorvido rapidamente pelos fluidos corpóreos, sem que a regeneração do tecido tenha conseguido acompanhar a mesma velocidade. Ainda, uma rápida degradação acaba comprometendo as propriedades mecânicas dos biomateriais. Contudo, se a solubilidade é demasiadamente baixa, o material permanecerá por longos períodos no organismo, impedindo uma regeneração adequada do tecido e, eventualmente, ocasionando sua retirada através de um processo cirúrgico. Portanto, a cinética de degradação é uma importante propriedade do material para fins regenerativos, estando intimamente relacionada à estabilidade deste substrato *in vivo*.⁶⁵ O ideal é que o biomaterial apresente uma taxa de degradação proporcional à taxa de regeneração do tecido ao qual é empregado. Assim, o biomaterial dá suporte ao desenvolvimento do tecido sem atrasar, ou até mesmo prejudicar a sua regeneração.

A biodegradação e bioreabsorção de *scaffolds* de PLGA envolvem uma sucessão de eventos. Inicialmente, a exposição inicial a fluidos aquosos resulta na hidratação do material e subsequente hidrólise das ligações ésteres do polímero, originando produtos na forma de oligômeros ou monômeros. Então, a degradação prossegue sendo caracterizada pela perda gradual da massa do *scaffold*, diminuição da massa molecular ponderal média e pela perda de suas propriedades mecânicas.³¹

No presente estudo, a degradabilidade foi avaliada por um período de 45 dias em condições que simulam as do organismo humano. Nesse período, os dois grupos de *scaffolds* avaliados apresentaram perda de partes de suas cadeias moleculares. Foram degradados aproximadamente 39% do polímero nos SCCT e aproximadamente 32% nos *scaffolds* controle ($p=0,700$). Apesar de apresentarem aproximadamente o mesmo peso molecular no final do período analisado, os SCCT e os *scaffolds* controle apresentaram diferentes perfis de degradação (Figura 22). Apesar de não ter sido uma diferença significativa ($p=0,8227$), nota-se que os *scaffolds* controle degradaram-se de uma maneira mais rápida nos primeiros quinze dias de estudo do que os SCCT. A redução do peso molecular nesse período foi de cerca de 9% para os SCCT contra aproximadamente 23% para os *scaffolds* controle. Porém, do 15º ao

45º dia de análise, o oposto foi observado. Os *scaffolds* controle apresentaram aproximadamente 9% do polímero degradado, enquanto que os SCCT tiveram uma redução de cerca de 30%.

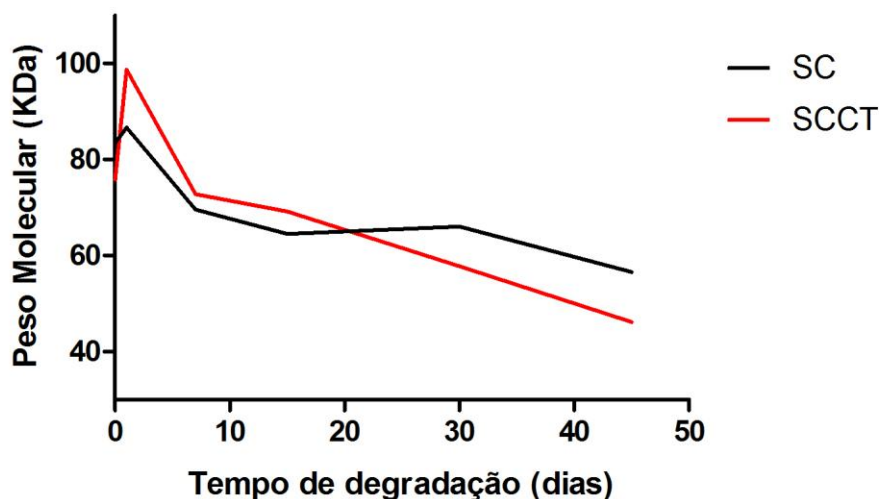


Figura 22. Perfil de degradação: avaliação de perda de massa molecular no período de 45 dias. (SCCT=*scaffolds* contendo células-tronco; SC=*scaffolds* controle).

A degradação mais rápida dos SCCT a partir de 15 dias pode ter ocorrido em função do fenômeno de autocatálise, fenômeno que pode ocorrer na degradação dos poli(α -hidróxi-ácidos). Estudos têm demonstrado que o mecanismo de degradação dos materiais produzidos a partir desses polímeros é um processo heterogêneo na sua extensão. A presença de terminais ácidos, nos produtos da hidrólise das ligações ésteres, catalisa a reação de degradação. Inicialmente, esse processo é homogêneo, gerando oligômeros solúveis em toda a extensão do material. Os produtos presentes na superfície do *scaffold* são difundidos para o centro e então removidos com a troca da solução. Contudo, a menor taxa de difusão dos produtos da reação no interior do *scaffold* pode gerar um acúmulo de ácidos, apresentando uma degradação mais acentuada em seu interior.⁶⁶ Os *scaffolds* controle apresentaram-se menos espessos que os SCCT (Tabela IV). Assim, é menos provável que a autocatálise tenha ocorrido dentro desse material já que a distância de difusão para os subprodutos de degradação é mais curta, facilitando sua remoção nas trocas de tampão durante o experimento.

Os resultados sugerem que esses *scaffolds* de PLGA (75:25) são capazes de suportar o desenvolvimento tecidual *in vitro* durante o período estudado, 30-45 dias. Estudos já demonstraram que essa composição polimérica foi capaz de suportar o crescimento de células ósseas primordiais, condrócitos, queratinócitos e fibroblastos contribuindo para o desenvolvimento dos tecidos ósseo, cartilaginoso e pele respectivamente.^{67, 68, 69}

5.5.3. Teor de solvente residual

Para a produção dos *scaffolds* por *electrospinning*, a solução polimérica de PLGA foi preparada empregando o solvente HFIP. Por se tratar de um solvente orgânico, que em sua maioria são tóxicos para as células, houve a necessidade de se verificar o teor de solvente residual nos *scaffolds* produzidos. Essa determinação foi realizada através de análise termogravimétrica. Nessa análise, perdas de massa em temperaturas inferiores a 200°C referem-se normalmente à volatilização de solventes presentes na amostra, podendo ser água ou solvente orgânico.

A análise de TGA mostrou que a primeira perda de massa, relacionada à presença de umidade ou solvente, foi de cerca de 2,88%, correspondendo a $0,33 \pm 0,8$ mg (Figura 23) A partir dessa medida, a quantidade de solvente residual presente nas condições de cultivo celular foi calculada. Os *scaffolds* apresentaram uma massa média de $11,25 \pm 1,2$ mg. Esses *scaffolds* foram acondicionados em placas de petri com volume de $9,54 \times 10^{-5}$ m³. Dessa forma, a concentração de solvente residual calculada foi de cerca de 3,4 ppm.

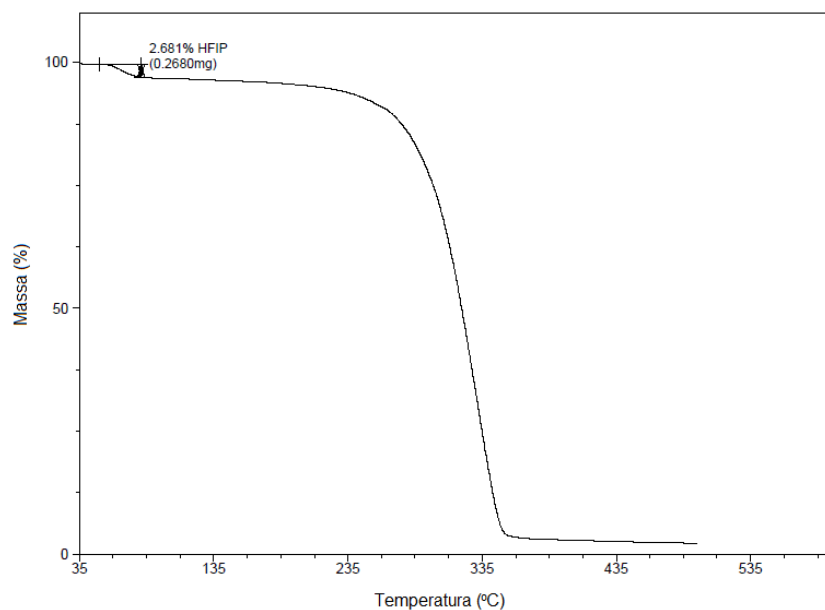


Figura 23. Análise termogravimétrica de uma amostra de *scaffold* controle de PLGA.

O limite de tolerância temporária de exposição (TEEL) para o HFIP, conforme a literatura, é de 7,5 ppm.⁷⁰ Portanto, mesmo o solvente estando presente, a concentração existente encontrou-se dentro do estabelecido como limite de exposição temporária e, conforme demonstrado no decorrer deste trabalho, as CTMs mantiveram-se viáveis e continuaram proliferando nos SCCT. Além disso, como a troca de meio de cultivo é realizada a cada 3-4 dias, espera-se que, com essa prática, o solvente vá sendo removido e sua concentração ainda se reduza ao longo do período em que esses *scaffolds* são incubados. Pensando na aplicação clínica desses biomateriais, deve-se destacar também que o organismo humano consegue eliminar o HFIP através da sua conjugação ao ácido glicurônico e posterior excreção na urina.⁷¹

5.5.4. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* são determinadas tanto pela sua macro e microestrutura física, como também pelas propriedades do material a partir do qual são produzidos. A combinação das propriedades mecânicas do *scaffold* com o ambiente do implante é de crucial importância para que a progressão da recuperação tecidual não seja limitada por falhas mecânicas do biomaterial, bem como, para que haja a promoção da regeneração tecidual.

O efeito da associação do BES à técnica de ES sobre as propriedades mecânicas dos biomateriais foi analisado através da comparação dos SCCT aos *scaffolds* controle em termos de módulo de Young, tensão máxima e alongação máxima. O comportamento mecânico das amostras, durante o ensaio de tração, está demonstrado na forma de curva tensão-deformação representada na figura 24. Para ilustração do comportamento mecânico do *scaffold* controle, a figura 24 foi montada a partir de uma amostra desse grupo.

Ao realizar o ensaio de tração, notaram-se dois tipos de comportamento para os SCCT (n=5). Esses *scaffolds* apresentaram duas faixas de valores médios para os parâmetros módulo de elasticidade e tensão máxima. Dessa forma, esses resultados foram divididos em dois subgrupos, nomeados como: “SCCT – X” (n=3) e “SCCT – Y” (n=2).

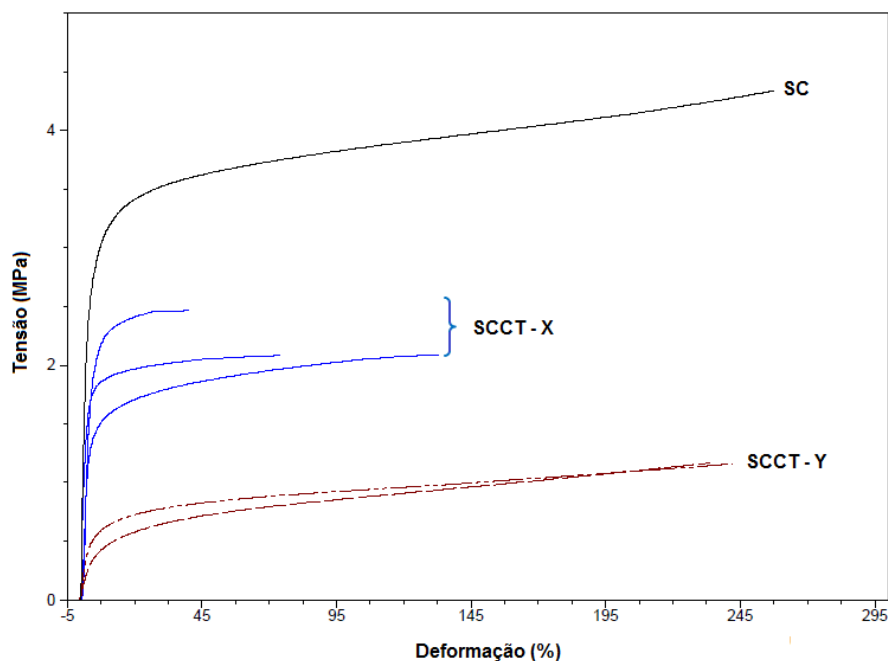


Figura 24. Curvas de tensão-deformação representativas do comportamento mecânico dos *scaffolds* controle (SC) e dos *scaffolds* contendo células-tronco X (SCCT-X) e Y (SCCT-Y).

Como relatado anteriormente, observou-se a existência de uma área nos SCCT com maior convergência do *electrospinning* e do *bio-electrospraying*. Desse modo, acredita-se que os dois comportamentos de tensão-deformação observados para este grupo estejam relacionados à posição na qual uma porção de amostra do SCCT foi cortada para a realização do ensaio.

Com a associação do BES, uma redução do módulo de Young e da tensão máxima foi observada. Tanto os SCCT-X como os SCCT-Y apresentaram diminuição desses parâmetros em relação aos *scaffolds* controle ($p < 0,05$). Esses dois grupos também foram diferentes entre si, quando comparados em relação ao módulo de Young ($p < 0,05$) (Figuras 25A e B). Apesar de não haver diferença significativamente estatística entre os grupos, observou-se uma grande queda do alongamento na fratura dos SCCT em relação aos *scaffolds* controle (Figura 25C). A redução de todas essas medidas mecânicas nos SCCT provavelmente ocorreu em função da presença das CTMs nesses *scaffolds*. As CTMs acabam causando uma interrupção na rede de fibras, ocupando o lugar dessas na estrutura física dos *scaffolds* e assim provocando uma redução da resistência mecânica dos mesmos. Esses resultados são corroborados por estudo anterior de Stankus e colaboradores.¹³

A existência de duas faixas de valores para o módulo de elasticidade e tensão máxima nos SCCT pode ter ocorrido em função da integração não totalmente homogênea das células nesses *scaffolds*. Como citado anteriormente, atribui-se esse resultado à posição do *scaffold* em que uma porção de amostra foi cortada para a realização do ensaio. As regiões dos SCCT nas quais se obteve uma maior integração celular, ou seja, em que mais células estavam presentes entre as fibras, provavelmente tiveram um maior comprometimento da sua estrutura, acarretando sua menor resistência mecânica.

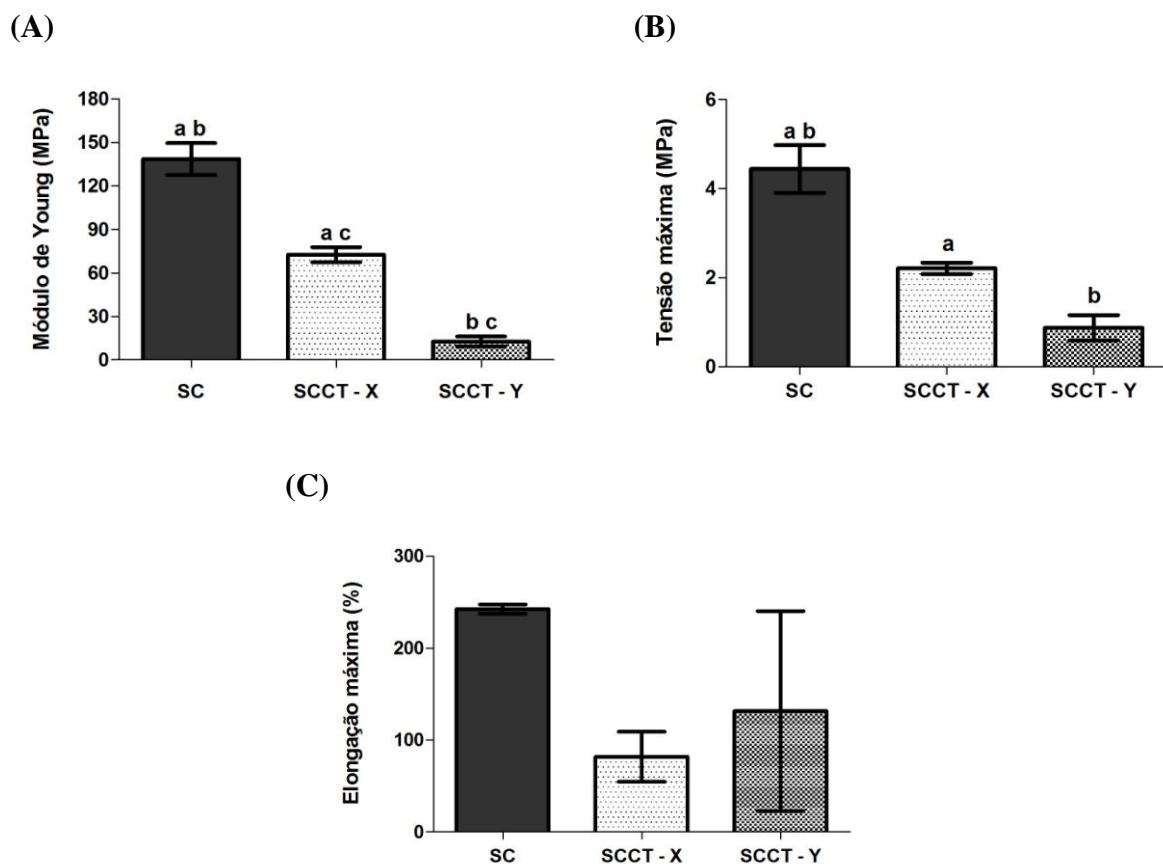


Figura 25. Caracterização mecânica dos *scaffolds* controle (SC) (n=5) e dos *scaffolds* contendo células-tronco X (SCCT-X) (n=3) e Y (SCCT-Y) (n=2). (A) Módulo de Young; (B) Tensão máxima; (C) Elongação máxima; ^{a, c} Valor significativo entre os grupos com $P < 0,05$; ^b Valor significativo entre os grupos com $P < 0,01$ (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

As propriedades mecânicas dos biomateriais são importantes na escolha de qual material utilizar na aplicação médica desejada. Diferentes tipos de tecidos exigem diferentes

propriedades mecânicas do biomaterial para poderem ser regenerados ou substituídos. Apesar do BES ter ocasionado a menor resistência dos SCCT em relação aos *scaffolds* controle, as propriedades medidas ainda são satisfatórias para que os SCCT possam ser manipulados e utilizados como suportes de diferentes tecidos, como por exemplo pele, alguns tipos de ossos e cartilagens.^{4, 68}

5.5.5. Ângulo de contato

A hidrofiliidade/hidrofobicidade da superfície dos biomateriais é um parâmetro de grande influência sobre a adesão e acomodamento celular. Em relação à molhabilidade de substratos poliméricos, verifica-se que a atividade celular é maior em substratos moderadamente hidrofílicos, com ângulos de contato entre 40 e 70°.⁷²

A medida do ângulo de contato obtido para os filmes poliméricos foi de 62±2,6°. Esse resultado sugere que os *scaffolds* de PLGA apresentam hidrofiliidade adequada à adesão celular.

5.6. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS SCAFFOLDS CONTENDO CÉLULAS-TRONCO

5.6.1. Viabilidade, incorporação e proliferação celular nos *scaffolds* contendo células-tronco

A associação do ES com ao BES conduziu a uma redução da viabilidade das CTMs (Figura 26). Quando as CTMs foram submetidas somente ao BES, as mesmas mantiveram sua viabilidade inalterada. Logo, o resultado obtido com a combinação do *electrospinning* provavelmente deve ter ocorrido em função do microambiente presente durante a produção dos SCCT. Ao contrário do que foi realizado somente com o BES, quando essa técnica foi associada ao ES, o meio de cultivo não foi adicionado ao prato coletor dos SCCT para evitar que as células ficassem dispersas no meio ao invés de se localizarem entre as fibras. Desse modo, durante a produção dos SCCT, as células foram submetidas a um ambiente desprovido de nutrientes celulares e pH adequado, com condições físico-químicas inadequadas, além de temperatura e umidade não controladas. Esses fatores acabam levando a um sofrimento celular que pode ter resultado no aumento de morte celular. Dessa forma, era esperado que essas condições tivessem um efeito negativo sobre as células. Além disso, a presença de

solvente residual nos *scaffolds* (3 ppm) pode ter contribuído para esse resultado. Contudo, apesar de ter ocorrido uma redução da viabilidade celular em comparação ao BES sozinho ($96,7\pm 2,3\%$), a sobrevivência das CTMs nos SCCT ainda se manteve elevada, com uma alta taxa de sobrevivência ($89\pm 4,6\%$, $n=3$). Foi também utilizada uma suspensão com alta concentração celular para o BES, contribuindo para que um número suficiente de células viáveis estivesse presente nos SCCT, garantindo a sua colonização. Em estudo de outros autores envolvendo a associação dessas duas técnicas, também para a produção de *scaffolds* integrados a células, a sobrevivência celular inicial em tais *scaffolds* foi inferior à encontrada no presente estudo, com uma taxa de sobrevivência de 55 a 66%. Ainda assim, as células foram capazes de colonizar os *scaffolds*, cobrindo toda sua estrutura após 21 dias de cultivo.¹²

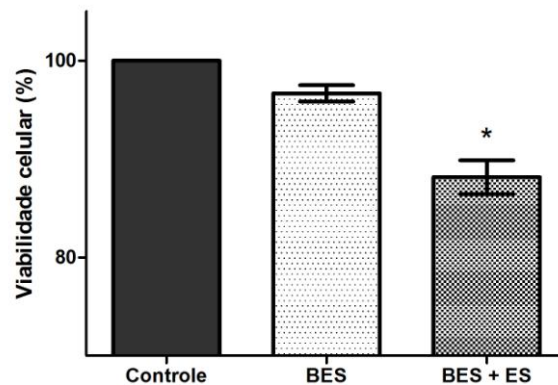


Figura 26. Viabilidade celular após *bio-electrospraying* (BES) e após associação do BES ao *electrospinning* (ES); * Valor significativo entre os grupos com $P<0,001$ (ANOVA seguido do pós-teste Tukey).

A densidade inicial de células viáveis nos SCCT foi estimada através do teste de MTT. O número médio de células vivas integradas às fibras foi de 5.039 ± 1.008 células/mm³. Considerando a densidade da suspensão celular utilizada ($7,5\times 10^6$ células/mL), a viabilidade após ES-BES e o volume total do *scaffold* formado (cerca de 270 mm³), a eficiência da integração de células às fibras foi calculada, sendo em torno de 31%. O efeito de repulsão entre as cargas eletrostáticas positivas utilizadas para as técnicas de *electrospinning* e *bio-electrospraying* pode ter sido um dos motivos para essa baixa eficiência de integração celular. A repulsão entre essas cargas pode ter ocasionado um deslocamento do jato de BES para fora

do coletor, causando a perda de células. Esse resultado é corroborado com o fato de que quando somente o BES foi realizado, a recuperação celular foi em torno de 83%. Contudo, também foi observado que, ao final do tempo de produção dos SCCT, havia ocorrido uma grande deposição de células na base da seringa do BES. Apesar de não ser um período prolongado, como foi utilizada uma densidade de suspensão celular elevada, ao final de 15 minutos ocorreu essa sedimentação celular. Esse fenômeno indica que a concentração celular dispensada pela agulha do BES não era mais a inicial, de $7,5 \times 10^6$ células/mL, contribuindo para o resultado encontrado de menor eficiência em comparação ao BES, quando esse não foi associado ao *electrospinning*. Embora a eficiência de integração celular tenha sido relativamente baixa, a mesma foi superior à encontrada por outro estudo que empregou o método de semeadura estática.⁷³ Esse estudo demonstrou que somente 25% das células inicialmente semeadas por esse método permaneceram nos *scaffolds*. Os 75% das células restantes acabaram sendo encontrados na parte inferior da placa de cultivo e não contribuíram para a formação tecidual *in vitro*. Ainda que o resultado obtido tenha sido inferior ao esperado, a densidade celular inicial nos SCCT foi satisfatória, permitindo que as células conseguissem se desenvolver no interior dessas estruturas. Corroborando com esse resultado, o estudo de Holy e colaboradores demonstrou que densidades celulares iniciais a partir de 1×10^6 células/cm³ foram suficientes para suportar a diferenciação celular e formação de tecido mineralizado, obtendo sucesso na formação de tecido ósseo *in vitro*.⁷³

O metabolismo/proliferação celular nos SCCT é mostrado na figura 27A. O número de células metabolicamente ativas aumentou significativamente entre o primeiro e sétimo dia de cultura ($p < 0,001$). Entre o 7º e 15º dia, o teste de MTT indicou que o número de células metabolicamente ativas foi mantido constante. A dinâmica da população celular em estruturas tridimensionais é resultante de interações célula-célula e célula-biomaterial. Essas interações têm importante influência sobre a taxa de proliferação celular e desenvolvimento de tecidos.⁷⁴ A manutenção da leitura de MTT entre 7 e 15 dias de cultivo pode ter ocorrido em função do fenômeno chamado inibição por contato, devido à redução do espaço disponível para o desenvolvimento celular. Nesse mecanismo, uma ocupação quase ou totalmente completa de superfícies bidimensionais ou tridimensionais ocasiona o aumento de colisões celulares, causando a redução da motilidade das células, tendo efeitos negativos sobre a migração e proliferação celular.⁷⁴ Contudo, no 15º dia foi observado que após adição de DMSO, o *scaffold* ainda apresentava alguns pontos em cor púrpura, indicando que ainda havia cristais de formazan insolúveis e impregnados nos SCCT (Figura 27B). Isso sugere que a leitura de

absorbância poderia ter sido maior para esse tempo de cultivo, o que pode ter subestimado os resultados. Dessa forma, o MTT não se mostrou um teste adequado para a avaliação do metabolismo/proliferação celular para períodos mais prolongados de cultivo. Acredita-se que o uso dos testes XTT ou WST poderiam ser mais apropriados para essa avaliação nos *scaffolds* produzidos. Esses ensaios têm o mesmo princípio que o teste de MTT, contudo, levam a formação de sais hidrossolúveis e, assim, a leitura da absorbância é lida diretamente sem a necessidade da adição de DMSO.

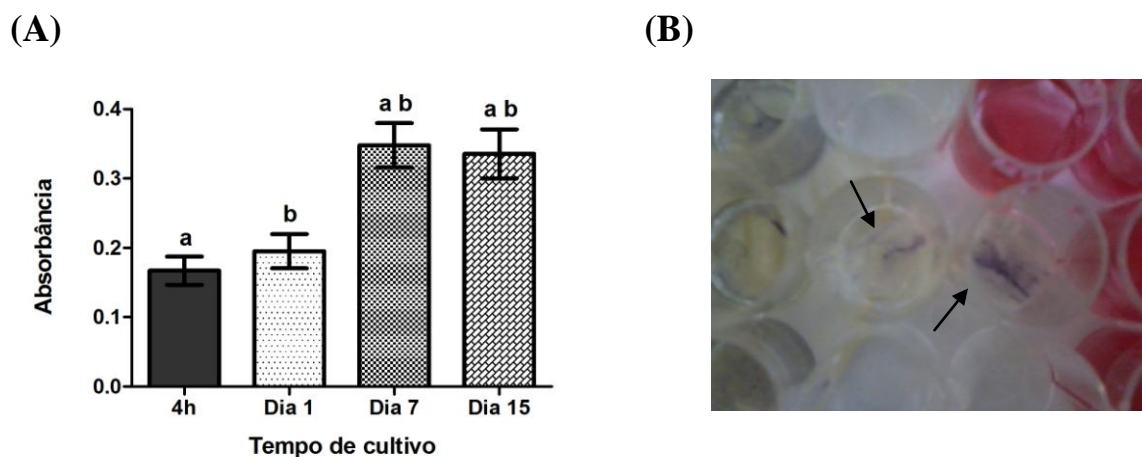
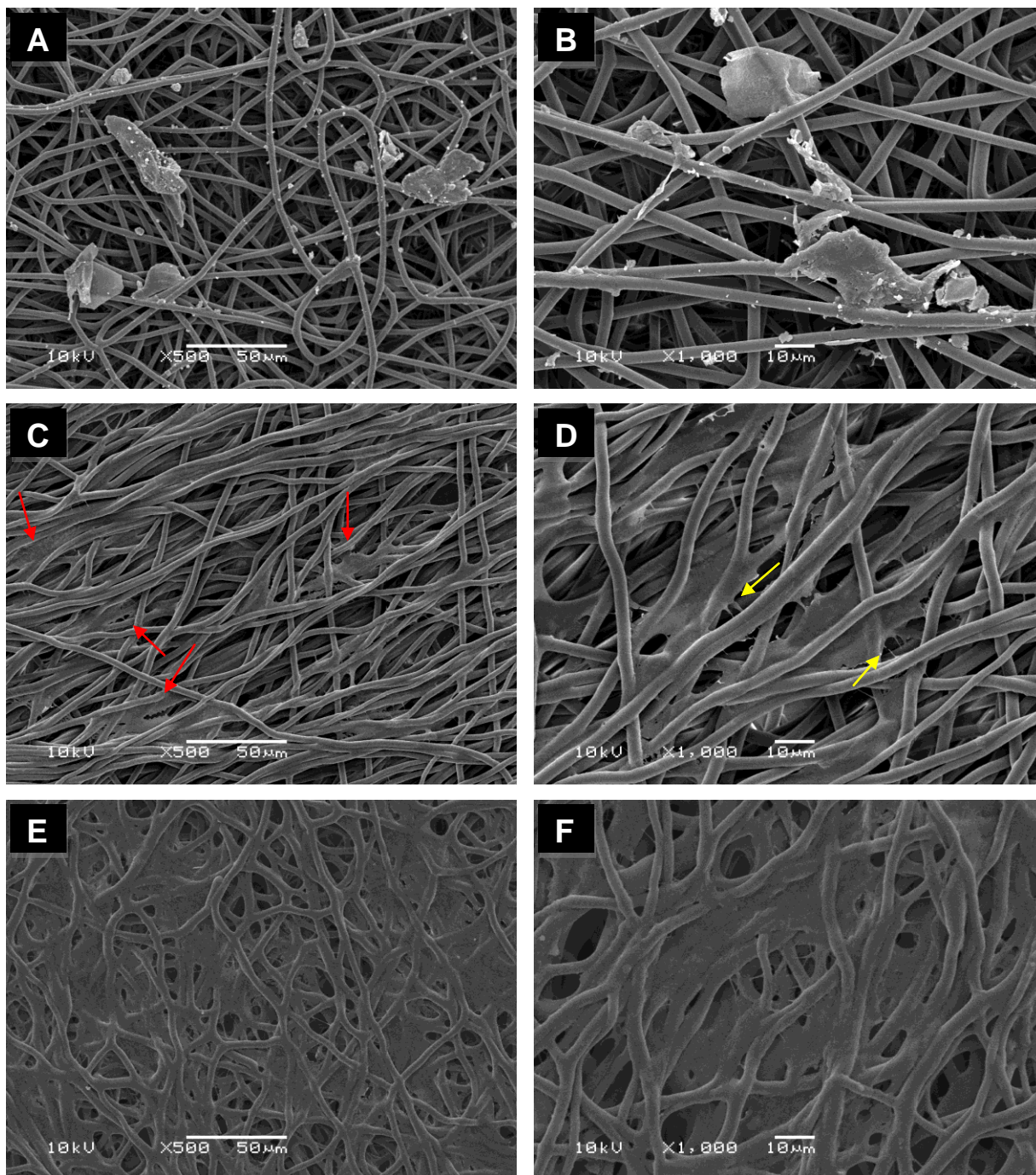


Figura 27. (A) Proliferação celular nos *scaffolds* contendo células-tronco (SCCT) no período de 15 dias; ^{a,b} Valor significativo entre os grupos (a = $P < 0,001$ e b = $P < 0,01$) (ANOVA seguido do pós-teste Tukey); (B) cristais de formazan impregnados nos SCCT (indicados pelas setas pretas) após adição de DMSO para 15 dias de cultivo.

5.6.2. Distribuição e morfologia das células nos *scaffolds* contendo células-tronco

A partir das imagens obtidas por MEV, pode-se verificar que logo após a produção dos SCCT, as células se encontravam relativamente soltas nas fibras, com poucos pontos de adesão a essa (Figuras 28A e B). Contudo, após um dia de cultivo verificou-se que as CTMs já exibiam vários pontos de contato à estrutura do *scaffold* e formavam “pontes” entre fibras adjacentes (Figuras 28C e D). Através dessa análise também foi possível verificar que as células se encontravam tanto acima como também abaixo da rede de fibras, sugerindo que a associação das técnicas de BES e ES havia proporcionado uma distribuição das células nas três 3 dimensões do *scaffold*. Após sete e quinze dias de cultivo, observa-se que as células já estavam presentes em maior quantidade na estrutura do *scaffold* (Figuras 28 E, F, G e H). Com 15 dias de cultivo, um maior número de células na superfície do *scaffold* pode ser

observado (Figura 28 H). Esse dado indica a capacidade das células se proliferarem e conseguirem migrar pela estrutura do *scaffold*, conseguindo fazer a colonização do mesmo. Outras imagens de microscopia eletrônica mostrando a interação das células com as fibras dos *scaffolds* encontram-se no anexo IV.



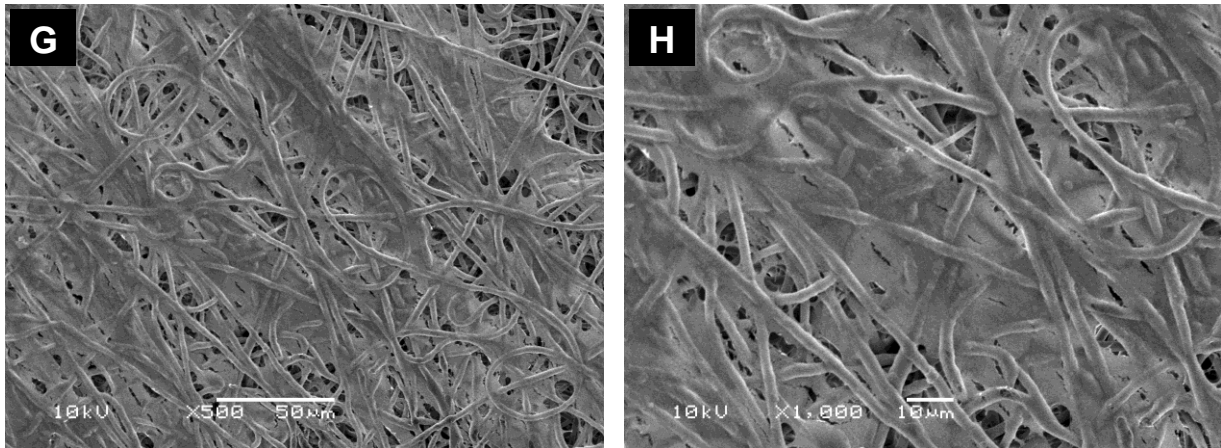


Figura 28. Análise em microscopia eletrônica de varredura da integração celular nos *scaffolds* contendo células-tronco ao longo de seu cultivo *in vitro*. (A e B) 0 horas em cultivo, (C e D) 1 dia em cultivo (setas vermelhas demonstram as células em meio a rede de fibras, setas amarelas indicam as expansões celulares formando “pontes” entre fibras adjacentes dos *scaffolds*), (E e F) 7 dias em cultivo e (G e H) 15 dias em cultivo.

A adesão celular é mediada primeiramente pela adsorção de proteínas da matriz extracelular à superfície das fibras. Em seguida, vias de sinalização celular são ativadas e ocorre a adesão das células aos moldes através de receptores integrina. Logo, o acomodamento e comportamento celular são bastante afetados pela morfologia e topografia das fibras.⁷⁵ Dessa forma, os SCCT foram analisados por microscopia confocal. Essa análise foi realizada com o objetivo de determinar se os *scaffolds* apresentavam uma boa estrutura para o acomodamento do esqueleto celular. Isso foi verificado a partir da observação da morfologia celular.

A partir das imagens obtidas em microscópio confocal, verificou-se que as células apresentavam-se ainda arredondadas após um dia de cultivo (Figura 29A). Após sete dias de cultivo, a morfologia das CTMs já havia sofrido alteração e o seu citoesqueleto mostrava-se espalhado, com as fibras de estresse de actina bastante visíveis, indicando um melhor espraiamento das células entre as fibras (Figura 29B). As imagens em z mostraram que o citoesqueleto apresentava-se acomodado entre as fibras, em todas as direções, e não simplesmente aderido sobre a superfície do *scaffold*. Após 15 dias de cultivo, um maior número de células nas primeiras camadas dos SCCT pode ser notado (Figura 29C). Além disso, verificou-se que o citoesqueleto estava alinhado ao longo das fibras. Esses resultados demonstraram que as fibras dos SCCT se mostraram bons arcaibouços para a sustentação das CTMs, que apresentaram morfologia normal ao longo de seu desenvolvimento em meio a essa estrutura.

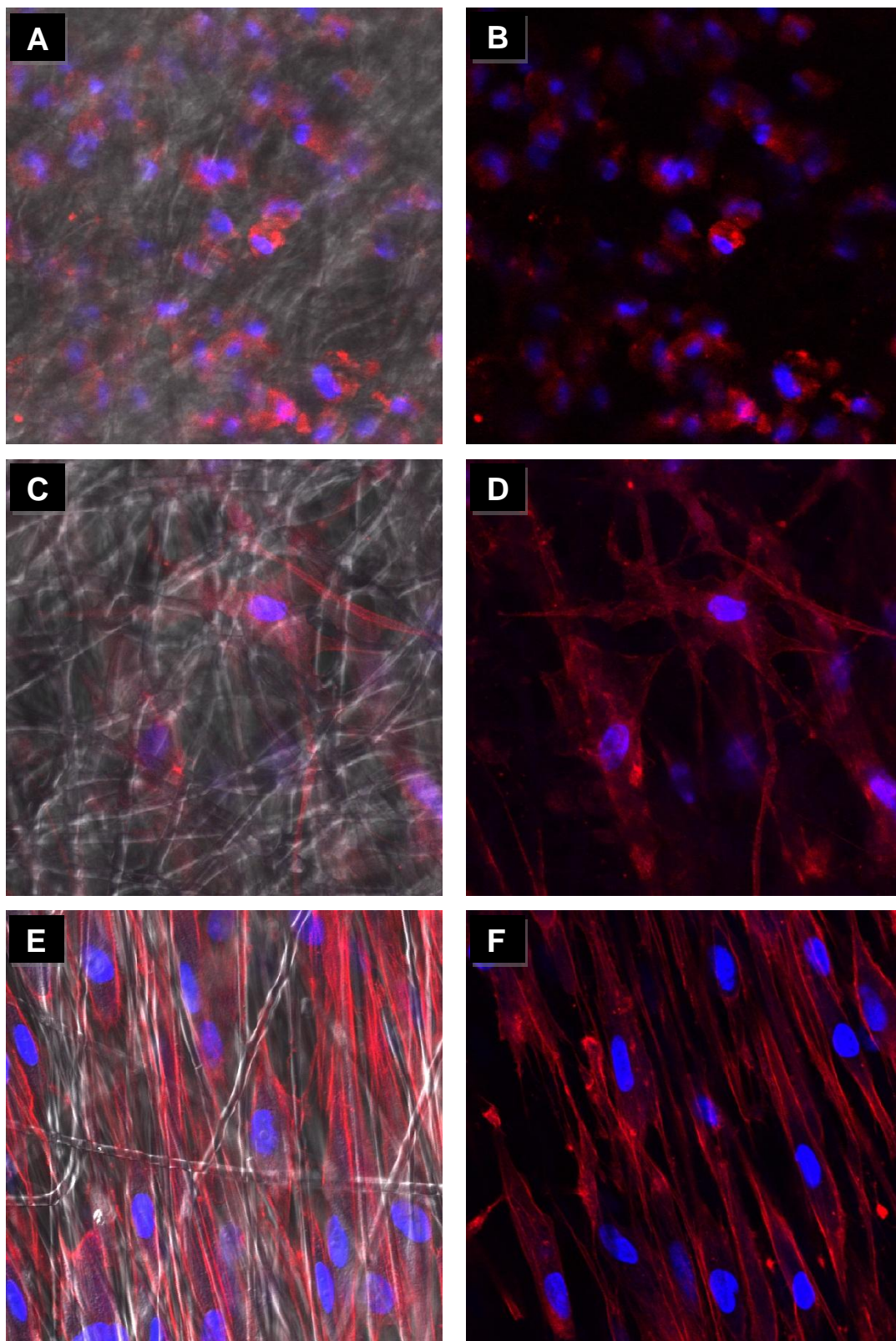
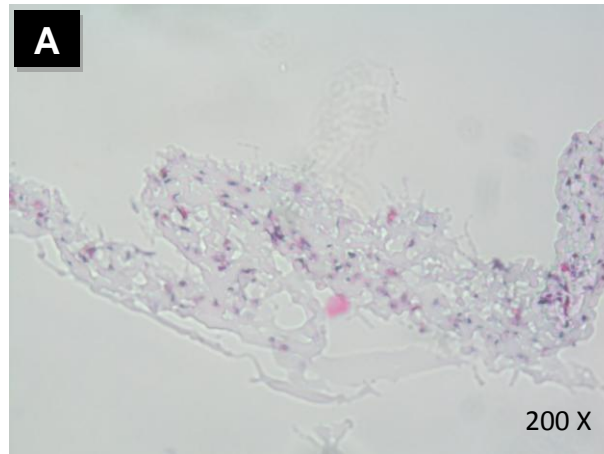


Figura 29. Análise em microscópio confocal dos *scaffolds* contendo células-tronco em (A) e (B) 1 dia de cultivo, (C) e (D) 7 dias de cultivo, (E) e (F) 15 dias de cultivo. As imagens foram capturadas com objetiva de 40x e zoom de 2x e mostraram a marcação nuclear com DAPI e a marcação do citoesqueleto com faloidina/rodamina.

A distribuição das células ao longo de toda a profundidade dos SCCT foi avaliada através de cortes histológicos desses *scaffolds*. Para isso, amostras de SCCT com apenas 1 dia de cultivo foram seccionadas. A coloração com HE dos cortes histológicos demonstrou que as CTMs foram incorporadas em toda a espessura dos SCCT (Figuras 30 A e B). Após 15 dias de cultivo, pode-se observar que houve um maior preenchimento da arquitetura do *scaffold* pelas células (Figura 31). Em trabalho anterior desenvolvido pelo grupo de pesquisa, células-tronco adiposo derivadas foram semeadas sobre *scaffolds* produzidos por ES, através do método convencional de semeadura celular (semeadura estática). Após 15 dias de cultivo, a análise histológica desses *scaffolds* foi realizada. Esse exame demonstrou que as células cultivadas se encontravam na superfície do *scaffold*, exibindo um arranjo de multicamadas, não conseguindo, portanto, penetrar na estrutura do mesmo (Anexo V).⁷⁶

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem fortemente que a combinação das técnicas de *electrospinning* e *bio-electrospraying* obteve sucesso em seu propósito. Essas técnicas geraram, imediatamente, *scaffolds* integrados às células, que se encontravam distribuídas em toda a espessura do biomaterial.



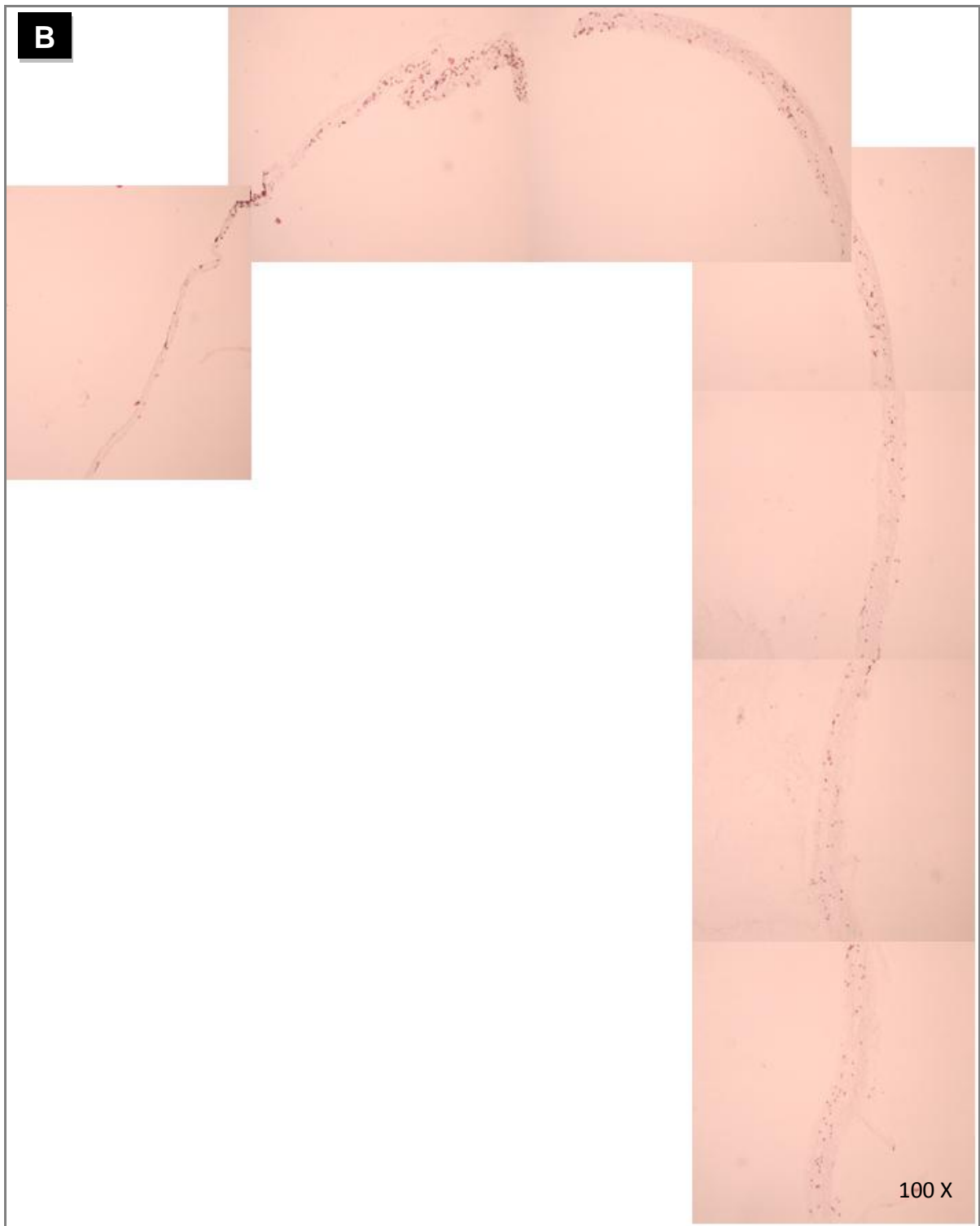


Figura 30. Corte histológico dos *scaffolds* contendo células-tronco após 1 dia de cultivo demonstrando que as células se distribuíram heterogeneamente por toda a espessura do biomaterial. (A) fragmento do SCCT e (B) SCCT reconstituído.

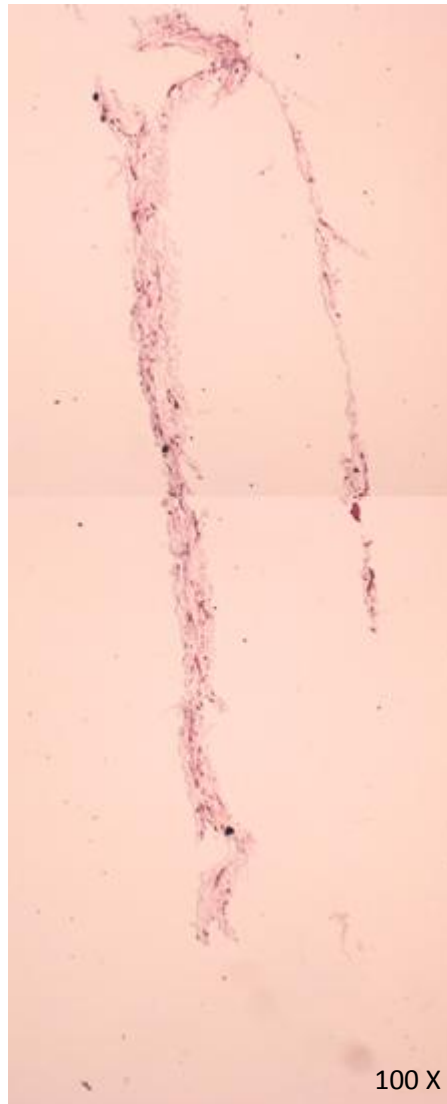


Figura 31. Corte histológico dos *scaffolds* contendo células-tronco após 15 dias de cultivo demonstrando que as células estavam distribuídas homogeneamente em toda a arquitetura do biomaterial.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo procurou desenvolver, através da combinação das tecnologias de *electrospinning* e de *bio-electrospraying*, um *scaffold* com células integradas de maneira homogênea em toda a sua estrutura. Diferentes aspectos foram analisados e as principais considerações estão destacadas abaixo.

- As células utilizadas no presente estudo foram isoladas a partir de dentes decíduos humanos, expandidas e caracterizadas como células-tronco mesenquimais.
- O impacto do *bio-electrospraying* sobre as células-tronco mesenquimais foi avaliado. As células mantiveram-se viáveis após esse processo e conservaram sua capacidade proliferativa, plasticidade e perfil imunofenotípico. O procedimento de *bio-electrospraying* não acarretou um aumento de espécies reativas de oxigênio. Quando avaliado seu potencial genotóxico, verificou-se que tempos de 30 e 60 minutos de *bio-electrospraying* ocasionaram dano ao DNA celular. Contudo, as células mostraram-se capazes de reparar esse dano após 5 horas de cultivo.
- Com a associação da técnica de *bio-electrospraying* à de *electrospinning*, *scaffolds* contendo células-tronco foram construídos. Tais *scaffolds* foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas e biológicas.
- Os *scaffolds* construídos através da combinação do BES e do ES apresentaram estrutura fibrosa e porosa, com concentração de solvente residual dentro do limite estabelecido e taxa de degradação favorável à cultura celular *in vitro*. A presença de células nos *scaffolds* produzidos acabou reduzindo significativamente sua resistência mecânica. Porém, tal propriedade ainda permaneceu adequada ao cultivo *in vitro* e a várias aplicações da engenharia de tecidos.
- A combinação da técnica de *electrospinning* à de *bio-electrospraying* resultou em pequena redução da viabilidade das células-tronco mesenquimais, o que provavelmente ocorreu em função da exposição celular a um ambiente desfavorável. Porém, as células integradas aos *scaffolds* mostraram-se capazes de proliferar-se dentro da estrutura do biomaterial. O citoesqueleto apresentou-se bem acomodado entre a rede de fibras dos *scaffolds* ao longo do seu cultivo. A análise histológica

mostrou que as células encontravam-se distribuídas em toda a espessura do biomaterial

Os resultados obtidos sugerem que a associação das técnicas de *electrospinning* e *bio-electrospraying* é uma ferramenta viável para a produção de *scaffolds* tridimensionais integrados a células, tornando-se uma alternativa interessante para uso na engenharia de tecidos. Como perspectivas, estudos de genotoxicidade nas células integradas aos *scaffolds* devem ser realizados para complementar os dados obtidos para a cultura desses biomateriais e verificar a segurança do emprego dessas técnicas. Ensaio de expressão gênica relacionados aos processos de adaptação celular aos *scaffolds* podem auxiliar e ampliar os conhecimentos a respeito da interação entre a célula e o biomaterial, para que, em um futuro próximo, essa estratégia possa ser utilizada como terapia para a medicina regenerativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 2006;3:589-601.
2. Kwon IK, Kidoaki S, Matsuda T. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* 2005;26:3929-39.
3. Kim K, Luu YK, Chang C, et al. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J Control Release* 2004;98:47-56.
4. Cui W, Wang Q, Chen G, et al. Repair of articular cartilage defects with tissue-engineered osteochondral composites in pigs. *J Biosci Bioeng* 2011;111:493-500.
5. Kumbar SG, Nukavarapu SP, James R, Nair LS, Laurencin CT. Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29:4100-7.
6. Inanc B, Arslan YE, Seker S, Elcin AE, Elcin YM. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2009;90:186-95.
7. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 2007;13:619-27.
8. Adebisi AA, Taslim ME, Crawford KD. The use of computational fluid dynamic models for the optimization of cell seeding processes. *Biomaterials* 2011;32:8753-70.
9. Sahoo S, Lee WC, Goh JC, Toh SL. Bio-electrospraying: A potentially safe technique for delivering progenitor cells. *Biotechnol Bioeng* 2010;106:690-8.
10. Jayasinghe JDWaSN. Bio-electrosprayed multicellular zebrafish embryos are viable and develop normally. *Biomed Mater* 2008;3:1-4.
11. Jayasinghe SN, Eagles PA, Qureshi AN. Electric field driven jetting: an emerging approach for processing living cells. *Biotechnol J* 2006;1:86-94.
12. Paletta JR, Mack F, Schenderlein H, et al. Incorporation of osteoblasts (MG63) into 3D nanofibre matrices by simultaneous electrospinning and spraying in bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2011;21:384-95.

13. Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, Wagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials* 2006;27:735-44.
14. Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998;19:1419-23.
15. J. Lannutti DR, T. Ma, D. Tomasko, D. Farson. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. In: *Materials Science and Engineering C*; 2007:504–9.
16. Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering R* 2001;34:147-230.
17. Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 2005;124:201-8.
18. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;213:341-7.
19. Bernardi L, Luisi SB, Fernandes R, et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod* 2011;37:973-9.
20. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807-12.
21. Lakshmi S. Nair CTL. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007;32:762–98.
22. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001;52:443-51.
23. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001;12:107-24.
24. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater* 2003;5:29-39; discussion -40.
25. Venugopal JR, Prabhakaran MP, Mukherjee S, Ravichandran R, Dan K, Ramakrishna S. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *J R Soc Interface* 2012;9:1-19.
26. HAYASHI T. BIODEGRADABLE POLYMERS FOR BIOMEDICAL USES. *Progress Polymer Science* 1994;19:663-702.
27. Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl* 2011;26:383-417.

28. Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995;16:25-31.
29. Motta AC, Duek EAR. Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria* 2006;11:340-50.
30. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000;21:2335-46.
31. Barbanti SH, Zavaglia CAC. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2005;15:13-21.
32. Sahoo S, Ang LT, Goh JC, Toh S. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010;93:1539–50.
33. Zhao L HC, Gao Y, Cen L, Cui L, Cao Y. Preparation and cytocompatibility of PLGA scaffolds with controllable fiber morphology and diameter using electrospinning method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87:26-34.
34. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng* 2006;12:1197-211.
35. Kim SJJ, DHP, W H; Min, B. Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds. *Polymer* 2010;51:1320–7.
36. Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning approaches toward scaffold engineering--a brief overview. *Artif Organs* 2006;30:785-92.
37. Dan Li YX. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Advanced materials* 2004;16:1151 - 70.
38. Thandavamoorthy Subbiah GSB, R. W. Tock, S. Parameswaran, S. S. Ramkumar. Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 2005;96:557–69.
39. Lim SH, Mao HQ. Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:1084-96.
40. Soletti L, Nieponice A, Guan J, Stankus JJ, Wagner WR, Vorp DA. A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials* 2006;27:4863-70.
41. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004;22:80-6.
42. Soliman S, Sant S, Nichol JW, Khabiry M, Traversa E, Khademhosseini A. Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density. *J Biomed Mater Res A* 2011;96:566-74.

43. Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 1999;64:580-9.
44. Arumuganathar S, Irvine S, McEwan JR, Jayasinghe SN. Aerodynamically assisted bio-jets: the development of a novel and direct non-electric field-driven methodology for engineering living organisms. *Biomed Mater* 2007;2:158-68.
45. Roberts A, Wyslouzil BE, Bonassar L. Aerosol delivery of mammalian cells for tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2005;91:801-7.
46. Zanatta G, Steffens D, Braghirolli DI, Fernandes RA, Netto CA, Pranke P. Viability of mesenchymal stem cells during electrospinning. *Braz J Med Biol Res* 2012;45:125-30.
47. Jayasinghe SN, Qureshi AN, Eagles PA. Electrohydrodynamic jet processing: an advanced electric-field-driven jetting phenomenon for processing living cells. *Small* 2006;2:216-9.
48. Bartolovic K, Mongkoldhumrongkul N, Waddington SN, Jayasinghe SN, Howe SJ. The differentiation and engraftment potential of mouse hematopoietic stem cells is maintained after bio-electrospray. *Analyst* 2010;135:157-64.
49. Hall RP, Ogilvie CM, Aarons E, Jayasinghe SN. Genetic, genomic and physiological state studies on single-needle bio-electrosprayed human cells. *Analyst* 2008;133:1347-51.
50. Eddaoudi A, Townsend-Nicholson A, Timms JF, Schorge S, Jayasinghe SN. Molecular characterisation of post-bio-electrosprayed human brain astrocytoma cells. *Analyst* 2010;135:2600-12.
51. Carter NA, Jayasinghe SN, Mauri C. Biosprayed spleen cells integrate and function in mouse models. *Analyst* 2011;136:3434-7.
52. Abeyewickreme A, Kwok A, McEwan JR, Jayasinghe SN. Bio-electrospraying embryonic stem cells: interrogating cellular viability and pluripotency. *Integr Biol (Camb)* 2009;1:260-6.
53. Prabhakaran MP, Venugopal JR, Ramakrishna S. Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30:4996-5003.
54. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1183-6.

55. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007;9:204.
56. Chen W, Han Y, Chen Y, Xie JT. Field-induced electroconformational damages in cell membrane proteins: a new mechanism involved in electrical injury. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1998;47:237-45.
57. Eagles PA, Qureshi AN, Jayasinghe SN. Electrohydrodynamic jetting of mouse neuronal cells. *Biochem J* 2006;394:375-8.
58. Jayasinghe SN, Townsend-Nicholson A. Stable electric-field driven cone-jetting of concentrated biosuspensions. *Lab Chip* 2006;6:1086-90.
59. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;23:143-51.
60. Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman LC, Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett* 2008;266:60-72.
61. Zhao S, Wu X, Wang L, Huang Y. Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions. *Journal of Applied Polymer Science* 2004;91:242-6.
62. Paletta J, Erffmeier K, Theisen C, et al. Influence of poly-(L-lactic acid) nanofiber functionalization on maximum load, Young's modulus, and strain of nanofiber scaffolds before and after cultivation of osteoblasts: an in vitro study. *ScientificWorldJournal* 2009;9:1382-93.
63. Hsia HC, Nair MR, Mintz RC, Corbett SA. The fiber diameter of synthetic bioresorbable extracellular matrix influences human fibroblast morphology and fibronectin matrix assembly. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:2312-20.
64. Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal* 2009;7:6.
65. Navarro M, Aparicio C, Charles-Harris M, Ginebra MP, Engel E, Planell JA. Development of a Biodegradable Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering: Physicochemical, Topographical, Mechanical, Degradation, and Biological Properties. *Adv Polym Sci* 2006;200:209-31.
66. Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res* 1999;48:342-53.

67. Ellis MJ, Chaudhuri JB. Human Bone Derived Cell Culture on PLGA Flat Sheet Membranes of Different Lactide:Glycolide Ratio. *Biotechnology and Bioengineering* 2008;101:369-77.
68. Shin HJ, Lee CH, Cho IH, et al. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006;17:103-19.
69. Blackwood KA, McKean R, Canton I, et al. Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement. *Biomaterials* 2008;29:3091-104.
70. Table 2: Protective Action Criteria (PAC) Rev 26 based on applicable 60-minute AEGLs, ERPGs, or TEELs., 2010. (Accessed 02/07/2012, at http://www.atlant.com/DOE/teels/teel/Revision_26_Table2.pdf.)
71. Ghantous HN, Fernando J, Gandolfi AJ, Brendel K. Sevoflurane is biotransformed by guinea pig liver slices but causes minimal cytotoxicity. *Anesth Analg* 1992;75:436-40.
72. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2007;28:3074-82.
73. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res* 2000;51:376-82.
74. Cheng G, Youssef BB, Markenscoff P, Zygorakis K. Cell population dynamics modulate the rates of tissue growth processes. *Biophys J* 2006;90:713-24.
75. Andrews KD, Hunt JA, Black RA. Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. *Biomaterials* 2007;28:1014-26.
76. Tomedi J. Desenvolvimento de matriz extracelular temporária para gênese de mucosa urotelial. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
77. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119:2204-13.

ANEXOS

ANEXO I. Protocolos para obtenção, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais.

1. Obtenção de células-tronco mesenquimais

Para o desenvolvimento do presente trabalho, cinco culturas primárias de células-tronco mesenquimais de tecido pulpar foram estabelecidas. Para isso, cinco dentes decíduos em processo de rizólise foram extraídos e transportados até à capela de fluxo laminar vertical para a continuidade do protocolo de isolamento. Para o transporte, os dentes foram submersos em 1mL de meio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/Hepes (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 0,45µg/mL de gentamicina à temperatura ambiente. Todos os procedimentos foram realizados após concordância dos responsáveis pelos pacientes, através da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cadastrado no projeto nº 19273.

O isolamento de CTMs a partir de polpa dentária foi realizado por digestão mecânica e enzimática. Em cabine de segurança biológica, o tecido pulpar foi removido dos dentes com auxílio de instrumentos odontológicos. Após, o tecido foi cortado em vários fragmentos, os quais foram transferidos para solução de colagenase tipo I (Gibco) 0,2%, e, posteriormente, incubados durante 60 minutos a 37°C em banho-maria. Transcorrido esse tempo, as células foram centrifugadas a 800g por 10 minutos, ressuspensas em 1mL de meio de cultura e plaqueadas em placas de cultivo de 12 poços.¹⁹

2. Cultivo de células-tronco mesenquimais

As células foram cultivadas em placas de cultura e mantidas em incubadora a 37°C, umidificadas a 5% de CO₂. Após 24h do plaqueamento celular inicial, as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas de meio de cultura subsequentes foram realizadas a cada 3 ou 4 dias. Ao atingir 90% de confluência, as culturas primárias foram lavadas com solução Hank's livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ (Sigma-Aldrich) e então tripsinizadas com solução 0,25% de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich). As células foram ressuspensas em

meio de cultura e plaqueadas em novas garrafas de cultivo celular para expansão. Repiques subsequentes foram realizados de maneira idêntica até as células atingirem a 6ª passagem, quando foram utilizadas nos experimentos propostos.

3. Caracterização de células-tronco mesenquimais

As células aderentes isoladas de dentes decíduos foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais pelas seguintes propriedades: (1) capacidade de aderência ao plástico e morfologia característica, (2) perfil imunofenotípico e (3) plasticidade. Essas análises foram realizadas em três diferentes culturas primárias.

3.1. Capacidade de adesão ao plástico e análise morfológica das culturas celulares:

A presença das células aderentes, confluência e morfologia característica foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Olympus.

3.2. Avaliação da plasticidade celular

Para análise da capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^3 células/cm². Quando atingiram confluência adequada, iniciaram-se os tratamentos de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica. Foram utilizados meios especiais de diferenciação, segundo protocolos descritos por Meirelles e Nardi.⁷⁷ Os controles receberam apenas meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

I - Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/Hepes suplementado com 6,25 µg/mL de insulina, 10 ng/mL TGF-β1 e 50 nM de solução de ácido ascórbico-2 fosfato (Asap). O meio foi trocado a cada 3-4 dias. Após aproximadamente 21 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com *Alcian Blue* para demonstração da condrogênese.

II - Diferenciação adipogênica

As células foram cultivadas por cerca de 3 semanas em meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) contendo 20% de plasma humano, dexametasona (10^{-7} M), insulina (2,5 µg/ml), indometacina (5µM), rosiglitazona (5µM) e heparina sódica (10

unidades/mL). Os adipócitos foram identificados por observação ao microscópio com contraste de fase e por coloração com Oil Red O dos vacúolos lipídicos.

III - Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação em osteócitos, as células foram mantidas durante 3 a 4 semanas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/Hepes suplementado com soro fetal bovino (10%), dexametasona (10^{-8} M), ácido ascórbico 2-fosfato (5 µg/ml) e β-glicerofosfato (10mM). A detecção da diferenciação foi realizada através da coloração com Alizarin Red que cora cristais de fosfato de cálcio na matriz.

3.3. Perfil imunofenotípico das células cultivadas

As células foram caracterizadas quanto à presença de marcadores de células-tronco mesenquimais e ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas através da técnica de citometria de fluxo.

Para a correta identificação dos antígenos, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais CD14/FITC, CD29/PE, CD34/PE, CD44/FITC, CD45/FITC, CD73/PE, CD90/FITC, CD184/PE, HLADR/FITC e Stro1/PE (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA). Para sua determinação, foram incubados 100 µL da suspensão celular (100.000 células) com 5 µL de cada anticorpo monoclonal anti-humano. O marcador 7AAD (7-Amino Actinomycin D) foi utilizado para avaliação da viabilidade celular. Como controles, foram utilizados anticorpos monoclonais isotípicos conjugados aos fluorocromos PE e FITC.

Após a incubação com os anticorpos, durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSAria III (Becton Dickinson), equipado com laser de argônio para 488 nm. O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular, e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos PE e FITC. Para cada amostra foram adquiridos em torno de 10.000 eventos, e a análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva versão 6.0 (Becton Dickinson).

ANEXO II: Avaliação de viabilidade celular em função dos diferentes parâmetros de *bio-electrospraying*. Após o BES, a viabilidade celular foi determinada e comparada à viabilidade inicial. Para melhor interpretação dos resultados, a viabilidade inicial foi considerada como 100% e a viabilidade após o BES foi corrigida conforme esse valor. Os resultados estão demonstrados como viabilidade corrigida, na forma de média \pm desvio padrão (Tabela I). Todas as avaliações foram realizadas em 4 linhagens celulares diferentes, em triplicata.

Tabela I. Viabilidade celular após *bio-electrospraying*

Parâmetros do BES	Variantes avaliadas	Viabilidade após BES (%)
Tensão	15 kV (+14/-1kV)	96,8 \pm 2,3
	20 kV (+19/-1kV)	96,8 \pm 4,7
	25 kV (+24/-1kV)	94,7 \pm 3,9
	30 kV (29/-1 kV)	92,5 \pm 7,0
Fluxo	0,28 mL.h ⁻¹	94,1 \pm 3,6
	0,46 mL.h ⁻¹	96,8 \pm 2,3
	0,65 mL.h ⁻¹	93,8 \pm 5,1
	2,60 mL.h ⁻¹	96,5 \pm 2,6
Distância	4 cm	93,0 \pm 4,3
	6 cm	95,0 \pm 5,2
	8 cm	94,2 \pm 4,7
Tempo	15 min	93,0 \pm 4,4
	30 min	93,7 \pm 10,7
	60 min	92,8 \pm 7,4

ANEXO III: Resumo aprovado para apresentação no VII Congresso Latino Americano de Órgãos-Artificiais e Biomateriais (COLAOB - 2012)

ELECTROSPINNING: A VERSATILE TECHNIQUE TO PRODUCE BIODEGRADABLE SCAFFOLDS FOR USE IN TISSUE ENGINEERING

Fernanda Zamboni¹; Daikelly Iglesias Braghirolli^{1,2}; Mariana de Conto Fin¹; Diogo André Pilger¹; Patricia Pranke^{1,2,3}

¹ Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, ² Material Science Post-graduation Program, Federal University of Rio Grande do Sul; ³ Stem Cell Research Institute (SCRI). Porto Alegre, RS, Brazil.

The use of stem cells with nanofibrous scaffolds produced by electrospinning is a promising tool for tissue engineering. The electrospinning technique has the advantage in forming scaffolds with fibers in a nanometric scale, imitating the collagenous fibers from the extracellular matrix in structure and dimension. Besides, these scaffolds present a higher superficial area and interconnected pores, exhibiting a favorable feature to the transport of nutrients and oxygen between cells and a favorable feature in cellular adhesion. Thus, electrospun scaffolds can be widely used to promote cell growth and all its inherent characteristics listed above contribute to the upcoming application in tissue repair. The efficacy of these scaffolds depends on the interaction between cells and its fibers. The electrospinning process can be modulated by several variables resulting in different morphologies and diameters of fibers. In this study, electrospun biocompatible and biodegradable composite scaffolds were prepared using three different poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) concentrations. It was examined diameter and formation of beads and it was also evaluated the potential of stem cells for adhesion and proliferation on the scaffolds. PLGA was dissolved in hexafluoro-2-propanol to create 8%, 12% and 20% (w/v) solutions. The experimental set-up to conduct the electrospinning included a high voltage of 12kV, a collector to needle distance of 15 cm, a constant flow rate of 0.16 mL/h and a 1mL syringe fitted with an 18 gauge needle. The scaffold morphology was analyzed by Scanning Electron Microscope and the fiber diameter was determined using ImageJ software. The images demonstrated that 8%, 12% and 20% of PLGA solutions produced different types of nanofibers (Figure 1). 8% PLGA scaffolds had a large amount of beads along the fibers and it was also observed a large number of thin broken fibers. As concentration and viscosity of PLGA solutions increased, beads's density declined. For example, in the scaffolds produced from 20% PLGA solution no beads were noted. The diameter of fibers increased along the polymer concentrations. The average diameter of fibers was 42 ± 11 nm for 8% PLGA solution, 547 ± 205 nm for 12% PLGA solution and 1014 ± 178 nm for 20% PLGA solution. After their production, scaffolds were sterilized with antimicrobial solution (1% of penicillin-streptomycin and 1% of fungizone in PBS 1X) for 2 hours and then the cell studies were carried out. Human mesenchymal stem cells were isolated from deciduous dental pulp and cultured in DMEN media supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic, in a humidified atmosphere at 5% CO₂ and a temperature of 37°C. Teeth were extracted under approved guidelines set by the Federal University of Rio Grande do Sul with informed patients consent. Mesenchymal stem cells between 6th until 10th passage were seeded onto the scaffolds and analyzed in terms of adhesion and proliferation rates (n=4). To evaluate proliferation, MTT assay was utilized and results were statistically analyzed by Kruskal Wallis's test. To evaluate adhesion, cells were stained with DAPI, photographed and counted. An ANOVA test followed by a Tukey's post hoc test was then performed. All the groups of scaffolds were good substrates to sustain cellular adhesion. The number of adhered cells on each type of scaffold after 6h of culture was similar between the three groups (p>0.05) (Figure 2). Mesenchymal stem cells were also able to proliferate on all the scaffolds (Figure 3). The MTT assay displayed a significant increasing absorbance (p<0.05) from 1 day to 15 days of culture in all samples. The results demonstrate that the three

fiber's diameters and morphologies obtained by different PLGA concentrations are appropriate for cell culture, supporting the idea that electrospinning is a versatile technique to produce nanofiber scaffolds and has a great potential for future application in tissue engineering.

Financial support: CNPq, Capes, Fapergs and SCRI.

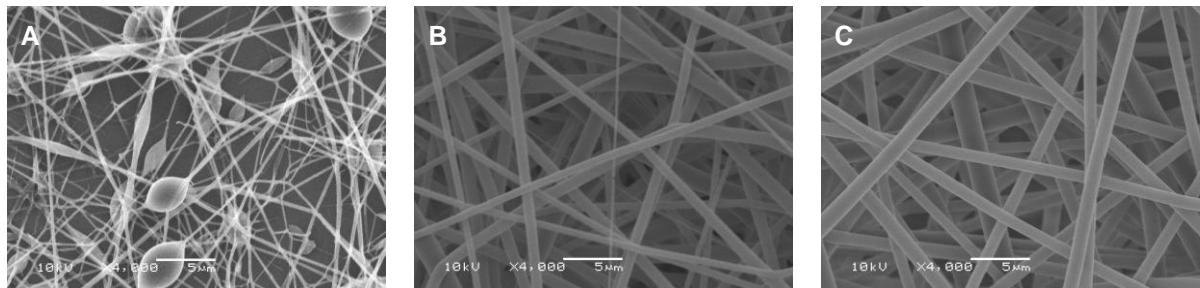


Figure 1. Scanning electron microscopy of scaffolds produced with PLGA (A) 8%, (B) 12% and (C) 20%.

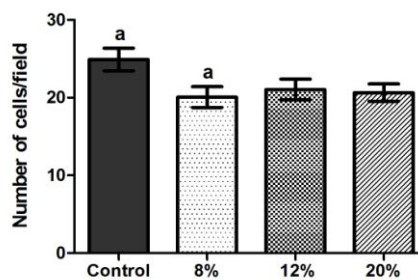


Figure 2. Cell adhesion on scaffolds produced with different PLGA concentrations.

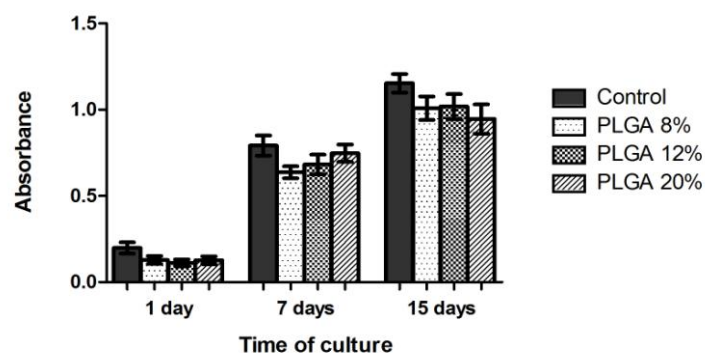
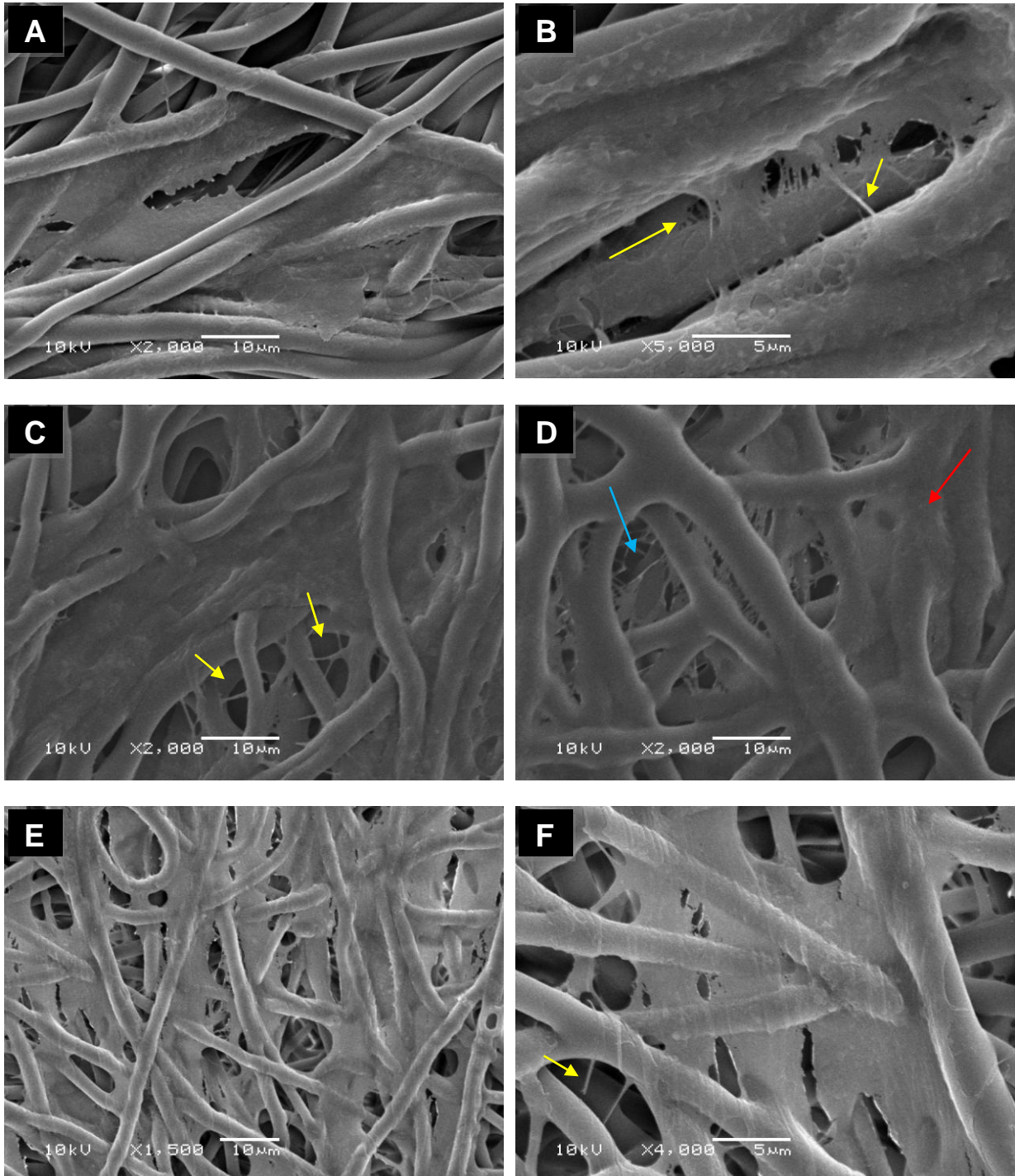


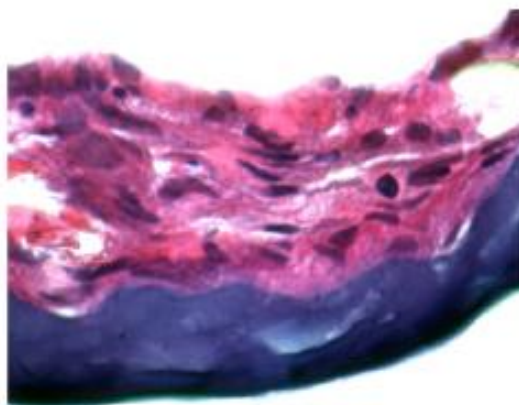
Figure 3. Proliferation of cells on PLGA scaffolds produced with different concentrations of PLGA.

ANEXO IV: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* contendo células-tronco em (A e B) 1 dia de cultivo, (C e D) 7 dias de cultivo e (E e F) 15 dias de cultivo.



*Setas amarelas indicam as expansões celulares formando “pontes” entre as fibras; setas vermelhas demonstram a presença de células na superfície dos *scaffolds* enquanto as setas azuis demonstram a presença de células no interior dessa estrutura.

ANEXO V: Análise histológica de células-tronco adiposo derivadas sobre *scaffolds* de gelatina contendo heparina e ácido hialurônico, produzidos por *electrospinning*. As células foram semeadas através do método de semeadura estática. Análise histológica realizada após 15 dias de cultivo. (Magnificação: 400x)



*Imagem concedida pelo autor.⁷⁶