

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Desenvolvimento de Protocolo para o Cultivo de Células-tronco
em Biorreatores de Perfusão para a Engenharia de Tecidos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Favassa Chiot

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Desenvolvimento de Protocolo para o Cultivo de Células-tronco
em Biorreatores de Perfusão para a Engenharia de Tecidos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Favassa Chiot

Dissertação de mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Engenharia de Tecidos

Orientadores: Prof. Dr. Nilo S. M. Cardozo

Prof^a. Dr^a. Isabel C. Tessaro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia H. L. Pranke

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Clair e Evanir, pelo apoio, carinho e por tornarem possível este momento.

Aos meus orientadores, Dr^o Nilo e Dr^a Isabel, pela orientação, apoio, paciência, dedicação e oportunidade para desenvolver esta pesquisa.

Á minha co-orientadora, Dr^a Patricia, pelo conhecimento compartilhado, apoio, dedicação e pela parceria neste projeto.

À Dr^a Debora Faccin pelos conselhos e conhecimentos compartilhados.

Às alunas de doutorado Ágata, Daniela e Daikelly, sem as quais este trabalho não seria possível.

Á todos os meus colegas do IPCT, que de alguma forma contribuíram com o trabalho.

Aos colegas do LASEM pelo apoio e conselhos.

Ao CME da UFRGS.

À UFRGS e ao PPGEQ, seus professores e funcionários.

Ao IPCT pelo apoio financeiro e estrutura física para a realização dos experimentos.

Á Finep e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Á todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A engenharia de tecidos é uma área de pesquisa que busca alternativas para a regeneração de tecidos danificados. Uma subárea dessa nova ciência faz uso das células-tronco, capazes de participar do processo de regeneração tecidual. As células são cultivadas em suportes porosos chamados de biomateriais ou *scaffolds*. As células-tronco mesenquimais de polpa de dente são células multipotentes e fáceis de serem obtidas. A policaprolactona, polímero atóxico, tem sido vastamente utilizada na fabricação de *scaffolds* devido as suas propriedades mecânicas, adequadas para a regeneração de alguns tecidos. A cultura dinâmica em biorreatores vem sendo utilizada pela sua capacidade de mimetizar as condições do ambiente natural das células-tronco no organismo humano. O objetivo do presente trabalho foi definir um protocolo de cultivo de células-tronco mesenquimais da polpa de dente em *scaffolds* de policaprolactona em multicamada, utilizando biorreatores de perfusão. Os biorreatores foram projetados com base em informações presentes na literatura. Os *scaffolds* de policaprolactona foram produzidos por *electrospinning* e apresentaram um diâmetro de 15 mm, aproximadamente 300 µm de espessura e diâmetro médio das fibras de $0,98 \pm 0,24$ µm. O cultivo estático, para fins de comparação, foi realizado em triplicata. Para o cultivo dinâmico, analisaram-se 3 diferentes vazões: $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Nos dias 1, 3 e 7 de cultivo celular as análises de viabilidade celular foram realizadas pelo ensaio de WST-8, a citotoxicidade pela dosagem de LDH e de adesão celular pela histologia. As células cultivadas nos *scaffolds* do topo da estrutura em camadas apresentaram maior viabilidade celular para as vazões de $0,1$ e $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ entre os dias 1 e 7 do cultivo celular. O cultivo dinâmico realizado na vazão de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ obteve um número baixo de células viáveis em todos os dias de análise. No cultivo estático, a viabilidade celular aumentou do primeiro ao sétimo dia de cultivo, mas permaneceu abaixo da maior vazão testada. As análises de histologia confirmaram a presença de células nas superfícies dos *scaffolds*. Os níveis maiores de citotoxicidade foram encontrados para o cultivo dinâmico, principalmente para a vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, bem como foi observada maior viabilidade celular para essa vazão. Ainda é necessário repetir ambos os cultivos para confirmar os resultados e validar o protocolo definido para os experimentos. No entanto, no cultivo dinâmico, a vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ proporcionou resultados promissores para o sistema de perfusão utilizado, podendo comprovar as vantagens do cultivo dinâmico de células-tronco para a medicina regenerativa.

Palavras chave: engenharia de tecidos, células-tronco, *scaffolds* multicamada, biorreatores de perfusão.

ABSTRACT

Tissue engineering is an area of research which seeks for alternatives for the regeneration of damaged tissue. A sub-area of this new science uses stem cells, which are able to participate in the process of tissue regeneration. The cells are cultivated in porous supports called biomaterials or scaffolds. The mesenchymal stem cells from teeth pulp are multipotent cells and are easily obtained. Polycaprolactone, an atoxic polymer, has been extensively used in the production of scaffolds, due to its mechanical properties which are suitable for the regeneration of certain types of tissue. The dynamic cultivation using bioreactors is currently used because of its capacity to immitate the conditions of the natural environment of stem cells in the human organism. The aim of the present study has been to define a protocol for the cultivation of mensechymal stem cells from teeth pulp in multi-layered polycaprolactone scaffolds in perfusion bioreactors. The bioreactors were designed based on current information available in the literature. The polycaprolactone scaffolds were produced by electrospinning and had a diameter of 15 mm, with approximately 300 μm thickness and an average fiber diameter of $0.98 \pm 0.24 \mu\text{m}$. The static cultivation for use as a comparison was carried out in triplicate. Three different flow rates were analyzed for cellular cultivation: $0.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $0.08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and $0.05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The cellular viability analyses were carried out by WST-8 assay, cytotoxicity through an LDH dosage and cellular adhesion by histology on days 1, 3 and 7 of the cellular cultivation. The cultivated cells on the scaffolds, which were above the structure in layers, presented greater cellular viability when the flow rates 0.1 and $0.08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ were used, between days 1 and 7 of the cellular cultivation. When the flow rate of $0.05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ was used in the dynamic cultivation, the lowest number of viable cells in all the days of the analyses was observed. In the static cultivation, cellular viability increased between the first and seventh day of cultivation but remained lower than the dynamic cultivation with the higher flow rate tested. The histological analyses confirmed the presence of cells on the surface of the scaffolds. Both the greatest levels of cytotoxicity and cellular viability were observed in the dynamic cultivation, mainly with the flow rate of $0.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. It is necessary to repeat both the cultivations to confirm the results and to test the efficiency of the protocol defined by the experiments. However, in the dynamic cultivation, the flow rate of $0.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ presented promising results for the perfusion system of this study, showing the advantages of the dynamic cultivation of stem cells for regenerative medicine.

Key words: tissue engineering, stem cells, multilayer scaffolds, perfusion bioreactors.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| Lista de Figuras | ix |
| Lista de Tabelas | xiii |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos | xiv |
| Capítulo 1 | |
| 1. Introdução | 1 |
| Capítulo 2 | |
| 2. Objetivos..... | 3 |
| Capítulo 3 | |
| 3. Revisão Bibliográfica..... | 4 |
| 3.1 Engenharia de Tecidos..... | 4 |
| 3.2 <i>Scaffolds</i> | 6 |
| 3.3 Células-tronco para a engenharia de tecidos..... | 14 |
| 3.3.1 Células-tronco mesenquimais de polpa de dente | 17 |
| 3.4 Biorreatores para a engenharia de tecidos | 19 |
| 3.4.1 Biorreatores de perfusão para a engenharia de tecidos..... | 23 |
| 3.5 Perspectivas para o futuro..... | 26 |
| Capítulo 4 | |
| 4. Materiais e Métodos | 28 |
| 4.1 Obtenção e cultivo de células-tronco mesenquimais..... | 28 |
| 4.2 Caracterização das células-tronco mesenquimais..... | 29 |
| 4.2.1 Análise morfológica das culturas celulares e imunofenotípica das células cultivadas | 29 |
| 4.2.2 Diferenciação celular <i>in vitro</i> | 29 |
| 4.3 <i>Electrospinning</i> | 30 |
| 4.4 Morfologia das fibras..... | 31 |
| 4.5 Diâmetro das fibras..... | 31 |
| 4.6 Projeto do biorreator | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.7 Montagem do sistema de perfusão | 32 |
| 4.8 Cultivo estático | 34 |
| 4.9 Cultivo dinâmico | 35 |
| 4.10 Análise de viabilidade celular | 36 |
| 4.11 Análise de citotoxicidade | 37 |
| 4.12 Histologia..... | 38 |
| 4.13 Análise estatística | 38 |

Capítulo 5

| | |
|--|-----------|
| 5. Resultados e Discussão | 40 |
| 5.1 Projeto do biorreator de perfusão | 41 |
| 5.2 Definição dos parâmetros de <i>electrospinninge</i> caracterização dos <i>scaffolds</i> de PCL | 43 |
| 5.3 Análises de viabilidade após período de incubação | 45 |
| 5.4 Análises de viabilidade celular | 46 |
| 5.4.1 Cultivo estático | 46 |
| 5.4.2 Cultivo dinâmico..... | 49 |
| 5.5 Histologia..... | 54 |
| 5.6 Análises de citotoxicidade | 58 |

Capítulo 6

| | |
|--|-----------|
| 6. Conclusões | 62 |
| 7. Referências Bibliográficas | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Processo de polimerização do anel de monômero cíclico ϵ -caprolactona em policaprolactona (Adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Polycaprolactone#/media/File:Pcl_synthesis.png)..... | 8 |
| Figura 2. Imagens de MEV para os <i>scaffolds</i> sem células (A) $3,24 \pm 0,29 \mu\text{m}$, (B) $5,0 \pm 0,29 \mu\text{m}$, (C) $6,7 \pm 0,56 \mu\text{m}$, (D) $8,7 \pm 0,57 \mu\text{m}$, (E) $12,1 \pm 1,21 \mu\text{m}$ e para seções coradas com DAPI após 3 dias de cultivo (F-J) (Adaptado de BALGUID <i>et al.</i> , 2009)..... | 10 |
| Figura 3. Esquema simplificado do processo de <i>electrospinning</i> com formação do cone de Taylor. O equipamento é, basicamente, composto pelo coletor, seringa com agulha e um fornecedor de alta voltagem (Adaptado de SOLIMAN <i>et al.</i> , 2010). | 11 |
| Figura 4. Imagens de MEV para a avaliação das fibras de PCL eletrofiadas com diâmetros de fibra de (A) $2 \mu\text{m}$, (B) $3 \mu\text{m}$, (C) $4 \mu\text{m}$, (D) $5 \mu\text{m}$, (E) $6 \mu\text{m}$, (F) $7 \mu\text{m}$, (G) $8 \mu\text{m}$ e (H) $10 \mu\text{m}$ (Adaptado de PHAM <i>et al.</i> , 2006)..... | 12 |
| Figura 5. Imagens de MEV para fibroblastos cultivados na placa (A-C), no coletor à 60 RPM (D-F) e à 28 RPM (G-I) nos dias 1 (A, D, G), 3 (B, E, H) e 5 (C, F, I). (Adaptado de ZHU <i>et al.</i> , 2008)..... | 13 |
| Figura 6. Exemplos de montagens de <i>scaffolds</i> em multicamada. (a) Cinco <i>scaffolds</i> em camada para cultivo estático com semeadura alternada e (b) em todos os <i>scaffolds</i> (Adaptado de DUNN <i>et al.</i> , 2006); (c) <i>scaffolds</i> em camada com as células semeadas, (d) para cultura estática, (e) enrolados para cultura dinâmica (Adaptado de PAPENBURG <i>et al.</i> , 2009); (f) <i>scaffolds</i> empilhados em várias camadas sobre um suporte (Adaptado de SROUJI <i>et al.</i> , 2008)..... | 14 |
| Figura 7. Transições da célula-tronco mesenquimal em diversos fenótipos (Adaptado de CAPLAN, 2007)..... | 16 |
| Figura 8. Imagem de células-tronco mesenquimais da polpa de dente (Adaptado de SUCHANEK <i>et al.</i> , 2009)..... | 17 |
| Figura 9. Imagem com as partes do dente humano destacadas (Adaptado de YELICK & VACANTI, 2004)..... | 18 |
| Figura 10. Biorreatores utilizados para o cultivo celular na engenharia de tecidos. (a) Frasco giratório, (b) biorreator de parede rotativa e (c) sistema de perfusão (Adaptado de YEATTS <i>et al.</i> , 2013)..... | 22 |

| | |
|---|----|
| Figura 11. Esquema demonstrando o fluxo com caminho preferencial dentro do biorreator e com perfusão pelos poros do <i>scaffold</i> (Adaptado de SAILON <i>et al.</i> , 2009)..... | 24 |
| Figura 12. Biorreator de perfusão desenvolvido por Jaasma e colaboradores (2008) para a engenharia de tecidos (Adaptado de JAASMA <i>et al.</i> , 2008)..... | 24 |
| Figura 13. Imagens do sistema de descclularização e recelularização desenvolvido para rins de ratos. (a) Biorreator de perfusão e (b) rim em processo de recelularização(Adaptado de SONG <i>et al.</i> , 2013)..... | 27 |
| Figura 14. Equipamento de <i>electrospinning</i> utilizado para fabricação dos <i>scaffolds</i> . (1) seringa com a solução polimérica; (2) coletor para deposição das fibras; (3) eletrodos; (4) bomba e (5) fonte de alta tensão. | 30 |
| Figura 15. (a) Biorreator de perfusão e (b) estante utilizada para sustentação dos biorreatores durante o experimento. | 33 |
| Figura 16. (a) Tampa do reservatório com as aberturas para entrada e saída do meio de cultivo e colocação do filtro para gases, (b) reservatório com a tampa, (c) mangueira de silicone para entrada do meio de cultivo acoplada ao capilar de vidro e (d) mangueira de silicone para saída do meio de cultivo acoplada a um capilar de vidro e a um adaptador para encaixe no biorreator. | 33 |
| Figura 17. Sistema para o cultivo dinâmico montado dentro da incubadora formado por: (a) biorreatores, (b) mangueiras, (c) bomba peristáltica, (d) reservatórios para o meio de cultivo e (e) filtros para gases..... | 34 |
| Figura 18. Placa de cultivo de 24 poços com a triplicata dos <i>scaffolds</i> em multicamada para o cultivo estático..... | 35 |
| Figura 19. Montagem dos <i>scaffolds</i> em sanduíche dentro do biorreator..... | 36 |
| Figura 20. Esquema que demonstra a posição dos <i>scaffolds</i> dentro do biorreator. O primeiro <i>scaffold</i> depositado dentro do biorreator é denominado de <i>scaffold</i> inferior, o segundo de <i>scaffold</i> intermediário e o último de <i>scaffold</i> superior. | 40 |
| Figura 21. Primeiro protótipo desenvolvido para o projeto do biorreator (Baseado em JAASMA <i>et al.</i> , 2008)..... | 42 |
| Figura 22. Modelo para o biorreator de perfusão com parafusos (baseado em Jaasma <i>et al.</i> , 2008)..... | 42 |
| Figura 23. (a) Biorreator de perfusão desenvolvido para o cultivo das células-tronco. (b) Parte superior de teflon, (c) parte inferior de vidro, (d) passagem confeccionada para o escoamento do fluido de trabalho e (e) suporte de teflon onde os <i>scaffolds</i> semeados foram colocados. | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 24. Imagens do MEV das amostras de <i>scaffolds</i> de PCL em diversos aumentos (20000x, 2000x e 200x)..... | 44 |
| Figura 25. Histograma para a distribuição dos diâmetros das fibras das amostras de <i>scaffolds</i> | 45 |
| Figura 26. Regressão linear para os dados de absorvância após o período de incubação. Coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,998. | 46 |
| Figura 27. Avaliação da viabilidade celular nos <i>scaffolds</i> submetidos ao cultivo estático. As linhas demonstram a posição dos <i>scaffolds</i> no interior da placa. Valores significativos para os cultivos estáticos e dias de cultivo ($p < 0,05$) ($n=3$ para cada estático). Não foram encontrados valores significativos entre os <i>scaffolds</i> | 48 |
| Figura 28. Avaliação da viabilidade celular nos <i>scaffolds</i> submetidos ao cultivo dinâmico na vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As linhas demonstram a posição dos <i>scaffolds</i> no interior do reator. Valores significativos foram encontrados para os dias de análise e entre os <i>scaffolds</i> ($p < 0,05$) ($n=2$). | 51 |
| Figura 29. Avaliação da viabilidade celular nos <i>scaffolds</i> submetidos ao cultivo dinâmico na vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As linhas demonstram a posição dos <i>scaffolds</i> no interior do reator. Não foi encontrada diferença estatística significativa ($n=2$). | 52 |
| Figura 30. Avaliação da viabilidade celular nos <i>scaffolds</i> submetidos ao cultivo dinâmico na vazão de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As linhas demonstram a posição dos <i>scaffolds</i> no interior do reator. Valores significativos foram encontrados para os dias de análise ($p < 0,05$) ($n=2$). | 53 |
| Figura 31. Imagens de histologia das células nos <i>scaffolds</i> (superior, intermediário e inferior) para o cultivo estático nos dias 1 e 7. | 55 |
| Figura 32. Imagens de histologia das células nos <i>scaffolds</i> (superior, intermediário e inferior) do cultivo dinâmico, para o biorreator com vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, nos dias 1 e 7 de cultivo celular. | 56 |
| Figura 33. Imagens de histologia das células nos <i>scaffolds</i> (superior, intermediário e inferior) para o biorreator com vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para os dias 1 e 7. | 57 |
| Figura 34. Imagens de histologia das células nos <i>scaffolds</i> (superior, intermediário e inferior) para o biorreator com vazão de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para os dias 1 e 7. | 57 |
| Figura 35. Dosagem de LDH no sobrenadante dos cultivos dinâmicos (realizados com diferentes vazões). Houve influência das vazões sobre o cultivo celular, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). | 59 |

Figura 36. Dosagem de LDH no sobrenadante do cultivo estático. O controle positivo representa o controle de morte celular, onde houve um extravasamento máximo da enzima LDH.61

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Dados de absorvância para os cultivos estáticos (em triplicata) para os <i>scaffolds</i> superior, intermediário e inferior..... | 47 |
| Tabela 2. Dados de absorvância para os cultivos dinâmicos nas vazões de 0,1 mL.min ⁻¹ , 0,08 mL.min ⁻¹ e 0,05 mL.min ⁻¹ para os <i>scaffolds</i> superior, intermediário e inferior. | 50 |
| Tabela 3. Concentração de LDH (u/L) presente no sobrenadantedos cultivos dinâmicos nas vazões 0,1 mL.min ⁻¹ , 0,08 mL.min ⁻¹ e 0,05 mL.min ⁻¹ | 58 |
| Tabela 4. Concentração de LDH (u/L) presente no sobrenadante dos cultivos estáticos e controle positivo. | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------|--|
| 7AAD | 7-amino-actinomicina D |
| Arg-Gly-Asp | Arginina-Glicina-Ácido aspártico |
| AsAP | Ácido ascórbico-2 fosfato |
| C_1 | Concentração da enzima LDH no volume V_1 (u/L) |
| C_2 | Concentração da enzima LDH no volume V_2 (u/L) |
| CME | Centro de Microscopia Eletrônica |
| CO_2 | Dióxido de Carbono |
| CTPi | Células-tronco pluripotentes induzidas |
| CT | Células-tronco |
| CTMs | Células-tronco mesenquimais |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| FT | Fosfato tricálcico |
| HA | Hidroxiapatita |
| MEC | Matriz extracelular |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| mMHepes | N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) |
| MQ_e | Quadrado das médias das amostras |
| MQ_d | Quadrado das médias dentro de cada amostra. |
| PCL | Policaprolactona |
| PGA | Poliglicolato |
| PLA | Polilactato |
| PLLA | Poli(L ácido láctico) |
| PLGA | Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) |
| TGF- β 1 | Fator transformador de crescimento β 1 (do inglês – <i>transforming growth factor beta 1</i>) |
| UV | Luz ultravioleta |

- V_1 Volume de 30 mL de meio do reservatório no cultivo dinâmico
- V_2 Volume de 1 mL de meio do cultivo estático

CAPÍTULO 1

1. Introdução

A investigação de técnicas alternativas aos transplantes de órgãos e tecidos levou ao surgimento da engenharia de tecidos, uma área de pesquisa que envolve conhecimentos de engenharia, química, biologia e ciências da saúde. A engenharia de tecidos busca desenvolver materiais para serem implantados no organismo humano, para substituir ou aprimorar o funcionamento de órgãos e tecidos danificados. Tais biomateriais podem estar associados ou não ao uso de células e moléculas bioativas.

O corpo humano possui uma habilidade natural para a regeneração de tecidos através das células-tronco, que são utilizadas em terapias celulares pelo seu potencial de proliferação e diferenciação. As células-tronco podem ser cultivadas em suportes porosos (*scaffolds*) desenvolvidos especificamente na tentativa de possibilitar o seu crescimento e a formação do tecido desejado.

O método de cultivo mais tradicional é o cultivo estático, no qual as células são depositadas nos suportes e são cultivadas com uma solução contendo os nutrientes necessários para o crescimento celular. Entretanto, mesmo com suportes apropriados, o cultivo estático pode apresentar problemas na distribuição de nutrientes do meio cultivo para as células, prejudicando o desenvolvimento uniforme de tecidos e órgãos, visto que não consegue simular a arquitetura adequada de um tecido vivo sob a ação de um fluido biológico.

Com objetivo de obter uma distribuição mais eficiente de nutrientes para as células, foram desenvolvidos sistemas com cultivos dinâmicos, nos quais a alimentação do meio de cultivo, que contém os nutrientes, é realizada de maneira contínua através de biorreatores. Dentre os biorreatores utilizados na engenharia de tecidos, destacam-se os sistemas de perfusão, nos quais o meio de cultivo é bombeado diretamente pelos poros dos *scaffolds*, de maneira contínua, proporcionando uma distribuição melhor dos nutrientes para as células.

O interesse pelo estudo de cultivos dinâmicos vem crescendo nos últimos anos dentro da engenharia de tecidos e o desenvolvimento de protocolos para esse tipo de cultivo podem auxiliar no andamento de pesquisas na área e facilitar o avanço da engenharia de tecidos.

Dessa forma, no Capítulo 2 está apresentado o objetivo do presente trabalho, que envolve a adaptação do cultivo estático de células-tronco em *scaffolds* multicamada para o cultivo dinâmico em biorreatores por meio de etapas específicas que englobam o projeto e fabricação dos biorreatores de perfusão, a fabricação dos *scaffolds* e a realização dos cultivos estáticos e dinâmicos. A revisão bibliográfica presente no Capítulo 3 compreende uma introdução sobre a engenharia de tecidos, revisando os aspectos pertinentes aos *scaffolds*, incluindo os materiais utilizados e as técnicas de fabricação, além de informações sobre as células-tronco. Por fim, são apresentados os biorreatores, as características fundamentais para o projeto de desenvolvimento de um biorreator, os tipos de biorreatores utilizados para cultivo celular e dados de pesquisas com cultivos dinâmicos utilizados como referência. O Capítulo 4 apresenta a metodologia empregada para os cultivos e análises durante o desenvolvimento do presente projeto e também a descrição dos materiais necessários para os procedimentos. Por sua vez, o Capítulo 5 apresenta os resultados obtidos a partir das análises experimentais e a discussão realizada com referência aos dados da literatura. Por fim, no Capítulo 6 estão relacionadas as conclusões do trabalho experimental com base nos objetivos definidos, além de algumas sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

2. Objetivos

O objetivo geral e os específicos desta dissertação de mestrado estão descritos a seguir.

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi adaptar o cultivo estático de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dentes decíduos em *scaffolds* em multicamadas para o cultivo dinâmico através de um biorreator de perfusão.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos para atingir o objetivo geral deste trabalho estão listados a seguir.

- projeto de biorreatores de perfusão de pequeno volume;
- obtenção de *scaffolds* de policaprolactona pela técnica de *electrospinning* e caracterizar suas propriedades;
- construção de um sistema com biorreatores de perfusão com potencial adequado para a geração de dados para a modelagem e a otimização do cultivo celular;
- realização do cultivo das células-tronco mesenquimais da polpa de dente decíduo em *scaffolds* de policaprolactona em multicamada em cultivo estático e dinâmico em biorreatores de perfusão.

CAPÍTULO 3

3. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo está apresentada a revisão *bibliográfica* dos assuntos relacionados com o desenvolvimento do presente estudo e alguns conceitos básicos para que o leitor obtenha uma compreensão do estudo desenvolvido nesta dissertação. O capítulo é finalizado com as perspectivas sobre as pesquisas nesta área, evidenciando a contribuição deste trabalho para o desenvolvimento da engenharia de tecidos.

3.1 Engenharia de Tecidos

As cirurgias de transplante são realizadas através da doação de órgãos e tecidos de um indivíduo para outro (transplante alogênico), do próprio paciente (transplante autólogo), de um doador de uma espécie para outra espécie (transplante xenogênico) ou ainda pelo emprego de biomateriais sintéticos. Além da baixa disponibilidade de órgãos e tecidos para o transplante, há também o risco de ocorrer rejeição pelo paciente em relação ao órgão ou tecido transplantado (VACANTI & VACANTI, 2007). Tais restrições, aliadas ao tratamento pós-operatório intenso e com alto custo financeiro (RUSSEL, 1985; VACANTI, 1988 *apud* KAIHARA & VACANTI, 1999), motivaram o desenvolvimento de procedimentos alternativos às cirurgias de transplantes.

Surgiu então, em meados dos anos 80, um campo interdisciplinar de pesquisa denominado engenharia de tecidos, que reúne áreas das ciências da saúde (como medicina, farmácia, odontologia, entre outras), biológicas (biologia, biotecnologia, entre outras), da ciência dos materiais, das engenharias (química, mecânica, etc), da química, dentre outras áreas relacionadas.

Na literatura, ainda há divergência quanto aos termos medicina regenerativa, mais recente, e engenharia de tecidos. Para alguns pesquisadores, a medicina regenerativa refere-se aos procedimentos que envolvem o uso de células-tronco, enquanto outros afirmam que ela

representa uma área mais abrangente, na qual a engenharia de tecidos está inserida e há ainda aqueles que tratam ambos os termos com o mesmo significado (NEREM, 2006).

As técnicas desenvolvidas nessa área são constituídas, essencialmente, pela obtenção de células do doador através de um procedimento de biópsia, com posterior expansão dessas células em laboratório para, em seguida, serem cultivadas em biomateriais conhecidos como *scaffolds*.

A associação das células com o *scaffold* objetiva formar uma matriz extracelular (MEC) porosa (MARTIN *et al.*, 2004) que levará à formação de um tecido vivo (STOCK & VACANTI, 2001) que será implantado no paciente. O objetivo principal é que o novo tecido criado interaja com o já existente no corpo (KARP *et al.*, 2003). Nessa técnica, o próprio paciente pode ser o doador da célula, diminuindo o risco de rejeição pelo organismo em relação ao implante.

Para a regeneração de tecidos podem ser utilizadas células maduras do corpo humano, que são específicas do tecido que será recriado e possuem baixa capacidade de proliferação, ou células-tronco (CT) (não diferenciadas), que possuem a capacidade de se proliferar e diferenciar em outras células (THOMSON, 1998; STOCK & VACANTI, 2001; VATS, 2002; SERAKINCI & KETIH 2006; d'AQUINO, 2008).

Os componentes principais para o sucesso da regeneração do tecido são comumente referidos como a tríade da engenharia de tecidos, formada pelas células, pelos *scaffolds* (CHAN *et al.*, 2008) e por moléculas bioativas, como proteínas e fatores de crescimento.

As células respondem a sinais extracelulares (moléculas bioativas) através do contato com fatores de crescimento, citocinas, proteínas morfogênicas, agonistas, hormônios e íons, que atingem o núcleo celular e ativam um gene específico, que pode promover ou restringir a proliferação, migração e diferenciação celular, bem como a formação da MEC (KOROSSIS *et al.*, 2005).

A MEC está presente naturalmente nos tecidos e é responsável pelas características específicas de cada um, como propriedades mecânicas (elasticidade, rigidez), além de atuar como um canalizador de fatores de crescimento, como regulador da atividade celular e permitir a degradação de parte de sua estrutura, quando necessário, para a neovascularização e

remodelação (CHAN *et al.*, 2008). Essa natureza complexa da MEC torna o projeto de desenvolvimento de *scaffolds* um desafio (SOLIMANet *et al.*, 2010).

3.2 Scaffolds

Biomateriais são materiais projetados especificamente para interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar ou ainda substituir tecidos, órgãos ou demais funções do corpo humano (O'BRIEN, 2011).

Os *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos são matrizes de biomateriais que fornecem o suporte inicial para a adesão, crescimento, proliferação, diferenciação das células (AGRAWAL & RAY, 2001; SACHLOS & CZEMUSZKA, 2003^a; LIU *et al.*, 2007) e formação de vasos sanguíneos (angiogênese) (KARP *et al.*, 2003).

A utilização dos *scaffolds* pode ocorrer pela semeadura e cultura das células *in vitro*, para posterior implante ou pelo transplante direto do suporte no local a ser regenerado no corpo humano, de maneira a utilizar as células daquele ambiente do corpo para induzir a regeneração *in vivo* (O'BRIEN, 2011).

O papel do *scaffold* como matriz é temporário, uma vez que o ideal é o suporte degradar à medida que ocorre a formação natural do novo tecido pelas células (KARP *et al.*, 2003, WOODRUFF & HUTMACHER, 2010) por isso, uma de suas características essenciais é a biodegradabilidade (CHAN *et al.*, 2008). Os produtos dessa degradação devem ser atóxicos e eliminados do corpo humano sem interferir em outros tecidos (O'BRIEN, 2011).

Para atender aos requisitos fundamentais para a formação do tecido, como permitir a aderência e a migração das células pela superfície do *scaffold* e no seu interior, biomateriais compatíveis devem ser utilizados, os quais podem ser naturais (quitina, colágeno), sintéticos (poliméricos, cerâmicos), ou ainda uma combinação de ambos (GRIFFITH, 2002; LIU *et al.*, 2007).

As células interagem com os *scaffolds* por ligações químicas formadas na sua superfície, através do ligante Arg-Gly-Asp (arginina-glicina-ácido aspártico), a qual é uma proteína de reconhecimento celular (SILVA *et al.*, 2007) presente em biomateriais naturais. Essa proteína torna esses materiais biologicamente ativos e promove excelente adesão e

crescimento celular (O'BRIEN, 2011). Entretanto, *scaffolds* formados por biomateriais naturais podem apresentar imunogenicidade, impurezas, com propriedades mecânicas difíceis de serem controladas e disponibilidade restrita na natureza (LIU & MA, 2004). Por isso, a fabricação de *scaffolds* a partir de materiais naturais tem o desafio de formar estruturas homogêneas, reproduzíveis e com boas propriedades mecânicas (O'BRIEN, 2011).

A utilização de materiais sintéticos possui a vantagem de permitir obter suportes com propriedades e parâmetros definidos para controlar as suas características e moldá-las conforme desejado (CHAN *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2007), mesmo que seja necessária a adição de ligantes químicos para interagir com a célula (O'BRIEN, 2011). Idealmente, o *scaffold* deve possuir propriedades mecânicas semelhantes com às da região do corpo onde será implantado (O'BRIEN, 2011). Biomateriais cerâmicos, como a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (FT), costumam ser utilizados na engenharia de tecido ósseo devido a sua elevada rigidez mecânica, a baixa elasticidade e por apresentarem uma superfície considerada dura e quebradiça, proporcionando certa semelhança com a fase mineral do osso (O'BRIEN, 2011). Materiais cerâmicos, contudo, têm um processamento limitado e uma degradabilidade insuficiente (MAQUET & JEROME, 1997; LIU & MA, 2004).

Polímeros costumam ser utilizados em tecidos mais “macios”, como músculos, tecidos cardiovasculares (STAMATIALIS *et al.*, 2008) e cartilagem. Eles destacam-se por sua habilidade de degradação por meio de vias enzimáticas ou pela formação de ligações químicas, que são submetidas à hidrólise quando em contato com o ambiente aquoso (LIU & MA, 2004), facilitando o processo de degradação no corpo humano. Dentre os polímeros que costumam ser utilizados na fabricação de *scaffolds*, destacam-se o polilactato (PLA), o poliglicolato (PGA), o poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), a policaprolactona (PCL) e o policarbonato (VAIL *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2007).

A policaprolactona (PCL) é um polímero semicristalino e hidrofóbico, sintetizado no início da década de 1930 por Van Natta e colaboradores através da polimerização por abertura de anel do monômero cíclico ϵ -caprolactona (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010) como mostra a figura 1. Comparado a outros polímeros, o PCL possui uma degradação mais lenta e, embora o seu uso em áreas médicas e farmacêuticas venha de décadas, durante muitos anos ele foi substituído por outros polímeros em processos que exigiam degradação rápida (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010). O PCL é um polímero que pode ser biodegradado por organismos vivos (bactérias e fungos) ao ar livre, mas encontra dificuldade nesse processo

em animais e organismos humanos, pela falta de enzimas adequadas, o que torna o processo muito demorado (VERT *et al.*, 2009). O processo de degradação pode ser dividido em duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a clivagem hidrolítica não enzimática de grupos éster e, na segunda, quando o polímero está altamente cristalino e com baixa massa molar, a degradação é intracelular (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010).

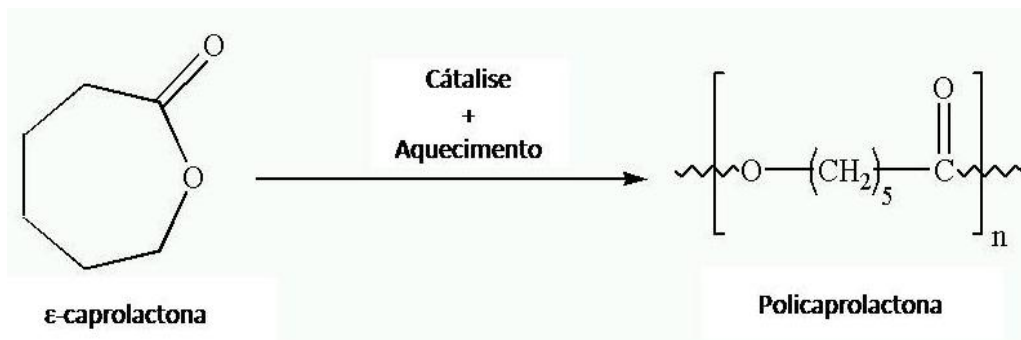


Figura 1. Processo de polimerização do anel de monômero cíclico ϵ -caprolactona em policaprolactona (Adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Polycaprolactone#/media/File:Pcl_synthesis.png).

Com o avanço da engenharia de tecidos nos últimos anos, o PCL vem sendo cada vez mais utilizado por ser um material atóxico, citocompatível com vários tecidos humanos e com propriedades mecânicas flexíveis (como módulo de elasticidade, força de tensão, alongação no ponto de ruptura) (ESTELLÉS *et al.*, 2008; WOODRUFF & HUTMACHER, 2010; DASH & KONKIMALLA, 2012). Outra vantagem do PCL é não degradar lactato, por não possuí-lo na sua composição. A razão molar de lactato produzido por glicose consumida pode auxiliar na determinação da rota metabólica da célula (RADISIC *et al.*, 2002).

O tamanho dos poros, a sua distribuição e a porosidade requeridos pelo *scaffold* também são essenciais para a formação dos canais de migração celular, o fornecimento de nutrientes, a remoção de resíduos e a adesão das células na superfície (HOLLISTER, 2005; O'BRIEN, 2011). Os poros devem ser grandes e estar em número suficiente para permitir a penetração e migração das células da superfície do para o interior do biomaterial, onde as células eventualmente irão formar ligações com os biomateriais (O'BRIEN, 2011). O tamanho dos poros depende do tipo de célula cultivada e costuma variar entre 5 e 500 μm (YANG *et al.*, 2001; PHAM *et al.*, 2006), sendo que deve ser, no mínimo, semelhante ao tamanho das células (TUZLAKOGLU *et al.*, 2005, PHAM *et al.*, 2006). Já foi sugerido que a

dificuldade de infiltração das células nos *scaffolds* está relacionada com o fato do diâmetro médio dos poros do biomaterial ser menor que o tamanho da célula (BOLAND *et al.*, 2004; PHAM *et al.*, 2006).

Segundo Pham e colaboradores (2006), estudos realizados com biomateriais sugerem que as células migram com facilidade em nanofibras (MATTHEWS *et al.*, 2002; YOSHIMOTO *et al.*, 2003; MIN *et al.*, 2004), mas costumam formar uma monocamada de células e MEC, o que limita sua utilização para formação de estruturas mais espessas (tridimensionais) (MO *et al.*, 2004; TUZLAKOGLU *et al.*, 2005). Embora os nutrientes e metabólitos possam migrar pelos nanoporos, tais espaços podem ser pequenos para o crescimento e proliferação das células (ZHU *et al.*, 2008).

As microfibras, embora não estejam nas mesmas faixas de tamanho dos componentes da MEC, possuem poros maiores em relação às nanofibras, o que pode facilitar a infiltração celular e a difusão de nutrientes durante a cultura *in vitro* (TAKAHASHI & TABATA, 2004; PHAM *et al.*, 2006). Balguid e colaboradores (2009) cultivaram miofibroblastos em *scaffolds* de PCL testando diferentes diâmetros de fibras (de $3,24 \pm 0,29$ a $12,1 \pm 1,21$ μm). Na figura 2 estão apresentadas imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para *scaffolds* sem células e para seções coradas com DAPI após 3 dias de cultivo. Observa-se que o diâmetro menor impediu a infiltração das células. Entretanto, conforme o diâmetro aumentava, a distribuição das células melhorava e havia penetração das células nos *scaffolds*, o que leva à conclusão de que até mesmo a menor mudança no diâmetro da fibra pode provocar mudanças significativas na infiltração celular no biomaterial.

O material utilizado e a técnica de fabricação determinam como se dará a interação do biomaterial com as células, bem como a interação célula-célula.

Os *scaffolds* podem ser fabricados por técnicas como liofilização (MOONEY *et al.*, 1996; O'BRIEN *et al.*, 2004), compressão térmica (LI *et al.*, 2001^b), sinterização (FLEMMING *et al.*, 1999; STAMATIALIS *et al.*, 2008), evaporação de solvente (WOO *et al.*, 2001; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011), formação de espuma/lixiviação (YOON *et al.*, 2003), método sol-gel (SILVA, 2012), *electrospinning* (LI *et al.*, 2005; NAM *et al.*, 2007; LIAO *et al.*, 2010; SOLIMAN *et al.*, 2010), dentre outras.

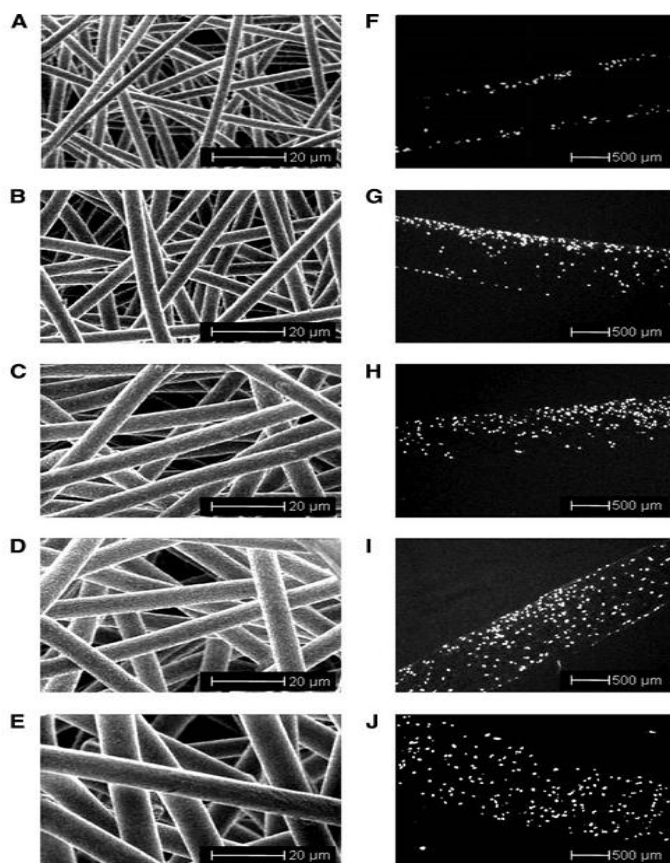


Figura 2. Imagens de MEV para os *scaffolds* sem células (A) $3,24 \pm 0,29 \mu\text{m}$, (B) $5,0 \pm 0,29 \mu\text{m}$, (C) $6,7 \pm 0,56 \mu\text{m}$, (D) $8,7 \pm 0,57 \mu\text{m}$, (E) $12,1 \pm 1,21 \mu\text{m}$ e para seções coradas com DAPI após 3 dias de cultivo (F-J) (Adaptado de BALGUID *et. al*, 2009).

Na técnica de *electrospinning*, a solução polimérica é conservada dentro de uma seringa. A tensão superficial da solução a mantém na ponta da agulha. Quando essa tensão é superada pela carga elétrica, induzida no interior da solução pelo fornecimento de alta voltagem, há a formação do cone de Taylor. Esse é o início do jato da solução polimérica que será direcionado para o coletor. Enquanto isso, o solvente presente na solução evapora e fibras solidificadas são formadas no coletor (PHAM *et al.*, 2006). A figura 3 apresenta um esquema simplificado do processo de *electrospinning*.

Pela técnica de *electrospinning* são gerados *scaffolds* com alta porosidade, fibras com diâmetros variáveis (de nanometro para micrometro) (WNEK *et al.*, 2003; SUBBIAH *et al.*, 2005; PHAM *et al.*, 2006) e com área superficial elevada, o que favorece a adesão celular (BRAGHIROLI *et al.*, 2013). A formação das fibras é controlada por variáveis relacionadas às propriedades da solução polimérica (viscosidade, massa molar do polímero, condutividade elétrica), aos parâmetros do processo (voltagem aplicada, tempo, vazão da solução, etc.), além

de aspectos ambientais (temperatura, umidade, velocidade do ar) (SUN *et al.*, 2014). A estrutura e a morfologia das fibras são influenciadas pelos parâmetros ambientais e pela distância do eletrodo com o coletor, que podem formar fibras úmidas ou secas. A viscosidade da solução (relacionada à concentração da solução) pode inibir a formação de fibras (devido à alta concentração polimérica) ou formar gotas e não um jato na saída da seringa (devido à baixa concentração polimérica), devido à influência da tensão de superfície. Nas baixas concentrações de solução polimérica, fibras finas costumam ser formadas, enquanto que um aumento na concentração leva a um aumento nos diâmetros das fibras e dos poros, características que também podem ser influenciadas pela vazão da solução polimérica. A voltagem aplicada provoca mudanças na forma com a qual o jato é iniciado e também influencia diretamente a estrutura e a morfologia das fibras (BRAGHIROLI *et al.*, 2014).

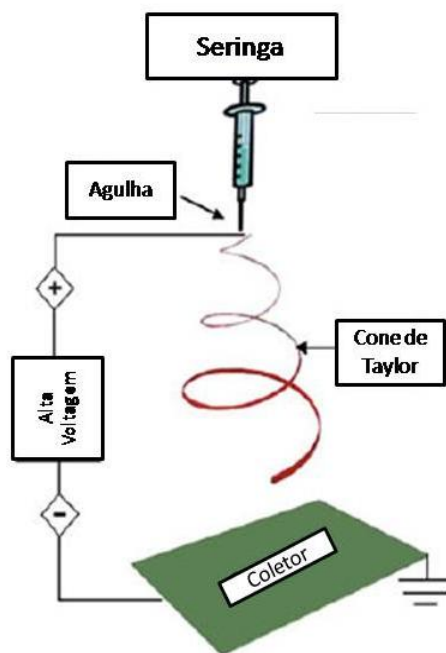


Figura 3. Esquema simplificado do processo de *electrospinning* com formação do cone de Taylor. O equipamento é, basicamente, composto pelo coletor, seringa com agulha e um fornecedor de alta voltagem (Adaptado de SOLIMAN *et al.*, 2010).

Pham e colaboradores (2006) testaram parâmetros para a fabricação de *scaffolds* de PCL por *electrospinning* com os diâmetros das fibras variando de 2 a 10 μm . Imagens de MEV para essas fibras podem ser visualizadas na figura 4. Para as fibras de tamanhos maiores, de 8 e 10 μm , a diferença entre o diâmetro das fibras formadas nas superfícies

superior e inferior desses *scaffolds* foi estatisticamente significativa, indicando que é mais difícil controlar e manter um tamanho uniforme da fibra na estrutura do *scaffold* para altos valores de diâmetro.

Em tecidos com alta vascularização, como a pele, Zhu e colaboradores (2008) testaram a aplicação do *electrospinning*, onde *scaffolds* de PLGA foram produzidos utilizando como coletores uma placa plana e um cilindro rotativo a 28 e 60 RPM. Os diâmetros de fibras atingidos foram de $21 \pm 0,48 \mu\text{m}$ para a placa, de $132,7 \pm 39,6 \mu\text{m}$ a 28 RPM e de $59,5 \pm 16,3 \mu\text{m}$ a 60 RPM. Fibroblastos foram cultivados nesses *scaffolds* e os resultados demonstraram que houve maior viabilidade, migração, infiltração das células, além de deposição de colágeno, para a fibra com maior diâmetro utilizada. Os resultados desse estudo estão apresentados na figura 5.

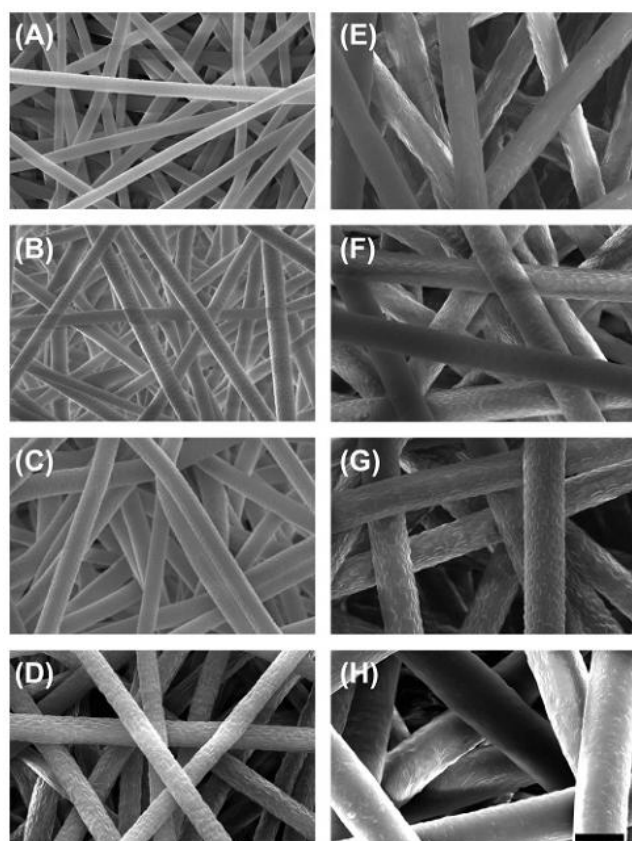


Figura 4. Imagens de MEV para a avaliação das fibras de PCL eletrofiadas com diâmetros de fibra de (A) 2 μm , (B) 3 μm , (C) 4 μm , (D) 5 μm , (E) 6 μm , (F) 7 μm , (G) 8 μm e (H) 10 μm (Adaptado de PHAM *et al.*, 2006).

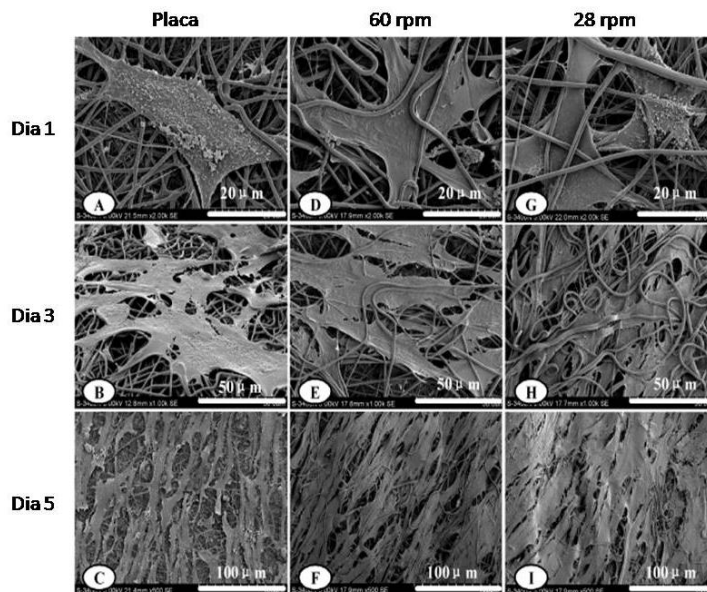


Figura 5. Imagens de MEV para fibroblastos cultivados na placa (A-C), no coletor à 60 RPM (D-F) e à 28 RPM (G-I) nos dias 1 (A, D, G), 3 (B, E, H) e 5 (C, F, I). (Adaptado de ZHU *et al.*, 2008).

Um dos problemas com a técnica de *electrospinning* é o baixo volume dos *scaffolds* produzidos, o que dificulta a formação de uma estrutura tridimensional (3D), que pode ser solucionado pela fabricação em multicamada, onde camadas de *scaffolds* são sobrepostas umas às outras. Essa técnica permite regular a quantidade de camadas, ajustando-as conforme o necessário, de acordo com o que é essencial para o cultivo celular (SUN *et al.*, 2014).

Em *scaffolds* espessos, também chamados de tridimensionais, o espaço de tempo em que o nutriente é consumido pela célula no *scaffold* e reabastecido pelos vasos sanguíneos é o fator limitante para o crescimento celular (WHANG *et al.*, 1998; DUNN *et al.*, 2006), o que pode gerar uma distribuição não uniforme das células nos *scaffolds* conforme aumenta a profundidade da matriz.

Assim, a construção de *scaffolds* em camadas é uma técnica que pode ser utilizada para aumentar a espessura final do *scaffold* a fim de alcançar a forma 3D. Dessa forma, evita-se uma distribuição heterogênea das células durante o cultivo através da fabricação de *scaffolds* com espessuras menores que são colocados uns sobre os outros para formarem uma composição única.

Os *scaffolds* que formam uma estrutura multicamada podem ser fabricados pelos métodos comumente empregados, montados em estruturas diversas e, então, utilizados para

cultivos estáticos e dinâmicos. A figura 6 apresenta exemplos de aplicações de *scaffolds* multicamada tanto em cultivos estáticos como dinâmicos (DUNN *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2006; SROUJI *et al.*, 2008; YANG *et al.* 2009; PAPENBURG *et al.*, 2009).

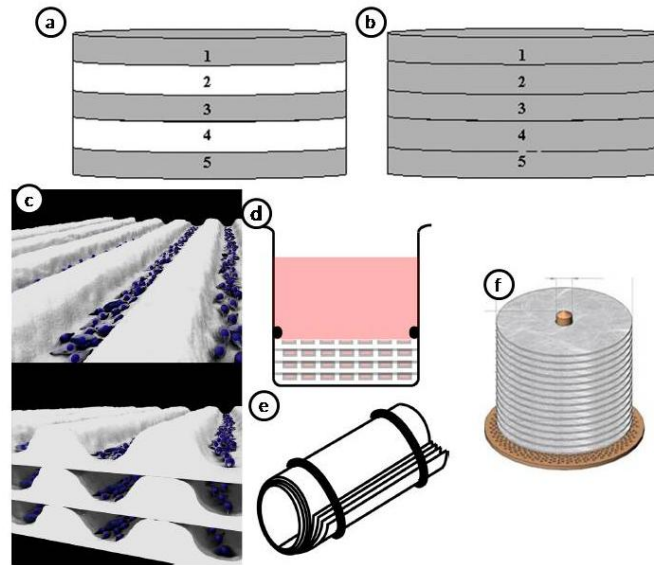


Figura 6. Exemplos de montagens de *scaffolds* em multicamada. (a) Cinco *scaffolds* em camada para cultivo estático com semeadura alternada e (b) em todos os *scaffolds* (Adaptado de DUNN *et al.*, 2006); (c) *scaffolds* em camada com as células semeadas, (d) para cultura estática, (e) enrolados para cultura dinâmica (Adaptado de PAPENBURG *et al.*, 2009); (f) *scaffolds* empilhados em várias camadas sobre um suporte (Adaptado de SROUJI *et al.*, 2008).

3.3 Células-tronco na engenharia de tecidos

As células-tronco podem ser manipuladas para se dividirem em células idênticas a si, originarem CT diferentes ou ainda se transformarem em células especializadas do organismo humano (como células do coração, cérebro, músculo, etc.) (PASSIER & MUMMERY, 2003). A retirada das CT do doador e a sua caracterização são as etapas iniciais no processo de cultivo dessas células (KIROUAC & ZANDSTRA, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Em relação a sua habilidade de diferenciação, as CT podem ser classificadas, basicamente, em pluripotentes e multipotentes. A pluripotência refere-se à capacidade das CT em originar células que provêm dos três folhetos embrionários e formam todos os tecidos humanos adultos, característica das células-tronco embrionárias e das células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi) (PASSIER & MUMMERY, 2003; SMITH, 2001;

RODRIGUES, 2011). As multipotentes são CT adultas capazes de se diferenciarem, na maioria das vezes, somente em células e tecidos presentes na mesma área do corpo da qual são derivadas (PASSIER & MUMMERY, 2003).

Pesquisas com as células-tronco embrionárias costumam levantar questionamentos éticos com relação à destruição de embriões humanos (McDEVITT & PALECEK, 2008; WEI *et al.*, 2013). Por isso, pesquisas recentes abordam as CTPI, desenvolvidas primeiramente por Takahashi e Yamanaka (2006), que são células já diferenciadas e que são reprogramadas a um estado de CT embrionária, adquirindo então as suas habilidades de diferenciação e proliferação. Entretanto, assim como as CT embrionárias, as CTPI possuem uma tendência à formação de teratomas (tumores formados por tecidos embrionários e resíduos fetais) (WEI *et al.*, 2013).

As células-tronco mesenquimais (CTMs), originárias na mesoderme (WEI *et al.*, 2013), são CT adultas e multipotentes, com capacidade de se diferenciarem em células como osteoblastos, adipócitos, condrócitos, miócitos, tenócitos, células neurais e foram inicialmente descobertas na medula óssea por Friedenstein e colaboradores na década de 1970 (PITTENGER *et al.*, 1999; POUNTOS *et al.*, 2005; POUNTOS *et al.*, 2007). Na figura 7 estão apresentados exemplos de diferenciações de CTMs em fenótipos conhecidos.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) recomendou que as CTMs fossem também chamadas de células mesenquimais estromais multipotentes (HORWITZ *et al.*, 2005; DOMINICI *et al.*, 2006).

O Comitê de Células-tronco Mesenquimais e Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs um conjunto de normas para definir as CTMs para estudos pré-clínicos e em laboratório. Primeiramente, as CTMs devem ser aderentes ao plástico do frasco de cultura sob condições de cultura convencionais. Ainda, um número igual ou maior que 95% da população de CTMs devem expressar os marcadores CD73, CD90 e CD105, além de não expressar CD14, CD11b, CD34, CD45, CD79 α ou CD19 e HLA de classe II, medidos por citometria de fluxo. Em terceiro lugar, as células devem ser capazes de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições *in vitro* de diferenciação (DOMINICI *et al.*, 2006).

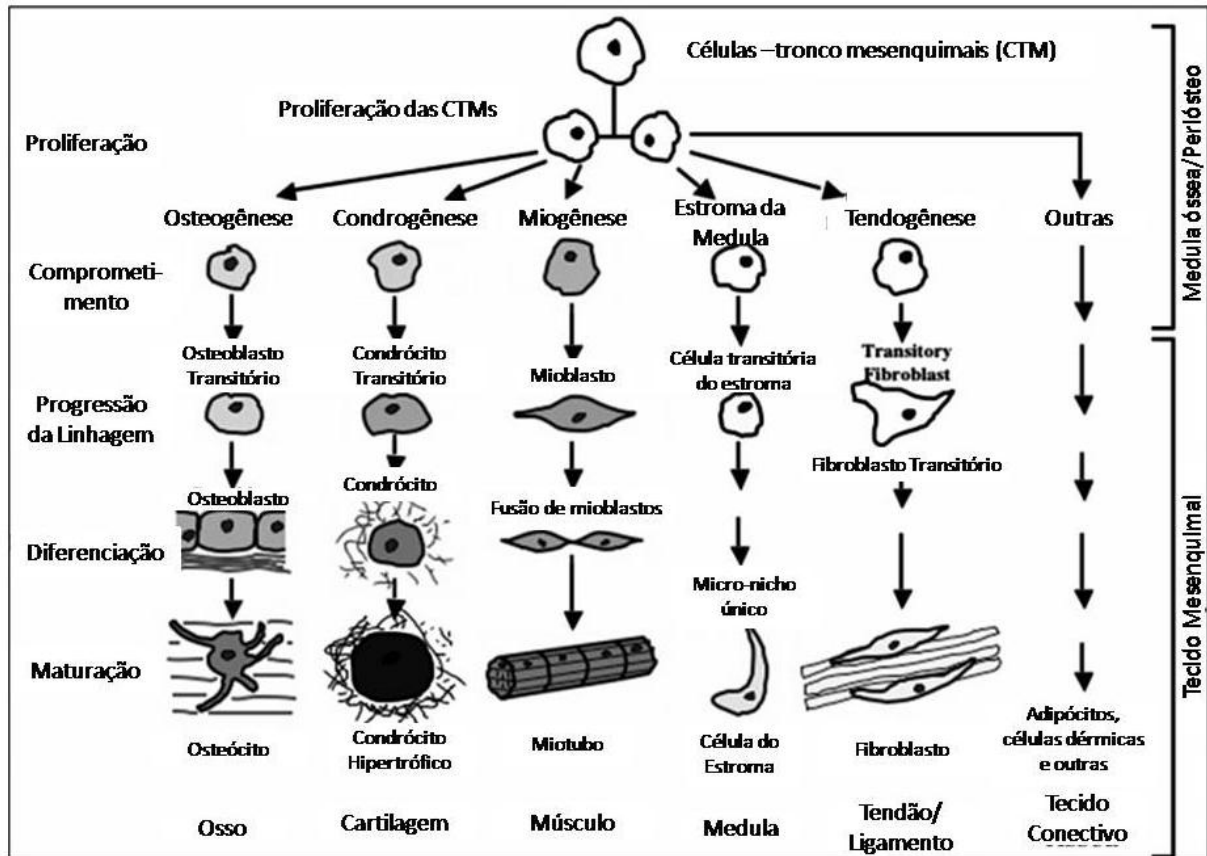


Figura 7. Transições da célula-tronco mesenquimal em diversos fenótipos (Adaptado de CAPLAN, 2007).

Segundo Knaän-Shanzer (2014), estudos realizados com CTMs, visando a sua aplicação na recuperação de órgãos, apresentaram bons resultados para os seguintes órgãos: coração, cérebro, pulmão, fígado, rim, olhos e na pele (SHIGEMURA *et al.*, 2006; VALINA *et al.*, 2007; BUSSOLATI *et al.*, 2008; OH *et al.*, 2008; van VELTHOVEN *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009; LAU *et al.*, 2009). Além disso, oferecem a vantagem de não apresentarem efeitos adversos em ensaios pré-clínicos e clínicos com tratamentos com CTMs autólogas e alogênicas (ANKRUM *et al.*, 2010).

Células-tronco mesenquimais da medula óssea possuem grande capacidade para expansão em cultura. Entretanto, a sua retirada da medula do paciente requer um processo cirúrgico com uma recuperação dolorosa, além do baixo número de células colhidas durante esse procedimento (ZAVAN *et al.*, 2011). Dessa forma, foram investigadas alternativas para coletar CTMs em abundância de forma mais acessível e menos invasiva (ZAVAN *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2012), sendo encontradas CTMs no tecido adiposo, no cordão umbilical

(YOUNG *et al.*, 2001; ZUK *et al.*, 2002; ROMANOV *et al.*, 2003) e também na polpa de dente (NISHINO *et al.*, 2011).

3.3.1 Células-tronco mesenquimais da polpa de dente

As primeiras CTMs de dente foram isoladas a partir do tecido da polpa dentária humana (GRONTHOS *et al.*, 2000) e podem ser visualizadas na figura 8. Em seguida, mais quatro tipos de CTMs de dente foram identificadas, sendo elas as esfoliadas de dentes decíduos (dentes de leite) (SHED) (MIURA *et al.*, 2003), CT de ligamentos periodontal (SEO *et al.*, 2004), CT de papila apical (SONOYAMA *et al.*, 2006) e células foliculares precursoras (MORSCZECK *et al.*, 2005), sendo as últimas três de dentes permanentes (ZAVAN *et al.*, 2011).

As CTMs da polpa dentária possuem alta taxa de proliferação e são facilmente acessíveis (YAMADA *et al.*, 2011), pois normalmente são extraídas por uma cirurgia não invasiva. Além disso, elas são multipotentes, com poder de diferenciação nos mais variados tipos de células (neurais, condrócitos, odontoblastos, adipócitos, osteoblastos, odontoblastos, endoteliócitos) (ZAVAN *et al.*, 2011). Dentro da terapia celular, há registro do seu uso no tratamento para doenças sistêmicas, como doenças neurológicas e cardíacas, doenças isquêmicas (ARTHUR *et al.*, 2008; IOHARA *et al.*, 2008) e na pesquisa para cicatrização de feridas na pele (NISHINO *et al.*, 2011).

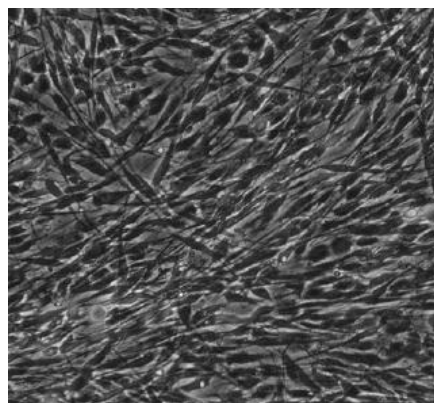


Figura 8. Imagem de células-tronco mesenquimais da polpa de dente (Adaptado de SUCHANEK *et al.*, 2009).

O dente humano é dividido, basicamente, em coroa, colo e raiz, que é composta por diversos tecidos, dentre eles a polpa dental, que contém vasos sanguíneos, nervos e o tecido mesenquimal (YELICK & VACANTI, 2004). A polpa pode ser dividida em quatro camadas, onde a mais externa é formada por odontoblastos, que produzem a dentina. Há, ainda, uma segunda camada rica em MEC e pobre em células e uma terceira com as células progenitoras (ou células-tronco) que expressam plasticidade e multipotencialidade e a camada mais interna, com a área vascular e nervosa (d'AQUINO *et al.*, 2008). Na figura 9 podem ser observadas as divisões do dente humano e seus componentes, dentre eles, a polpa dentária.

A polpa dentária tem um papel importantíssimo na regeneração de dentes através de um processo chamado de dentinogênese, que ocorre quando a polpa é exposta com a perda da dentina e forma uma área necrosada no dente. Assim, células saudáveis migram para essa área e proliferam com o estímulo de fatores de crescimento liberados pela própria MEC do dente, formando então a osteodentina, que irá se diferenciar em odontoblastos para produzir a dentina (ZAVAN *et al.*, 2011).

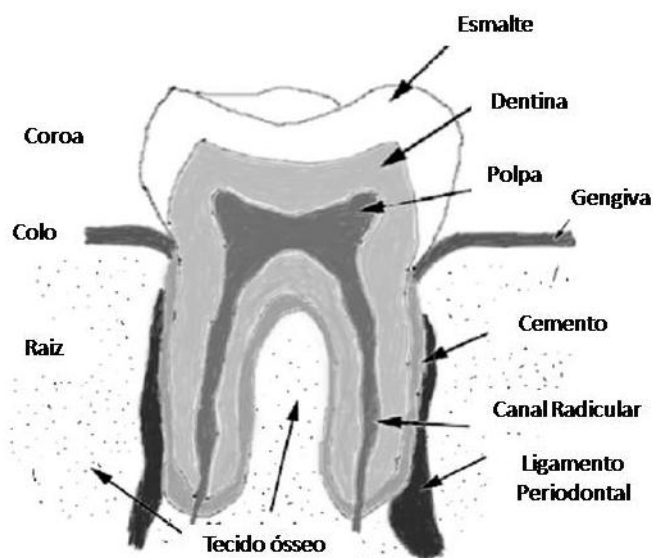


Figura 9. Imagem com as partes do dente humano destacadas (Adaptado de YELICK & VACANTI, 2004).

As CTMs provenientes da polpa dentária foram isoladas e caracterizadas há pouco tempo, principalmente se comparadas com as CTMs da medula óssea. Mas, recentemente, vem crescendo o interesse na utilização dessas células para a engenharia de tecidos. Cultivos estáticos de CTMs da polpa dentária em *scaffolds* compostos com PCL demonstraram bons

resultados de proliferação e diferenciação (YANG *et al.*, 2009; KHANNA-JAIN *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2014). Embora muitas dessas aplicações visassem à regeneração de dentes, devido as suas características, há áreas promissoras de aplicação na regeneração da pele (GARZÓN *et al.*, 2015) e na engenharia de tecido ósseo (d'AQUINO *et al.*, 2008).

3.4 Biorreatores para a engenharia de tecidos

Na ontogênese de um organismo, todas as subpopulações de células que formam os mais variados tecidos são resultados de processos de diferenciação de uma única célula, o zigoto (DERMENOUDIS & MISSIRLIS, 2010). Esse processo ocorre em um ambiente muito bem definido e controlado, o útero (MARTIN & VERMETTE, 2005; DERMENOUDIS & MISSIRLIS, 2010). Dentro da engenharia de tecidos, esse papel de mimetizar as condições fisiológicas do corpo humano para incentivar a proliferação e diferenciação das células, cabe aos biorreatores.

Os biorreatores são dispositivos nos quais processos biológicos e/ou bioquímicos são desenvolvidos sob condições ambientais monitoradas e controladas (como pH, temperatura, pressão, fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos) e costumam ser utilizados em processos clássicos como fermentação industrial, no tratamento de efluentes, nas indústrias alimentícia e farmacêutica (MARTIN *et al.*, 2004).

Os nutrientes, o oxigênio e os fatores de crescimento devem ser transferidos do meio de cultura para a superfície do suporte que contém as células (transferência de massa externa), assim como para as células no interior da matriz (transferência de massa interna), ao mesmo tempo em que metabólitos e CO₂ podem ser removidos dessa matriz para o meio (SALEHI-NIK *et al.*, 2013). Portanto, o biorreator deve fornecer de maneira contínua, nutrientes (como glicose e aminoácidos), fatores bioquímicos, oxigênio e o estímulo físico adequado para as células, bem como facilitar a difusão de espécies químicas para o interior da matriz formada pelas células com o *scaffold* e remover ininterruptamente os subprodutos do metabolismo celular (como por exemplo, o ácido lático) (KOROSSIS, 2005).

O cultivo estático possui uma operação mais simples que o dinâmico, mas há registros na literatura de limitações na difusão de nutrientes (transferência de massa interna e externa),

principalmente em matrizes espessas (MARTIN *et al.*, 2004; EL HAJ *et al.*, 2005; EIBL *et al.*, 2008; SALEHI-NIK *et al.*, 2013).

Cultivos estáticos costumam apresentar matrizes heterogêneas com áreas necrosadas, principalmente no centro, e formação de uma camada densa de células na superfície (WENDT *et al.*, 2008; SALEHI-NIK *et al.*, 2013), que pode limitar a penetração de células no interior do *scaffold* (BJERRE *et al.*, 2008). Uma provável causa da morte celular é distribuição insuficiente de oxigênio e nutrientes, aliada a um acúmulo de resíduos, que não são transferidos para o meio (ROLFE, 2006; SALEHI-NIK *et al.*, 2013). A transferência de massa externa depende das condições hidrodinâmicas em um biorreator, enquanto a transferência interna pode depender de uma combinação de difusão e mecanismos de convecção, que podem ser induzidos pela perfusão do meio ou pela estrutura do *scaffold*, que interfere na taxa de difusão pelo biomaterial (ROLFE, 2006; WENDT *et al.*, 2008; SALEHI-NIK *et al.*, 2013).

As células *in vivo* são constantemente submetidas ao estresse por cisalhamento e deformação mecânica (DAWSON *et al.*, 2008; SILVA, 2012) e esses estímulos mecânicos são necessários também para o crescimento *in vitro*. A tensão de cisalhamento é aplicada no biorreator através do escoamento do meio de cultura (MARTIN & VERMETTE, 2005; LAWRENCE *et al.*, 2009; SALEHI-NIK *et al.*, 2013) e, assim, regula a entrada de nutrientes e saída de resíduos. Embora apresente essa vantagem, essa estimulação biomecânica pode também induzir a degradação do tecido pela alteração na síntese da matriz (LAWRENCE *et al.*, 2009; SALEHI-NIK *et al.*, 2013). Destaca-se que o tamanho de poro do biomaterial também influencia na forma como a tensão de cisalhamento age nas células, pois fluxos iguais, quando utilizadas em *scaffolds* com tamanhos de poros diferentes, provocaram tensões distintas (PORTER *et al.*, 2005).

Além da vazão, a estimulação mecânica, seja por compressão ou pressão hidrodinâmica, é um importante regulador da fisiologia celular e pode exercer impacto positivo na formação dos tecidos (BUTLER *et al.*, 2000; PORTNER *et al.*, 2005). Cada tipo de célula pode responder de forma diferente ao estímulo mecânico, que pode causar modificações radicais na estrutura do tecido formado e na sua composição e, conseqüentemente, na funcionalidade do tecido (SALEHI-NIK *et al.*, 2013). Em estudo desenvolvido por Liu e colaboradores (2012), as CTMs da medula óssea foram cultivadas em *scaffolds* de poliuretano em um biorreator de perfusão com compressão cíclica por estimulação mecânica, onde os resultados de viabilidade celular indicaram que o tempo de

estimulação influencia diretamente o cultivo celular. Ainda, a secreção de fatores biológicos pelas CT pode aumentar por forças biomecânicas, por isso é importante adquirir um entendimento do mecanismo pelo qual a força hidrodinâmica é detectada e convertida em uma sequência de respostas biológicas nas células (SAFSHEKAN *et al.*, 2012; SALEHI-NIK *et al.*, 2013).

Como biorreatores, pode-se utilizar dispositivos simples como *shakers* (KIM *et al.*, 1998) e frascos giratórios (DECLERQ *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 1998; SIKAVITSAS *et al.*, 2002), biorreatores de tanque agitado (FERNANDES-PLATZGUMMER *et al.*, 2014), biorreatores de parede rotativa (GOLDSTEIN *et al.*, 2001; SIKAVITSAS *et al.*, 2002) e sistemas de perfusão (BJERRE *et al.* 2008; JAASMA *et al.*, 2008; JANSSEN *et al.*, 2006; VOLKMER *et al.*, 2008; ZHAO & MA, 2005).

Dentre os biorreatores citados, estão apresentados na figura 10 os mais utilizados para o cultivo de células na engenharia de tecidos, são eles: o frasco giratório (*spinner flask*), o biorreator de parede rotativa (*rotating wall bioreactor*) e o sistema de perfusão (*perfusion system*). O primeiro consiste em um frasco que contém o meio de cultivo e os *scaffolds* suportados de maneira a estarem submersos no meio, sendo que um agitador magnético no fundo do frasco fornece movimentação à solução de cultivo. Já o biorreator de parede rotativa, consiste em uma câmara em rotação preenchida com meio de cultivo, dentro da qual os *scaffolds* ficam suspensos. Por fim, no biorreator de perfusão, a solução de cultivo é bombeada através de uma câmara que contém o *scaffold*.

Em Goldstein e colaboradores (2001), quatro esquemas diferentes de cultura de osteoblastos foram testados utilizando *scaffolds* de PLGA, eram eles: cultura estática, biorreator de parede rotativa, frasco giratório e biorreator de perfusão. Partindo da mesma densidade inicial de células, nos dois primeiros tipos de cultivo citados as células viáveis permaneceram na superfície do biomaterial, em contraste com a distribuição uniforme presente nos *scaffolds* cultivados no frasco giratório e no biorreator de perfusão. Segundo os autores, a deficiência na distribuição de nutrientes pode estar ligada a limitação de crescimento das células no interior e pela quimiotaxia na superfície.

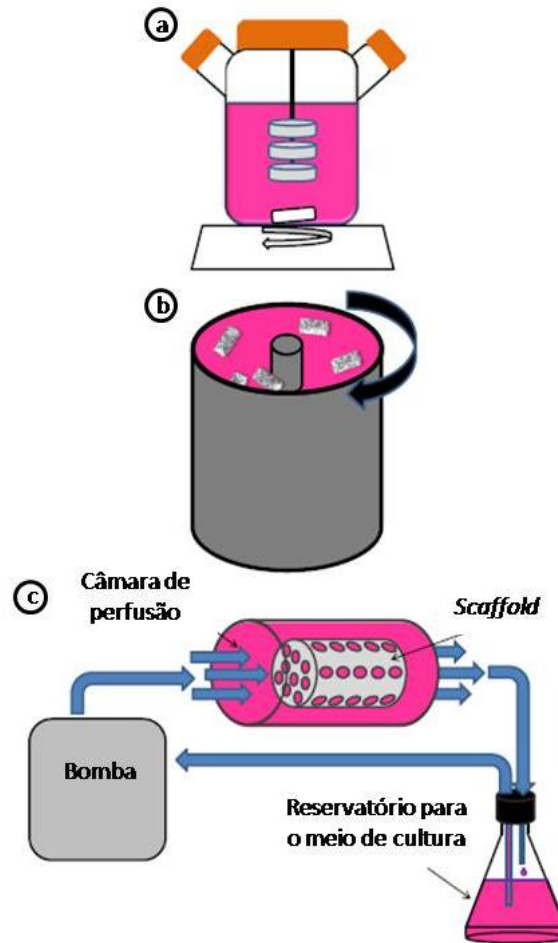


Figura 10. Biorreatores utilizados para o cultivo celular na engenharia de tecidos. (a) Frasco giratório, (b) biorreator de parede rotativa e (c) sistema de perfusão (Adaptado de YEATTS *et al.*, 2013).

Segundo Yeatts e colaboradores (2013), pesquisas demonstraram que o frasco giratório e o biorreator de parede rotativa possuem falhas ao regular a quantidade de oxigênio e a tensão de cisalhamento no *scaffold* (MEINEL *et al.*, 2004; MYGIND *et al.*, 2007). Tais desvantagens não estão presentes no biorreator de perfusão, que permite um controle mais rígido dos parâmetros, ao mesmo tempo em que provoca um aumento na proliferação das células (ZHAO & MA, 2005; VOLKMER *et al.*, 2008; YANG, *et al.*, 2009; YEATTS *et al.*, 2011; YEATTS *et al.*, 2013). Isso pode ser atribuído à capacidade desse sistema em aumentar o transporte de oxigênio e de nutrientes pelo estímulo mecânico (YEATTS *et al.*, 2013), pois o meio de cultivo é transportado através dos poros da matriz extracelular (BANCROFT *et al.* 2003).

3.4.1 Biorreatores de perfusão para a engenharia de tecidos

Os biorreatores de perfusão, basicamente, consistem em um reservatório que contém o meio de cultivo, uma bomba peristáltica e a câmara de perfusão com uma entrada e uma saída, de maneira que a solução do reservatório seja bombeada através do reator de perfusão em um fluxo contínuo. Esses componentes tornam esse sistema mais complexo e conferem vantagens no uso para a engenharia de tecidos, quando comparado aos demais biorreatores (PORTNER *et al.*, 2005). Esse sistema de perfusão do meio de cultura diretamente pelos poros do *scaffold* aumenta a taxa de transferência de massa não somente na superfície do biomaterial, mas também nos poros internos, ao mesmo tempo em que oferecem a possibilidade de controle dessa transferência de massa (SALEHI-NIK *et al.*, 2013).

A otimização de um biorreator de perfusão para a engenharia de um tecido tridimensional deve focar no balanço entre a transferência de massa de nutrientes e rejeitos de e para as células, na retenção dos componentes da nova MEC formada e na tensão de cisalhamento induzida pelo escoamento nos poros dos *scaffolds* (MARTIN *et al.*, 2004).

Ao desenvolver sistemas para a cultura de CT em laboratórios, tem-se a preocupação de projetar biorreatores com a perspectiva de *scale up*, ou seja, quando necessário, o processo dinâmico de cultura pode ser alterado para atender uma escala maior sem grandes mudanças em relação ao projeto inicial utilizado em laboratório. Dentro do biorreator de perfusão, uma característica essencial é evitar que o fluxo do meio bombeado não trilhe um caminho preferencial dentro do biorreator (SALEHI-NIK *et al.*, 2013), ou seja, o meio não deve escoar pelas laterais do *scaffold* e sim através de seus poros internos. Esse aspecto do biorreator de perfusão está exemplificado na figura 11.

Um exemplo de biorreator projetado para prevenir a formação interna de caminhos preferenciais pelo meio de cultivo e facilitar o aumento de escala quando necessário está apresentado na figura 12 e foi desenvolvido por Jaasma e colaboradores (2008), que demonstraram a construção e validação de um biorreator de perfusão para engenharia de tecidos a um custo acessível e de fácil fabricação.

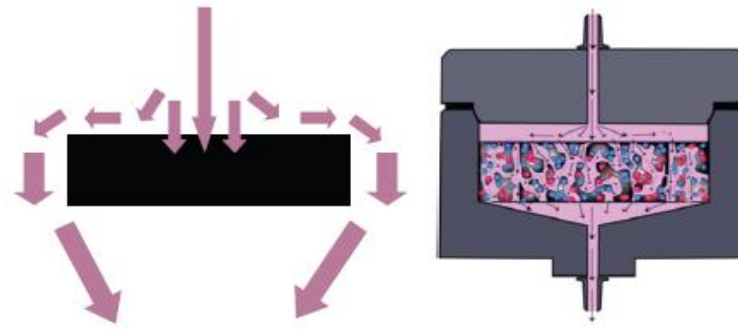


Figura 11. Esquema demonstrando o fluxo com caminho preferencial dentro do biorreator e com perfusão pelos poros do scaffold (Adaptado de SAILON *et al.*, 2009).

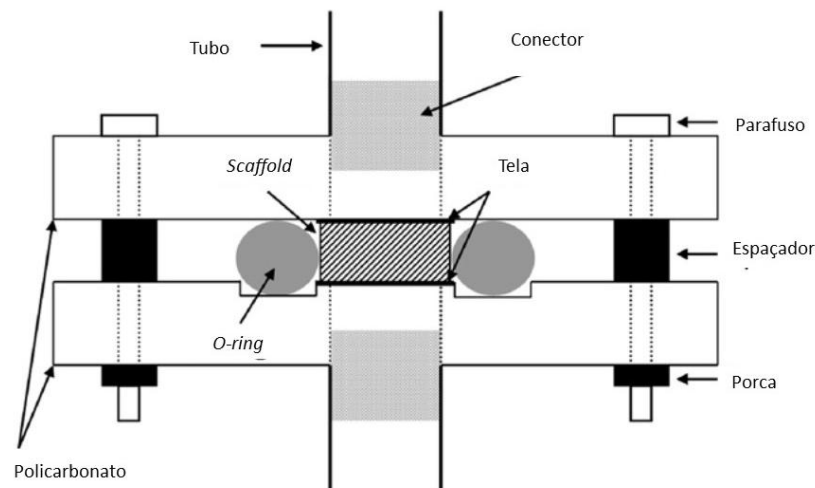


Figura 12. Biorreator de perfusão desenvolvido por Jaasma e colaboradores (2008) para a engenharia de tecidos (Adaptado de JAASMA *et al.*, 2008).

O meio biológico *in vivo* apresenta velocidades intersticiais estimadas na faixa de $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, que podem mudar de tecido para tecido, mas a velocidade média aplicada em sistemas *in vitro* costuma ser superior a $100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (CHARY & JAIN, 1989; DAFNI *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2009). Em biorreatores, as taxas de escoamento do meio de cultivo, mesmo em valores baixos, podem influenciar significativamente a distribuição de fatores de crescimento e a formação da MEC (RUTKOWSKI & SWARTZ, 2007; ZHAO *et al.*, 2009).

Na literatura, não foram encontrados trabalhos que estudem o cultivo de CTMs da polpa de dente em sistemas dinâmicos. As CTMs da medula óssea e do tecido adiposo já

foram cultivadas em biorreatores de perfusão com diferentes vazões e estruturas de *scaffolds*. Em comparação com cultivos estáticos de CTMs da medula óssea, o cultivo dinâmico em biorreatores de perfusão gerou melhores resultados de proliferação e na formação de uma MEC porosa (SIKAVITSAS *et al.*, 2003; SIKAVITSAS *et al.*, 2005; BJERRE *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009).

No estudo de Yeatts e Fisher (2011), as CTMs da medula óssea foram cultivadas em cápsulas de alginato em biorreatores de perfusão com o objetivo de avaliar a influência da vazão na diferenciação das células em osteoblastos. Vazões de 3 e 10 mL.min⁻¹ foram utilizadas e foi constatada uma influência significativa na diferenciação celular, utilizando-se vazão mais alta. Em outro estudo, uma vazão elevada promoveu a diferenciação osteogênica a partir das CTMs, provavelmente pelo efeito da tensão de cisalhamento, enquanto a vazão mais baixa preservou o potencial de proliferação (ZHAO *et al.*, 2007).

Vazões de 0,3, 1 e 3 mL.min⁻¹ foram utilizadas para o cultivo de CTMs da medula óssea em *scaffolds* de titânio com tamanho de poro aproximado de 250 µm e, embora as diferentes taxas de escoamento do sistema dinâmico tenham apresentado formação da MEC, os autores sugeriram que com a maior vazão houve obstrução dos poros da matriz (BANCROFT *et al.*, 2002). Ou seja, mesmo aumentando a taxa de escoamento do meio de cultivo para obter maior proliferação e induzir a diferenciação das células, os altos valores de vazão podem prejudicar a formação da MEC e, conseqüentemente, o tecido que será regenerado.

Na operação de um sistema dinâmico para cultivo celular deve-se buscar um valor ótimo para a vazão do meio, que estimule a proliferação e a diferenciação celular, quando necessário, sem prejudicar a formação do tecido obstruindo poros ou inibindo a proliferação das células. Embora os resultados encontrados na literatura apontem o caminho a ser seguido, cada sistema é muito específico e, por isso, a vazão depende do tipo de célula cultivado, do material utilizado na fabricação do *scaffold* e a forma como ele foi fabricado, além da própria geometria do biorreator.

A vazão do meio é um exemplo de parâmetro que não está presente no cultivo estático. A passagem do cultivo estático para o dinâmico depende de adaptações devido às mudanças nas características do sistema. Na literatura, Radisic e colaboradores (2008) desenvolveram um protocolo completo para cultivo de células cardíacas em *scaffolds* em sistemas de

perfusão. Entretanto, aspectos como montagem do sistema de perfusão, geometria do biorreator, montagem dos *scaffolds* dentro do biorreator, células cultivadas e a vazão utilizada variam de um cultivo para outro devido a especificidade do sistema já mencionada. Dessa forma, a definição de um protocolo para cultivo de CTMs da polpa de dente em *scaffolds* em multicamada em biorreatores de perfusão se faz necessária para auxiliar pesquisas futuras que utilizem um sistema similar.

3.5 Perspectivas para o futuro

O campo de pesquisa da engenharia de tecidos traz o compromisso de que, futuramente, tecidos e órgãos poderão ser desenvolvidos para atender as necessidades específicas de cada paciente (LANGER & VACANTI, 1993; VACANTI & LANGER, 1999; LALAN *et al.*, 2001). Entretanto, para atingir essa realidade, o desafio na área é transferir a escala de pesquisa laboratorial para uma aplicação clínica frequente, de forma economicamente viável e reprodutível (RATCLIFFE & NIKLASON, 2002; MARTIN *et al.*, 2004).

No futuro, o cenário ideal para aplicação clínica dos sistemas com biorreatores na regeneração de órgãos e tecidos seria a integração dos mesmos com todo o processo que inicia com a biópsia das células do doador até o implante do novo tecido e, assim, diminuir os riscos de contaminação, de custos e de etapas (PORTNER *et al.*, 2005).

Entretanto, antes da integração de todo esse sistema, ainda há muito para ser estudado, pesquisado e entendido em relação aos diferentes estágios que levam à formação de um tecido. Sistemas dinâmicos, por exemplo, podem requerer estímulos mecânicos diferentes para cada etapa dessa formação e, portanto, mais experimentos devem ser focados nos mecanismos de resposta das células a esses estímulos (MARTIN *et al.*, 2004). Uma forma de estudar a transferência de massa e as forças físicas sentidas pelas células que modulam o desenvolvimento do tecido é acoplar o sistema com o biorreator à modelagem computacional (WENDT *et al.*, 2008; SALEHI-NIK *et al.*, 2013).

Ainda, no cultivo dinâmico, para melhorar a semeadura das células nos *scaffolds*, uma alternativa é realizar esse procedimento de forma dinâmica, utilizando até o próprio biorreator

onde é realizado o cultivo celular. (ZHAO & MA, 2005; JANSSEN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2009).

No cultivo de órgãos, pesquisas recentes trabalham com processos de recelularização e descelularização. A descelularização consiste, basicamente, na lavagem de um órgão, retirando as suas células de maneira que seja mantida somente a “carcaça”, ou arcabouço, que é utilizado como o *scaffold* para recelularização desse órgão com novas células. Pesquisas na área apresentaram resultados promissores, como a realizada na Escola de Medicina de Harvard, onde Song e colaboradores (2013) descelularizaram rins de ratos e a “carcaça” do rim foi utilizada como *scaffold* para recelularização com células endoteliais e epiteliais e, então, cultivado em um biorreator de perfusão. Após 12 dias de cultura, o órgão já funcionava parcialmente. Na figura 13 está apresentado o biorreator de perfusão desenvolvido para a recelularização e descelularização dos rins

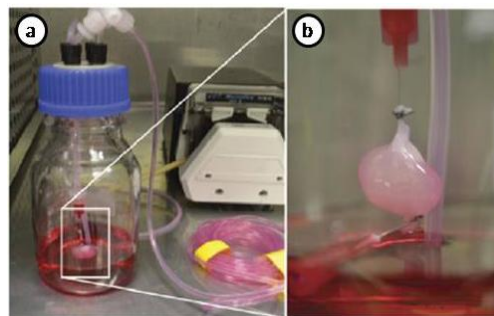


Figura 13. Imagens do sistema de descelularização e recelularização desenvolvido para rins de ratos. (a) Biorreator de perfusão e (b) rim em processo de recelularização(Adaptado de SONG *et al.*, 2013).

No contexto do presente trabalho, objetivou-se definir um protocolo para o cultivo dinâmico de CTMs em *scaffolds* espessos por meio da adaptação de parâmetros do cultivo estático, visto que até o momento não foi encontrado na literatura um protocolo para o sistema específico desse trabalho. Acredita-se que a construção e a validação de um sistema de perfusão com potencial adequado para a geração de dados para a modelagem e otimização do cultivo dinâmico de CT em *scaffolds* espessos pode proporcionar um avanço para a engenharia de tecidos e auxiliar em pesquisas futuras.

CAPÍTULO 4

4. Materiais e Métodos

Neste capítulo está apresentada a metodologia utilizada para a caracterização das CTMs, fabricação dos *scaffolds*, com posterior análise das fibras, análises de viabilidade e adesão das células bem como da citotoxicidade do biomaterial, além da descrição dos materiais empregados na construção do sistema de perfusão. Os cultivos celulares estáticos e dinâmicos, bem como as análises de viabilidade celular foram realizados no Laboratório de Hematologia e Células-tronco. As análises de viabilidade foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas e a histologia no Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

4.1 Obtenção e cultivo de células-tronco mesenquimais

As células utilizadas para o desenvolvimento do presente trabalho foram CTMs derivadas da polpa de dentes decíduos. Os dentes foram coletados na Faculdade de Odontologia (UFRGS), após doação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente e responsável. Depois de extraídos, os dentes foram colocados em meio de cultura e transportados até o Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia (UFRGS) para o isolamento e cultivo das CTMs.

O isolamento das células iniciou com a separação da polpa do dente decíduo com o auxílio de uma colher de dentina na capela de fluxo laminar e seguiu protocolo descrito por Bernardi e colaboradores (2011).

Após atingir sub-confluência (quando as células ocupam cerca de 90 % da placa de cultura), a cultura primária foi lavada uma vez com tampão fosfato salino PBS 1X e, então, incubadas com solução 0,25 % de tripsina (Sigma Aldrich) em PBS durante 10 min a 37 °C. As células foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas para novas garrafas de cultivo celular. Passagens subsequentes foram realizadas de forma semelhante.

4.2 Caracterização das células-tronco mesenquimais

As células isoladas foram caracterizadas como CTMs através de sua morfologia, perfil imunofenotípico e plasticidade. As metodologias utilizadas estão brevemente descritas a seguir.

4.2.1 Análise morfológica das culturas celulares e imunofenotípica das células cultivadas

A presença das células aderentes e a sua morfologia foram observadas em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus, Japão), durante o período de cultura celular.

As CTMs foram caracterizadas imunofenotipicamente através da presença de marcadores típicos de células mesenquimais e ausência de marcadores característicos de células hematopoéticas, através da técnica de citometria de fluxo, usando o equipamento FACSAria III (Becton Dickinson, EUA).

As CTMs foram analisadas na quinta passagem da cultura celular. Foram utilizados anticorpos para identificação de marcadores de CTMs: antiCD73, CD90 e CD105 e para confirmação da ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas: antiCD34, CD45 e HLA-DR.

4.2.2 Diferenciação celular *in vitro*

A diferenciação em tipos celulares mesenquimais, necessária para confirmação da identidade da população obtida, foi testada a partir da quinta passagem. Ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados seguindo protocolos já descritos por Meirelles e Nardi (2003).

4.3 Electrospinning

Os *scaffolds* foram fabricados pela técnica de *electrospinning*, utilizando o equipamento representado na Figura 14, na qual estão destacados os seguintes componentes:

1. seringa que contém a solução polimérica;
2. coletor pra a deposição das fibras;
3. eletrodos;
4. bomba de fluxo;
5. fonte de alta tensão.

O polímero escolhido para a fabricação dos *scaffolds* foi a policaprolactona (PCL) e foi definido que cada *scaffold* deveria ter 15 mm de diâmetro, devido ao tamanho dos poços das placas de cultura, onde, posteriormente, as células foram semeadas nos biomateriais.

Os parâmetros de fabricação dos *scaffolds* foram definidos após vários testes onde foram alterados os parâmetros do *electrospinning* (vazão da solução polimérica, altura da seringa em relação ao coletor, voltagem), bem como características da solução polimérica, tais como sua concentração e o solvente utilizado.

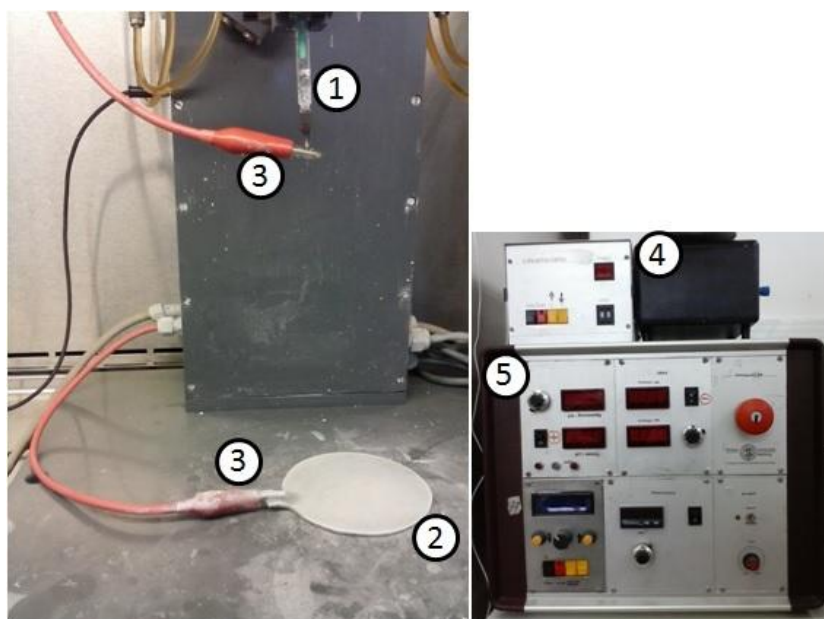


Figura 14. Equipamento de *electrospinning* utilizado para fabricação dos *scaffolds*. (1) seringa com a solução polimérica; (2) coletor para deposição das fibras; (3) eletrodos; (4) bomba e (5) fonte de alta tensão.

Depois de produzidos, os *scaffolds* foram esterilizados por exposição à luz ultravioleta (UV) durante 1 hora.

4.4 Morfologia das fibras

A morfologia das matrizes das microfibras foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Modelo JEOL - JSM 6060) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS, utilizando voltagem de aceleração de 10 kV.

Para a avaliação, as microfibras foram inicialmente coletadas sobre lamínulas de vidro e, em seguida, metalizadas com deposição de platina. Para a visualização em MEV, as lamínulas já metalizadas foram dispostas sobre *stubs* e as fotografias tiradas em diversos aumentos (200x, 2000x e 20000x).

4.5 Diâmetro das fibras

Os diâmetros das fibras foram avaliados por meio da análise das imagens do MEV pelo software ImageJ 1.48x. Amostras de *scaffolds* foram produzidas, em triplicata, em 3 dias diferentes e foram analisadas 3 fotomicrografias em 3 diferentes campos de cada amostra, das quais 30 fibras foram selecionadas aleatoriamente para a coleta do diâmetro, resultando em 270 fibras analisadas, por amostra. A média obtida foi definida como o diâmetro médio da fibra.

4.6 Projeto do biorreator

O desenvolvimento de biorreatores de perfusão para o cultivo de células-tronco deve apresentar simplicidade na construção, visando a facilidade de “*scale-up*” e de esterilização.

O método de esterilização escolhido é a autoclavagem, portanto, os materiais escolhidos para a confecção dos biorreatores devem suportar a esterilização por essa técnica.

Para atingir a perfusão direta sobre as células, não pode haver caminhos preferenciais para o escoamento do meio de cultivo no interior do biorreator. Por isto, o espaço destinado ao cultivo celular deve possuir o mesmo diâmetro dos *scaffolds*.

Inicialmente, foram confeccionados protótipos preliminares para o biorreator, baseados no trabalho de Jaasma e colaboradores (2008), que foram aprimorados a partir de testes realizados com bombeamento de água e PBS 1X para verificação de vazamento e demais dificuldades de manuseio que poderiam prejudicar a realização dos experimentos.

O projeto e a construção do biorreator contaram com a parceria da empresa UpControl, situada na Incubadora Tecnológica da CIENTEC (Fundação de Ciência e Tecnologia) em Porto Alegre.

4.7 Montagem do sistema de perfusão

Foram confeccionadas câmaras de perfusão, de acordo com o projeto final do biorreator, com 15 mm de diâmetro interno cada, que possuem uma entrada e uma saída para o meio de cultivo. Na figura 15 está demonstrado o biorreator de perfusão e a estante utilizada como suporte para os biorreatores durante o cultivo dentro da incubadora.

A bomba peristáltica (DMC 800, Tecnopon, Brasil) utilizada possuía 8 saídas, possibilitando que o processo de cultivo das células ocorresse simultaneamente em até 8 câmaras de perfusão.

Os reservatórios para a solução de cultivo consistiam de garrafas de vidro com 3 orifícios nas tampas, sendo dois deles utilizados para entrada e saída do meio de cultivo através de mangueiras acopladas em capilares de vidro na tampa e, ainda, um para adaptação de um filtro para gases (MTGR0050, Millipore, França) com o objetivo de evitar a formação de vácuo no interior das garrafas. As mangueiras acopladas aos reservatórios eram de silicone, material transparente, com 1,52 mm de diâmetro interno, que podem ser autoclavadas. Um

Materiais e Métodos

dos reservatórios utilizados durante os cultivos dinâmicos está apresentado na figura 16 junto às mangueiras e adaptadores confeccionados.



Figura 15. (a) Biorreator de perfusão e (b) estante utilizada para sustentação dos biorreatores durante o experimento.

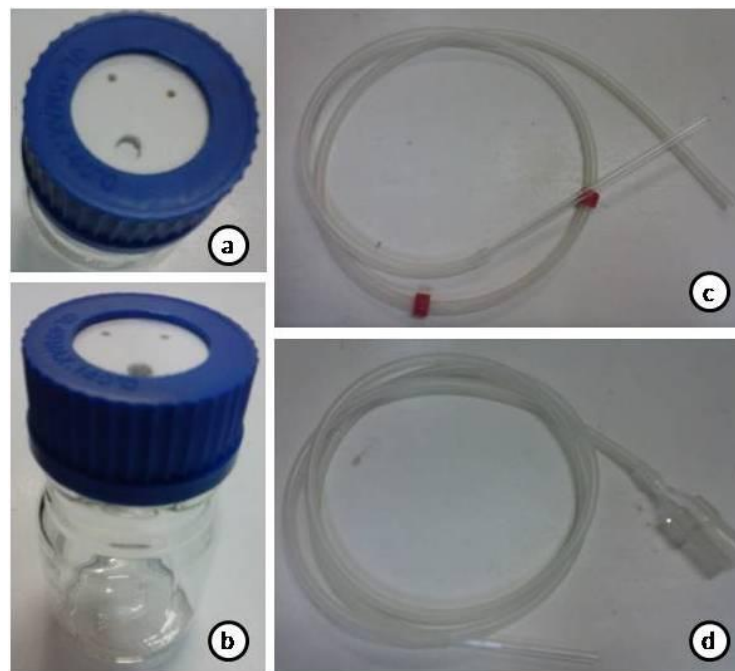


Figura 16. (a) Tampa do reservatório com as aberturas para entrada e saída do meio de cultivo e colocação do filtro para gases, (b) reservatório com a tampa, (c) mangueira de silicone para entrada do meio de cultivo acoplada ao capilar de vidro e (d) mangueira de silicone para saída do meio de cultivo acoplada a um capilar de vidro e a um adaptador para encaixe no biorreator.

Realizou-se uma troca parcial do meio no terceiro dia do cultivo celular para não eliminar componentes produzidos pelas células durante o cultivo, como fatores de

Materiais e Métodos

crescimento, hormônios e enzimas (GOLDSTEIN *et al*, 2001; MARTIN & VERMETTE, 2005; SILVA, 2012). Com o objetivo de controlar a temperatura para o desenvolvimento celular, o sistema de cultivo foi colocado em uma incubadora a uma temperatura de 37 °C e 5 % de CO₂.

Na figura 17 está representado o sistema de perfusão para cultivo dinâmico das CT que foi construído no Laboratório de Hematologia e Células-tronco, em parceria com o Instituto de Pesquisa com Células-tronco (IPCT), localizado na Faculdade de Farmácia (UFRGS).

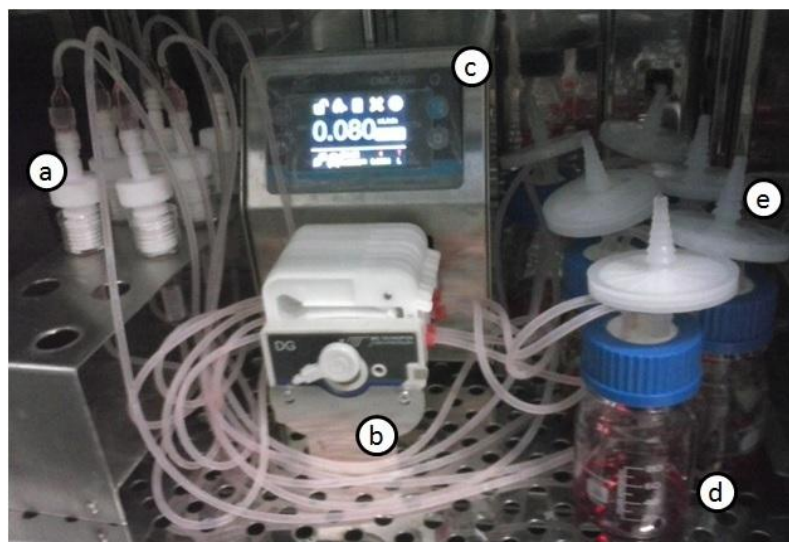


Figura 17. Sistema para o cultivo dinâmico montado dentro da incubadora formado por: (a) biorreatores, (b) mangueiras, (c) bomba peristáltica, (d) reservatórios para o meio de cultivo e (e) filtros para gases.

4.8 Cultivo estático

O cultivo estático foi realizado em triplicata. Para esse ensaio, os *scaffolds* foram colocados em placas de cultivo de 24 poços. Sobre cada *scaffold*, foram semeadas $1,67 \times 10^5$ células homogeneizadas em 250 μ L de meio de cultura. Após a semeadura, os *scaffolds* foram incubados durante 3,5 horas, a 37 °C e atmosfera a 5 % de CO₂.

Ao final do período de incubação, conjuntos de 3 *scaffolds* foram agrupados em multicamada, onde 3 *scaffolds* foram sobrepostos, formando um “sanduíche”, sobre o qual foi adicionado um *o-ring*. Os conjuntos de *scaffolds* dentro dos poços da placa de cultura podem

ser visualizados na figura 18. Cada poço contendo os *scaffolds* em multicamada foi preenchido com 1 mL de meio de cultura DMEM. O meio foi trocado total ou parcialmente (500 μ L) no terceiro dia de cultivo.



Figura 18. Placa de cultivo de 24 poços com a triplicata dos *scaffolds* em multicamada para o cultivo estático.

4.9 Cultivo dinâmico

O cultivo dinâmico foi realizado de forma semelhante ao cultivo estático. Os *scaffolds* foram dispostos em placas de cultivo de 24 poços e, então, sobre cada *scaffold*, foram semeadas $1,67 \times 10^5$ células (em 250 μ L de meio de cultura), após 3,5 horas de incubação (37 °C, 5 % de CO₂), 3 *scaffolds* foram colocados em multicamada (“sanduíche”) dentro de cada biorreator. A figura 19 demonstra a posição dos biomateriais dentro do biorreator, com a colocação de um *o-ring* (anel) sob os *scaffolds* antes do fechamento do biorreator. Cada reservatório foi preenchido com 30 mL de meio de cultura DMEM, sendo realizada a troca de 15 mL de meio no terceiro dia de cultivo.

Com base em estudos da literatura, os experimentos iniciaram com uma vazão de 0,1 mL.min⁻¹ (BJERRE *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2009; SILVA, 2012). De acordo com os resultados observados com essa vazão, as vazões de 0,05 mL.min⁻¹ e 0,08 mL.min⁻¹ foram escolhidas para dar continuidade aos experimentos. O fluxo era ascendente para evitar formação de bolhas e minimizar a compactação dos *scaffolds*.

Os sistemas estático e dinâmico foram comparados em termos de viabilidade celular, citotoxicidade e histologia. Esses ensaios foram realizados no 1º, 3º e 7º dia de cultivo.



Figura 19. Montagem dos *scaffolds* em sanduíche dentro do biorreator.

4.10 Análise de viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi realizada através do ensaio com um sal de tetrazólio altamente solúvel em água (WSTs), chamado de WST-8 ([2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazólio])(Sigma-Aldrich). Esse sal é reduzido por enzimas desidrogenases presentes em células viáveis formando um produto de cor laranja solúvel no meio de cultura. A quantidade de produto laranja formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Após 1, 3 e 7 dias de cultivo, os *scaffolds* de cada “sanduíche” foram desagrupados, sendo colocados separadamente em poços de uma placa de 24 poços. Em cada poço, foram pipetados 200 µL da solução de WST-8. Após, a placa foi deixada em incubadora (37 °C, 5 % CO₂) por 1 hora, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 150 µL da solução de cada poço foram pipetados para uma placa de 96 poços, a qual foi levada para leitura da absorbância da solução, em um espectrômetro (Spectramax, Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

Para verificar a quantidade inicial de células, após o período de incubação e antes da montagem dos *scaffolds* na estrutura multicamada, foram semeadas $1,67 \times 10^5$ células em 12 *scaffolds* e 1×10^5 , 2×10^5 e 3×10^5 células diretamente nos poços da placa (sem *scaffolds*), em triplicata, que foram incubados durante 3,5 horas, a 37 °C e atmosfera a 5 % de CO₂. Após esse período, o teste de viabilidade com o WST-8 foi realizado como descrito anteriormente. Com os dados de absorvância a curva de calibração foi montada e, através da equação da reta, o número de células presentes nos *scaffolds* foi calculado.

4.11 Análise de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada através da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). A LDH é uma enzima citosólica, sendo liberada somente quando ocorre dano na célula, com a ruptura da sua membrana plasmática. Dessa forma, a presença de LDH no meio de cultura indica a existência de morte celular.

Após 1 dia de cultivo, 1 mL de meio de cultura foi retirado dos reservatórios dos biorreatores para a dosagem de LDH. Tal procedimento foi repetido para os dias 3 e 7. De modo semelhante, no cultivo estático, 300 µL de meio de cultivo foi retirado de cada poço contendo os *scaffolds* em sanduíche para cada dia de análise. Para esse ensaio, também foi utilizado um controle positivo. Para isso, ao mesmo momento em que foi realizada a semeadura celular sobre os *scaffolds*, também foram semeadas células diretamente sobre os poços de uma placa de 24 poços ($1,67 \times 10^5$ células/poço). Posteriormente, 10 µL de Triton X-100 foram adicionados a cada poço (triplicata) do controle positivo e incubados durante 1 h a 37 °C. Esse procedimento causa a ruptura da membrana plasmática e a morte da célula, gerando uma liberação máxima de LDH.

Todas as dosagens de LDH foram realizadas utilizando um kit específico (LabTest, Brasil) no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, na Faculdade de Farmácia (UFRGS).

4.12 Histologia

Para a análise histológica, que verifica a adesão e distribuição das CT na estrutura do material, cada *scaffold* passou por um processo de lavagem que consistiu em pipetar 300 µL de PBS 1X em cada poço da placa de cultura que continha um *scaffold*. O PBS 1X permaneceu em contato com os biomateriais o suficiente para eliminar impurezas, quando então era descartado. Esse procedimento foi repetido e, em seguida, os *scaffolds* foram fixados com paraformaldeído 4 % por 1 h e lavados novamente com PBS 1X por 3 vezes. Posteriormente, os *scaffolds* foram cortados ao meio com uma lâmina de bisturi. Uma metade foi separada e corada com 500 µL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (5 mg.ml⁻¹) por 5 minutos. Após, o DAPI foi retirado e as amostras foram lavadas com PBS 1X por 3 vezes.

O DAPI é um corante de ácido nucléico de fluorescência azul que se liga com regiões do DNA de cadeia dupla da célula. Dessa forma, o núcleo da célula pode ser visualizado em um microscópio óptico com lâmpada fluorescente.

Os *scaffolds* foram cortados em seções com espessura de 30 µm em um criostato. Ao final, foram montadas lâminas com os cortes das quais foram tiradas fotografias com ampliação de 100x e 200x em um microscópio óptico Eclipse Ti-S (Nikon, Japão).

4.13 Análise estatística

Os dados experimentais foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) fatorial no *software Statistica*, com a estatística F.

$$F = \frac{MQ_e}{MQ_d}$$

Onde MQ_e é o quadrado das médias entre as amostras e MQ_d é o quadrado das médias dentro de cada amostra.

Materiais e Métodos

Valores significativos foram considerados quando $p < 0,05$ com 95 % de confiança. Também foi utilizado o *software* Excel, para a regressão linear e a construção do histograma de distribuição das fibras.

CAPÍTULO 5

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos neste trabalho para o projeto do biorreator, fabricação dos *scaffolds*, análises de viabilidade e adesão celular, histologia e citotoxicidade, além da discussão relacionada com estes resultados e algumas informações e comparações importantes baseadas em dados apresentados na literatura.

5. Resultados e Discussão

A fim de esclarecimento, para a discussão dos resultados obtidos com as análises, os *scaffolds* foram nomeados de acordo com sua posição na estrutura multicamada dentro do biorreator, como mostra a figura 20, ou dentro do poço da placa de cultura para o cultivo estático. O *scaffold* do topo é o superior, o do meio é o intermediário e o terceiro é o inferior. Esse terceiro *scaffold* é, então, o primeiro *scaffold* da montagem a entrar em contato com o fluxo do meio de cultivo no biorreator.

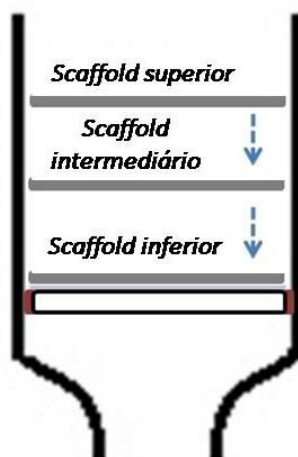


Figura 20. Esquema que demonstra a posição dos *scaffolds* dentro do biorreator. O primeiro *scaffold* depositado dentro do biorreator é denominado de *scaffold inferior*, o segundo de *scaffold intermediário* e o último de *scaffold superior*.

5.1 Projeto do biorreator de perfusão

A seguir serão apresentadas e justificadas as escolhas realizadas para a construção dos biorreatores.

Um dos pontos principais do projeto consiste em evitar a contaminação do sistema, que pode inviabilizar o cultivo celular. Por isto, foram escolhidos para a confecção dos biorreatores o vidro de borossilicato e o teflon, que são materiais esterilizáveis por autoclavagem.

Além disso, para evitar a formação de caminhos preferenciais para o escoamento do meio de cultivo no interior do biorreator o espaço destinado ao cultivo celular possuía o mesmo diâmetro dos *scaffolds*, o qual era de 15 mm.

Um exemplo do primeiro protótipo, baseado no trabalho de Jaasma e colaboradores (2008), pode ser visualizado na figura 21. Com esse protótipo foram realizados testes com bombeamento de água como fluido de trabalho pelos biorreatores, com rotações de 5 a 22 RPM. Foi constatado vazamento de água e, com base nesse resultado, novos modelos foram projetados.

Para um dos novos modelos manteve-se como base o protótipo já testado, que consistia em duas estruturas de vidro com fechamento por parafusos de teflon, com mudanças no tamanho do espaço destinado aos *scaffolds*, na canaleta onde era colocado um *o-ring* (anel) para vedação e na utilização de parafusos de aço. Esse modelo está apresentado na figura 22. Devido à dificuldade de manipulação para abrir e fechar o biorreator esse modelo foi descartado.

O segundo modelo, apresentado na figura 23, também é composto por duas partes em vidro, foi elaborado com fechamento por rosca, de maneira a prevenir possíveis vazamentos e contaminações. Esse modelo também apresentava *o-rings* ao longo da estrutura.

O biorreator escolhido para o cultivo dinâmico das CTMs da polpa de dente decíduo está demonstrado na figura 23 (a). Esse biorreator foi escolhido devido à simplicidade no seu fechamento, o que facilitava o manuseio dentro da capela de cultura. O biorreator não apresentou vazamentos em testes com bombeamento de água e PBS 1X usados como fluidos

Resultados e Discussão

de trabalho. Conforme se pode observar na figura 23 (b) e (c), o biorreator é dividido em 2 partes, projetadas para fins específicos. Na estrutura de teflon foi confeccionado um furo para passagem do meio de cultura, que pode ser visualizado na figura 23 (d). Já a figura 23 (e) mostra o componente inferior do biorreator, de vidro, que possui um suporte de teflon, onde os *scaffolds* são montados em multicamadas após a sementeira, com pequenos furos para passagem do meio de cultivo. A sua forma abaulada foi projetada para uma distribuição uniforme do fluido de trabalho no *scaffold*.



Figura 21. Primeiro protótipo desenvolvido para o projeto do biorreator (Baseado em JAASMA *et al.*, 2008).



Figura 22. Modelo para o biorreator de perfusão com parafusos (baseado em Jaasmaet *al.*, 2008).



Figura 23. (a) Biorreator de perfusão desenvolvido para o cultivo das células-tronco. (b) Parte superior de teflon, (c) parte inferior de vidro, (d) passagem confeccionada para o escoamento do fluido de trabalho e (e) suporte de teflon onde os *scaffolds* semeados foram colocados.

5.2 Definição dos parâmetros de *electrospinning* e caracterização dos *scaffolds* de PCL

A definição dos parâmetros para a fabricação dos *scaffolds* procurou atingir um tamanho de fibra que gerasse um poro de diâmetro próximo ao tamanho das CTMs extraídas de polpa de dente decíduo. Conforme a literatura, as CTMs da polpa de dente apresentam diâmetro médio de 15 μm (SUCHANEK *et al.*, 2009). Por isto, diferentes soluções de PCL foram testadas. Foram avaliadas soluções com diferentes concentrações do polímero e com diversas combinações de solventes, tais como o clorofórmio, o tetrahidrofurano (THF) e a dimetilformamida (DMF).

Os parâmetros do equipamento também foram alterados a fim de produzir *scaffolds* com características desejadas ao cultivo no biorreator. Por fim, foram definidos os parâmetros de fabricação dos *scaffolds* com uma solução de PCL a 13 % (p/v) em THF:DMF (razão 7:3), voltagem de 18 kV, distância entre o coletor e a agulha de 19,5 cm e vazão da solução polimérica de 0,4 mL.min⁻¹. Cada *scaffold* foi fabricado até atingir aproximadamente 300 μm de espessura e 15 mm de diâmetro.

Resultados e Discussão

As fotomicrografias obtidas por MEV são demonstradas na figura 24. A partir dessas imagens, o diâmetro médio das fibras foi medido no *software* ImageJ, resultando em $0,983 \pm 0,243 \mu\text{m}$. Conforme Hussain e colaboradores (2010) existe uma relação entre o diâmetro da fibra e o tamanho do poro, na qual o tamanho do poro é cerca de 6 vezes maior que o diâmetro da fibra. Portanto, o diâmetro aproximado dos poros para os *scaffolds* fabricados seria de cerca de $6 \mu\text{m}$, menor do que o tamanho originalmente pretendido.

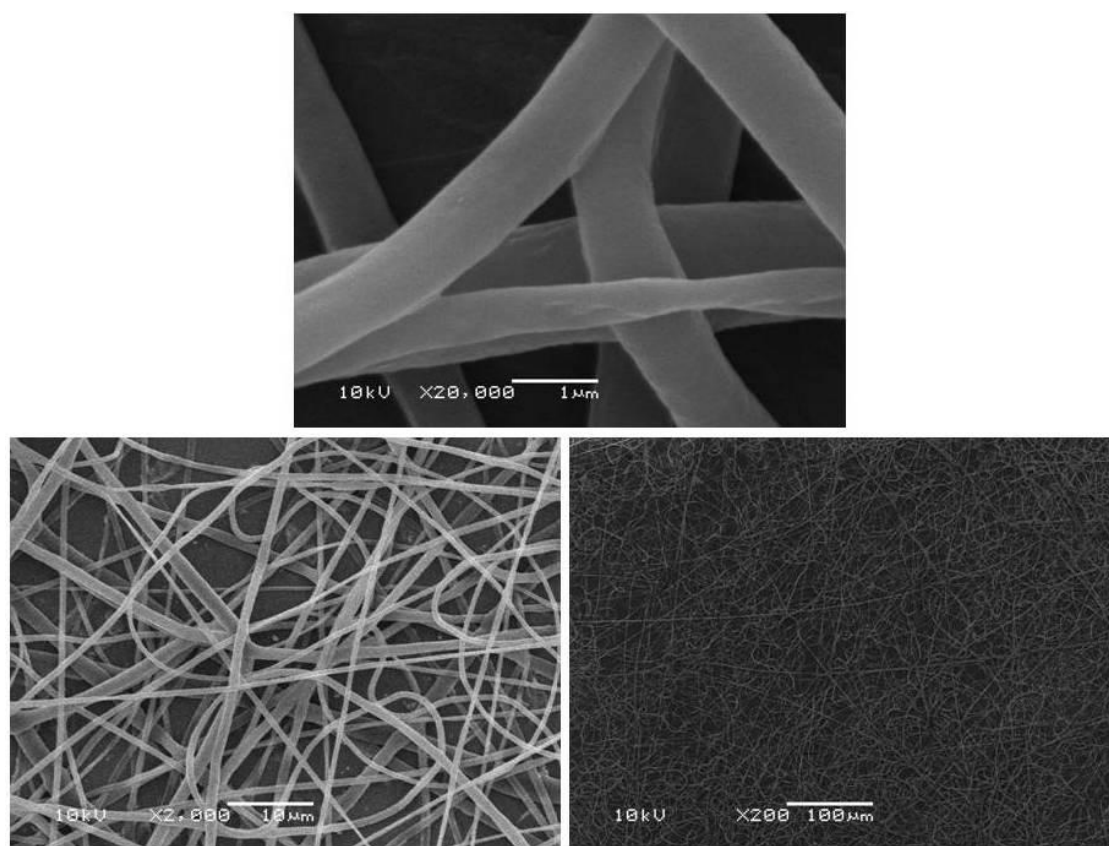


Figura 24. Imagens do MEV das amostras de *scaffolds* de PCL em diversos aumentos (20000x, 2000x e 200x).

Foram preparadas e testadas diversas soluções dos diferentes solventes mencionados, juntamente com o polímero. Ainda, os parâmetros do equipamento foram alterados para buscar fibras com diâmetro maiores que, conseqüentemente, gerariam poros maiores. Entretanto, houve uma dificuldade na padronização dos parâmetros do *electrospinning* para concentrações maiores que 13 %, não sendo possível obter um tamanho de poro aproximado ao tamanho da célula.

Através das fotomicrografias em MEV, observa-se que há fibras com diâmetros distintos. Para melhor visualização da distribuição dos diâmetros das fibras nas amostras analisadas em MEV, fez-se um histograma, apresentado na figura 25, o qual demonstrou que, embora houvesse fibras com diâmetros maiores que 3 μm , mais da metade das fibras analisadas possuíam em torno de 1 μm de diâmetro.

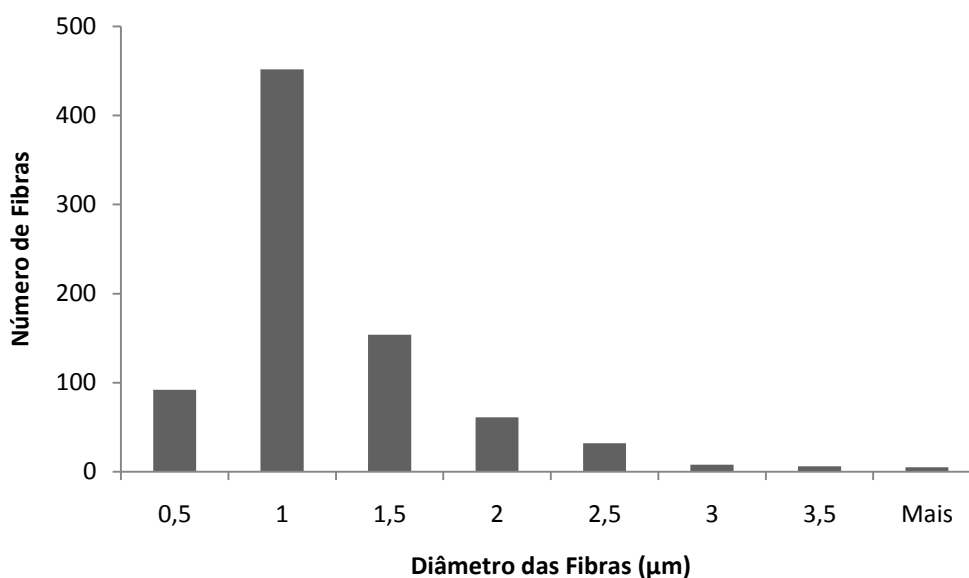


Figura 25. Histograma para a distribuição dos diâmetros das fibras das amostras de *scaffolds*.

5.3 Análises de viabilidade celular após o período de incubação

Nesse ensaio de viabilidade, foram semeadas CTMs diretamente sobre a placa de cultura de 24 poços, nas densidades de 1×10^5 , 2×10^5 e 3×10^5 células/poço. A figura 26 mostra a curva de calibração obtida a partir desse ensaio.

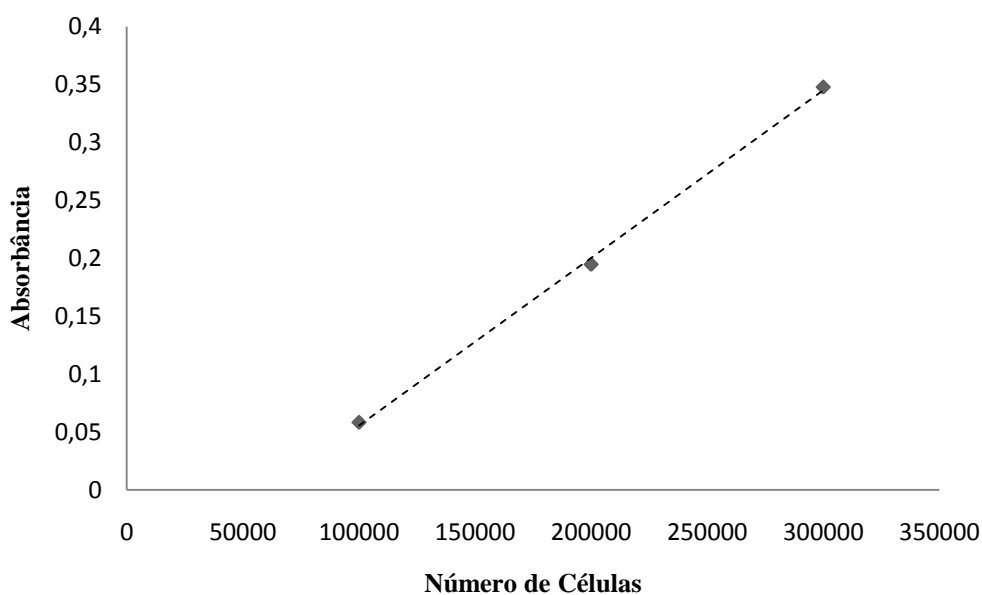


Figura 26. Regressão linear para os dados de absorbância após o período de incubação. Coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,998.

A partir da equação da reta gerada na figura 26 foi possível determinar o número de células presentes nos *scaffolds* antes da montagem em camadas, que foi de $1,17 \times 10^5$ células. Portanto, como o número de células diminuiu em relação à quantidade inicialmente semeada ($1,67 \times 10^5$ células/*scaffold*), aproximadamente 5×10^4 células não aderiram ao *scaffold*.

5.4 Análises de viabilidade celular

A densidade celular inicialmente semeada foi definida com base em testes anteriores, nos quais essa densidade de células demonstrou ser adequada para as análises de viabilidade e adesão. A seguir serão apresentados os resultados para o cultivo estático e para os cultivos dinâmicos.

5.4.1 Cultivo estático

Resultados e Discussão

No cultivo estático, o *scaffold* do topo, o superior, é o primeiro *scaffold* da montagem a entrar em contato com o meio de cultivo celular, ao contrário do que ocorreu no cultivo dinâmico. Os dados de absorbância, em triplicata para cada *scaffold*, para os cultivos estáticos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Dados de absorbância para os cultivos estáticos (em triplicata) para os *scaffolds* superior, intermediário e inferior.

| Dia | <i>Scaffold</i> | Absorbância | | |
|-----|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Estático 1 | Estático 2 | Estático 3 |
| 1 | superior | 0,128 ± 0,084 | 0,030 ± 0,026 | 0,077 ± 0,054 |
| | intermediário | 0,021 ± 0,007 | 0,087 ± 0,079 | 0,101 ± 0,043 |
| | inferior | 0,064 ± 0,011 | 0,080 ± 0,033 | 0,199 ± 0,116 |
| 3 | superior | 0,158 ± 0,043 | 0,047 ± 0,056 | 0,122 ± 0,082 |
| | intermediário | 0,014 ± 0,013 | 0,074 ± 0,044 | 0,170 ± 0,053 |
| | inferior | 0 | 0,065 ± 0,059 | 0,187 ± 0,013 |
| 7 | superior | 0,324 ± 0,131 | 0,323 ± 0,166 | 0,546 ± 0,094 |
| | intermediário | 0,117 ± 0,025 | 0,331 ± 0,213 | 0,385 ± 0,250 |
| | inferior | 0,034 ± 0,032 | 0,394 ± 0,203 | 0,260 ± 0,052 |

A análise estatística com ANOVA fatorial resultou como fator significativo na viabilidade das células os próprios cultivos estáticos ($p = 0,00008$). Isso significa que a proliferação das células foi diferente entre os cultivos realizados sob as mesmas condições e com um protocolo de semeadura e montagem dos *scaffolds* já previamente definido. A figura 27 apresenta a comparação entre os cultivos estáticos realizados em triplicata.

Uma explicação para esse comportamento pode ser o efeito do biomaterial sobre as células. Os *scaffolds* foram fabricados no mesmo equipamento e utilizando os mesmos parâmetros, mas fatores como a umidade e a temperatura do ambiente podem ter influenciado na formação das fibras, refletindo na interação das células com os *scaffolds*.

Outro fator que pode interferir na viabilidade celular é a formação de bolhas de ar entre as camadas de *scaffolds*, o que pode ocorrer durante a montagem da estrutura multicamada, podendo prejudicar a difusão de nutrientes para as células (PAPENBURG *et al.*, 2009).

Os dias de cultivo também foram significativos em relação à viabilidade celular (p aproximadamente igual a 0). Em geral, observou-se um aumento da viabilidade das células do

primeiro ao sétimo dia para todos os cultivos estáticos, conforme dados apresentados na figura 27. Entretanto, ao analisar o efeito dos dias de cultivo separadamente, notou-se que apenas a partir do terceiro dia ele foi significativo ($p = 0,0012$), isso indica que no primeiro dia de análise, as células mantinham uma viabilidade semelhante.

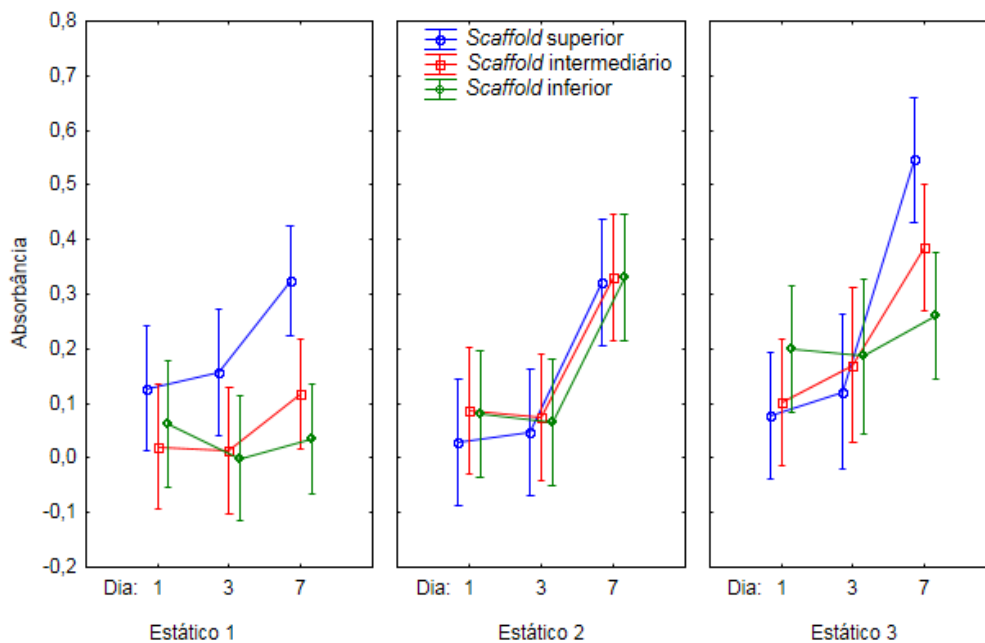


Figura 27. Avaliação da viabilidade celular nos *scaffolds* submetidos ao cultivo estático. As linhas demonstram a posição dos *scaffolds* no interior da placa. Valores significativos para os cultivos estáticos e dias de cultivo ($p < 0,05$) ($n=3$ para cada estático). Não foram encontrados valores significativos entre os *scaffolds*.

A viabilidade das células não apresentou diferença estatisticamente significativa comparando as matrizes de PCL entre si, entretanto, o *scaffold* do topo destacou-se por apresentar uma viabilidade maior em relação aos demais *scaffolds* da estrutura em multicamada. Esse resultado corrobora com o esperado, visto que o *scaffold* superior, no cultivo estático, é o *scaffold* que fica em maior contato com o meio de cultivo e, conseqüentemente, com os nutrientes para as células. Esse comportamento está de acordo também com outros estudos encontrados na literatura, como é o caso apresentado em Papanburg e colaboradores (2009), no qual células musculares (mioblastos C2C12) foram cultivadas em estruturas com 4 *scaffolds* de PLLA (tamanho dos poros entre 2 e 10 μm) em multicamada.

Por outro lado, a superfície do *scaffold* inferior não entrou em contato direto com o meio, no sistema de cultivo estático, devido à ausência de um fluxo que possa ajudar na circulação das células entre os *scaffolds*. O *scaffold* do meio do “sanduíche” mantém contato com as superfícies semeadas dos outros *scaffolds* e células dos outros *scaffolds* podem ter aderido na sua superfície.

Como mencionado na revisão bibliográfica, *scaffolds* muito espessos podem prejudicar o fornecimento de nutrientes para as células. Conforme estabelecido por outros trabalhos na literatura, a migração das células da superfície dos *scaffolds* é difícil em biomateriais com mais de 200 μm de espessura (PHAM *et al.*, 2006; PAPENBURG *et al.*, 2009). Os *scaffolds* utilizados no presente estudo possuíam em torno de 300 μm , o que pode ter prejudicado, principalmente, o *scaffold* inferior, (no cultivo estático) que no geral apresentou uma viabilidade celular menor em relação aos demais *scaffolds* da estrutura, ao final dos cultivos estáticos.

Apenas no cultivo estático 2 esse comportamento heterogêneo da viabilidade celular entre os *scaffolds* não foi observado. Esse cultivo apresentou uma proliferação semelhante entre as matrizes de PCL até o sétimo dia de cultivo, o que pode ter sido provocado por uma distribuição melhor dos nutrientes presentes no meio para as células. Tal comportamento é ideal para que a formação do tecido pelas células seja uniforme utilizando estruturas em multicamada.

5.4.2 Cultivo dinâmico

Conforme mencionado, no cultivo dinâmico a alimentação do meio de cultivo ocorre de baixo para cima, isto é, o *scaffold* inferior entra primeiramente em contato com o meio. A tabela 2 apresenta os dados de absorvância, em duplicata para cada *scaffold*, para os cultivos dinâmicos.

Resultados e Discussão

Tabela 2. Dados de absorvância para os cultivos dinâmicos nas vazões de 0,1 mL.min⁻¹, 0,08 mL.min⁻¹ e 0,05 mL.min⁻¹ para os *scaffolds* superior, intermediário e inferior.

| Dia | Scaffold | Absorvância | | |
|-----|---------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 0,1 mL.min ⁻¹ | 0,08 mL.min ⁻¹ | 0,05 mL.min ⁻¹ |
| 1 | superior | 0,251 ± 0,036 | 0,088 ± 0,007 | 0,109 ± 0,016 |
| | intermediário | 0,004 ± 0,005 | 0,014 ± 0,015 | 0,108 ± 0,066 |
| | inferior | 0,016 ± 0,001 | 0,006 ± 0,008 | 0,049 ± 0,013 |
| 3 | superior | 0,633 | 0,216 ± 0,299 | 0,036 ± 0,028 |
| | intermediário | 0,17 | 0,014 ± 0,009 | 0,009 ± 0,013 |
| | inferior | 0,079 | 0 | 0,001 ± 0,001 |
| 7 | superior | 0,767 ± 0,140 | 0,391 ± 0,552 | 0,042 ± 0,059 |
| | intermediário | 0,602 ± 0,089 | 0,058 ± 0,081 | 0,030 ± 0,017 |
| | inferior | 0,009 ± 0,011 | 0,118 ± 0,167 | 0,027 ± 0,039 |

Na figura 28 estão apresentados os resultados de absorvância para os diferentes dias de cultivo na taxa de 0,1 mL.min⁻¹; nessa vazão foi observado para todos os *scaffolds* da estrutura um aumento de células viáveis entre os dias 1 e 7 ($p = 0,0008$). Entre os *scaffolds*, a diferença na viabilidade celular foi significativa ($p = 0,001$). Notou-se que o *scaffold* de topo (superior) mostrou uma viabilidade celular maior em todos os dias de análise. As células avaliadas no *scaffold* do meio mostraram uma viabilidade celular aumentada até o sétimo dia, momento em que apresentou um valor para o teste de viabilidade celular semelhante ao *scaffold* superior. Já no *scaffold* inferior, a viabilidade das células foi significativamente menor que nos demais *scaffolds*.

O *scaffold* inferior era o primeiro a entrar em contato com o fluxo de meio de cultivo e essa condição pode ter influenciado na morte celular, principalmente sob o efeito do escoamento à 0,1 mL/min, por duas hipóteses. Uma delas seria pelo impacto associado ao contato do meio de cultivo com as células. A outra hipótese considera a ocorrência de deformações causadas pelo cisalhamento do meio no biomaterial, embora não tenham sido observadas deformações no *scaffold* inferior a olho nu. Como já mencionado, estudos com cultivos dinâmicos ressaltaram que a vazão pode influenciar na diferenciação e proliferação das células pela tensão de cisalhamento, mas pouco foi estudado com relação a sua ação na morte celular (ZHAO *et al.*, 2007; BANCROFT *et al.*, 2002; YEATTS & FISHER, 2011).

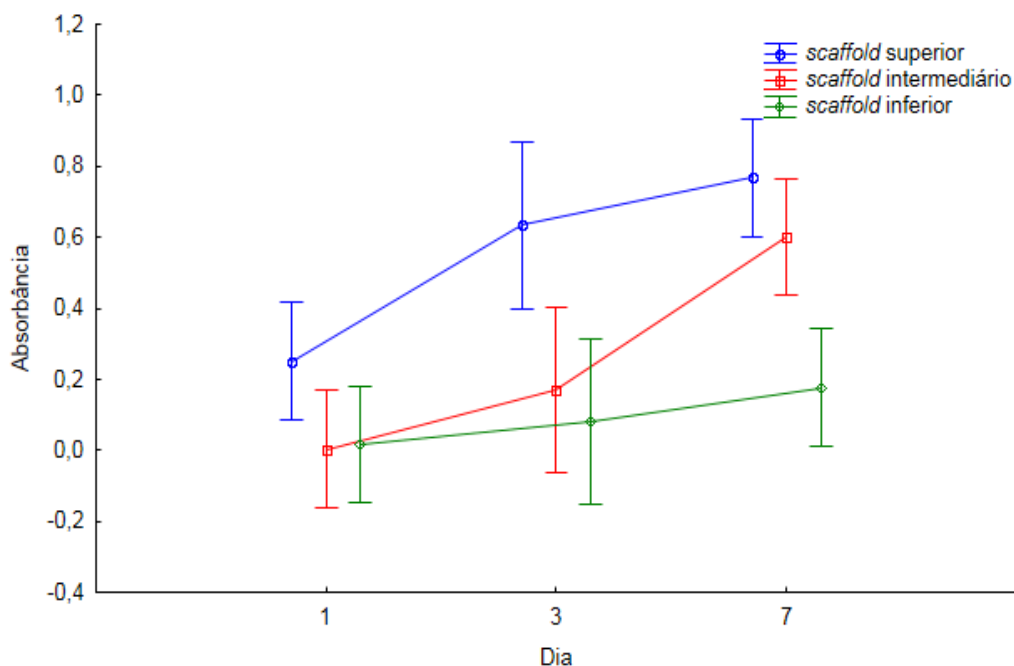


Figura 28. Avaliação da viabilidade celular nos *scaffolds* submetidos ao cultivo dinâmico na vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As linhas demonstram a posição dos *scaffolds* no interior do reator. Valores significativos foram encontrados para os dias de análise e entre os *scaffolds* ($p < 0,05$) ($n=2$).

Em um estudo sobre a tensão de cisalhamento provocada pelas taxas de escoamento do meio cultivo sobre CTMs, provenientes de medula óssea, em cultivo em biorreator de perfusão, vazões de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foram testadas. Nesse estudo, a proliferação das células foi maior quando a menor vazão foi utilizada, indicando que tensões de cisalhamento altas podem provocar um decaimento na proliferação (ZHAO *et al.*, 2007).

Assim, com base nos resultados de viabilidade obtidos para a vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, foram testadas vazões menores, de maneira a observar se a tensão de cisalhamento provocada pelo fluxo era o motivo para o menor número de células viáveis no *scaffold* inferior.

A análise estatística dos resultados de absorvância para a taxa de escoamento de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ está apresentada na figura 29. Pela análise estatística, nenhum efeito foi significativo durante o cultivo. Entretanto, foi observada uma tendência de crescimento da viabilidade celular do primeiro ao sétimo dia de cultivo, com maior número de células viáveis no *scaffold* superior. Os valores de absorvância indicam uma menor quantidade de células viáveis em relação à taxa de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Ao observar o comportamento da proliferação das células na figura 28, observou-se que, mesmo com valores baixos de absorvância durante todo o período de cultivo no *scaffold*

inferior, houve um leve crescimento celular no sétimo dia de cultivo. Isso pode indicar que, mesmo com poucas células presentes nos dias anteriores, elas conseguiram proliferar. Um cultivo usando-se a vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante um período de tempo maior poderia confirmar esse comportamento.

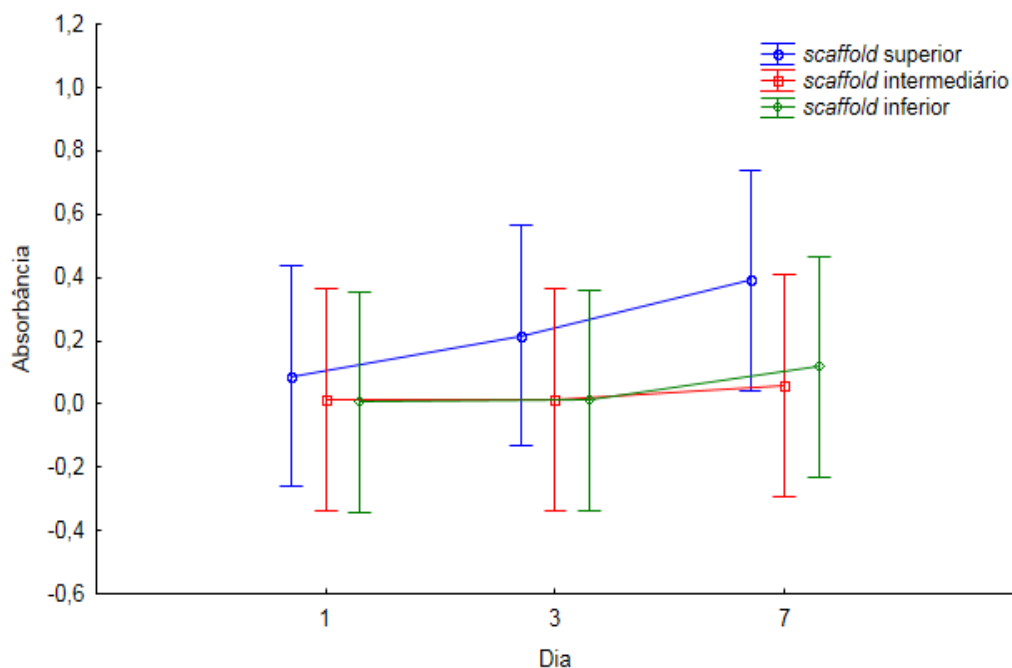


Figura 29. Avaliação da viabilidade celular nos *scaffolds* submetidos ao cultivo dinâmico na vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As linhas demonstram a posição dos *scaffolds* no interior do reator. Não foi encontrada diferença estatística significativa ($n=2$).

Na vazão mais baixa testada, de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, observa-se que a viabilidade celular foi inferior às demais vazões para todos os *scaffolds*, houve um decaimento significativo do número de células viáveis do primeiro ao sétimo dia de cultivo ($p = 0,0138$), para o *scaffold* inferior. Já os *scaffolds* intermediário e superior aparentaram um pequeno aumento na viabilidade celular do terceiro para o sétimo dia. A análise estatística para a vazão de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ está apresentada na figura 30.

Mesmo com a diminuição na vazão, no *scaffold* inferior a viabilidade das células foi baixa, principalmente para a vazão de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, que indicou ser ineficiente para estimular a viabilidade celular. Embora um estudo mais aprofundado sobre a tensão de cisalhamento provocada pelo fluxo do meio de cultivo seja necessário, tratando-se da

Resultados e Discussão

construção de *scaffolds* em camadas, o efeito que uma camada exerce sobre a outra também deve ser analisado.

Assim como no cultivo estático, no cultivo dinâmico o *scaffold* intermediário está em contato com a superfície semeada de outro *scaffold*, o inferior. Dessa forma, as células da superfície desse *scaffold* podem ter sido arrastadas com o fluxo para a superfície do *scaffold* do meio. A análise de adesão das células pela histologia pode auxiliar na confirmação dessa hipótese.

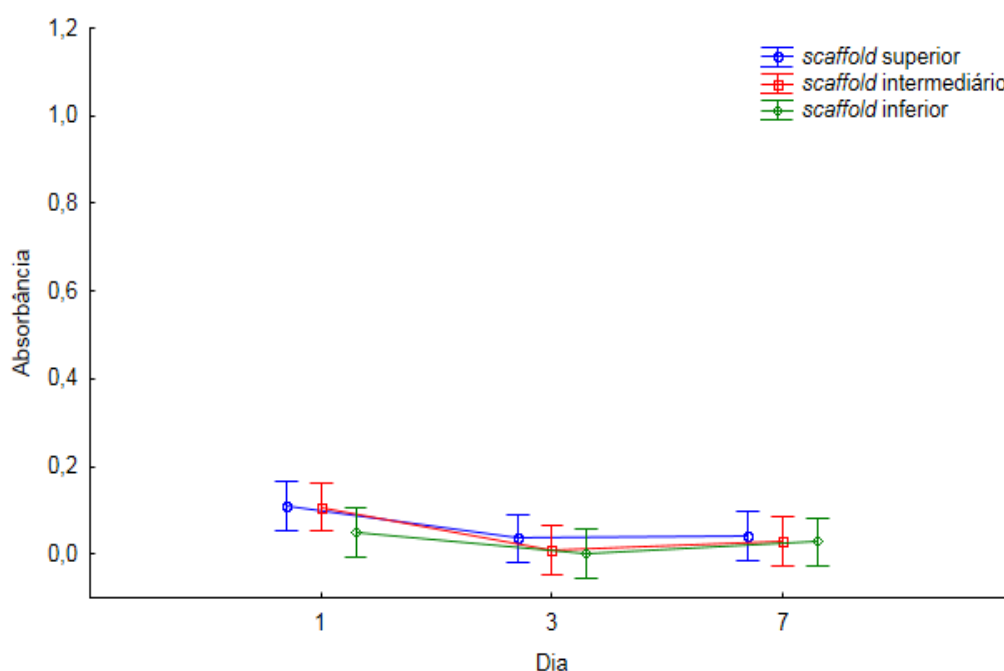


Figura 30. Avaliação da viabilidade celular nos *scaffolds* submetidos ao cultivo dinâmico na vazão de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As linhas demonstram a posição dos *scaffolds* no interior do reator. Valores significativos foram encontrados para os dias de análise ($p < 0,05$) ($n=2$).

Ressalta-se que alguns imprevistos podem ter prejudicado a realização dos experimentos como, por exemplo, as dificuldades encontradas para o pleno funcionamento de todos os cabeçotes da bomba peristáltica. Inicialmente, 8 biorreatores de perfusão foram montados no sistema para cultivo das células, mas alguns cabeçotes não bombeavam o meio de cultivo adequadamente e os biorreatores eram inutilizados. Isto ocorria de forma aleatória nos cabeçotes. Por isto, para a vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, apenas 5 biorreatores foram utilizados no cultivo (duplicatas nos dias 1 e 7), enquanto nos demais experimentos foram 6 biorreatores utilizados, com uma duplicata por dia de análise.

O número limitado de experimentos que foi possível realizar tornou-se um obstáculo para realizar uma análise estatística que verificasse a influência da posição dos biorreatores dentro da incubadora na viabilidade celular. Um aumento do número de experimentos, com repetições sob as mesmas condições, poderia diminuir o desvio padrão e auxiliar na confirmação das tendências de comportamento da viabilidade observadas.

5.5 Histologia

A análise histológica verifica a adesão e distribuição das CTMs na estrutura do biomaterial. Os *scaffolds* foram marcados com DAPI, o que permitiu observar o núcleo das células. As imagens foram analisadas no *software* ImageJ e transformadas em imagens em preto e branco para melhor visualização.

A histologia do cultivo estático pode ser visualizada na figura 31 e demonstrou que no primeiro dia de cultivo havia poucas células na superfície dos *scaffolds*, entretanto, no sétimo dia já foi possível observar um maior número de células, que estavam bem distribuídas nas superfícies dos *scaffolds*. Esse comportamento confirma o perfil de viabilidade observado nos cultivos estáticos.

Na histologia para o cultivo dinâmico com taxa de escoamento $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, demonstrada na figura 32, notou-se um maior número de células no *scaffold* do topo, principalmente no sétimo dia de cultivo, confirmando os resultados encontrados na análise de viabilidade celular. O *scaffold* do meio apresentou células em ambos os lados, indicando que células semeadas no *scaffold* inferior podem ter aderido na sua superfície. Também confirmando as análises de viabilidade, o *scaffold* inferior possuía poucas células na sua superfície. Ressalta-se que as células não penetraram nos *scaffolds*, mas provavelmente proliferaram na sua superfície.

Para a vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a figura 33 mostra que o *scaffold* do topo também apresentou uma distribuição mais uniforme das células, evidenciada no sétimo dia de cultivo, onde foi possível observar a presença de células nas superfícies superior (onde foi realizada a semeadura) e inferior (em contato com o *scaffold* intermediário) do *scaffold*. Isso sugere que houve adesão das células presentes na superfície do *scaffold* do meio, o qual possuía poucas

células. O *scaffold* inferior por sua vez, apresentava poucas células aderidas à superfície. Tais resultados estão em concordância com o que já foi observado para a análise de viabilidade das células.

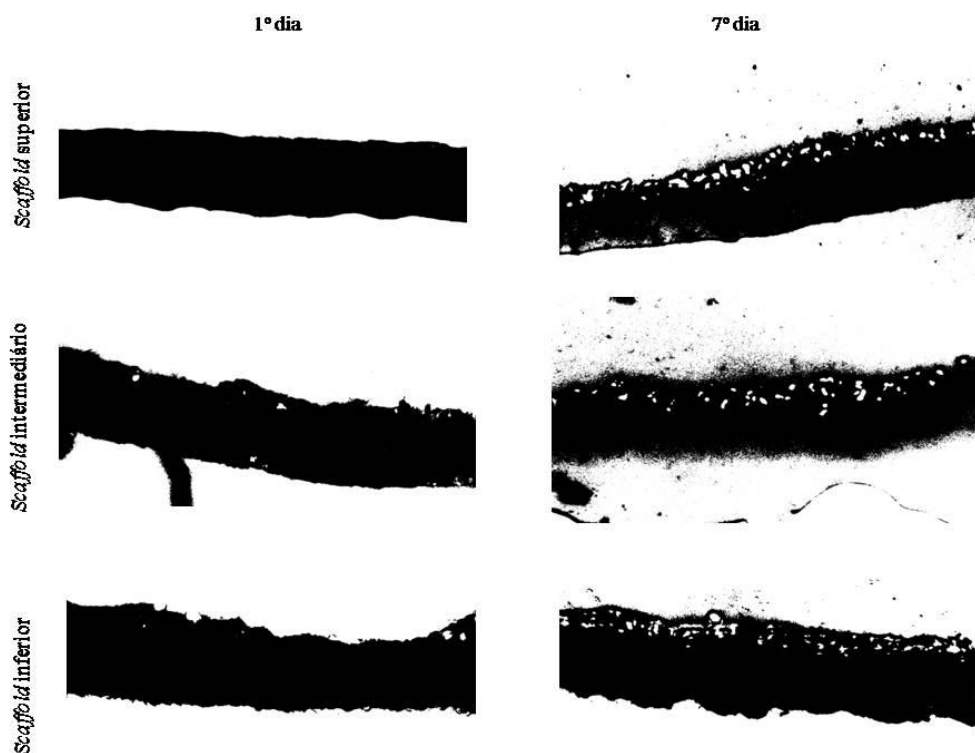


Figura 31. Imagens de histologia das células nos *scaffolds* (superior, intermediário e inferior) para o cultivo estático nos dias 1 e 7.

A figura 34 apresenta a histologia para a menor vazão testada, de $0,05 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, que confirmou a presença de células na superfície dos *scaffolds*, principalmente dos *scaffolds* superior e intermediário. No primeiro e no último dia de cultivo, as células foram observadas em todos os *scaffolds*, ainda que de maneira esporádica no *scaffold* inferior.

Pode ser observado que em todos os cortes histológicos não houve infiltração das células na matriz de PCL até o sétimo dia de cultivo. O que pode ter impedido a penetração das células nos *scaffolds* no cultivo dinâmico é a formação de agregados celulares, que suportam as tensões de cisalhamento, na superfície dos *scaffolds*. Como ocupam um volume maior, por estarem agregadas, as células não passam pelos poros e, assim, não são transportadas em direção aos demais *scaffolds*. Esse comportamento já foi observado na

literatura (PAPENBURG *et al.*, 2009). O formato do próprio biorreator, demonstrado na figura 23 (d), pode ter contribuído para as células permanecerem no *scaffold* do topo visto que o orifício pelo qual o meio de cultivo escoava na saída do biorreator é menor que o *scaffold* e, assim, células podem ter ficado retidas na superfície do biomaterial que estava na posição superior. Ainda, conforme já discutido na revisão bibliográfica do presente trabalho, quando as células são maiores do que o tamanho dos poros dos *scaffolds*, observa-se dificuldade das células em penetrar no interior do biomaterial, proliferando-se preferencialmente em sua superfície (NERUKAR *et al.*, 2011; DUNN *et al.*, 2006). Aqui, os *scaffolds* utilizados apresentaram diâmetro médio de poros cerca de 3 vezes menor que o tamanho das células, o que pode ter dificultado a infiltração das mesmas no biomaterial.

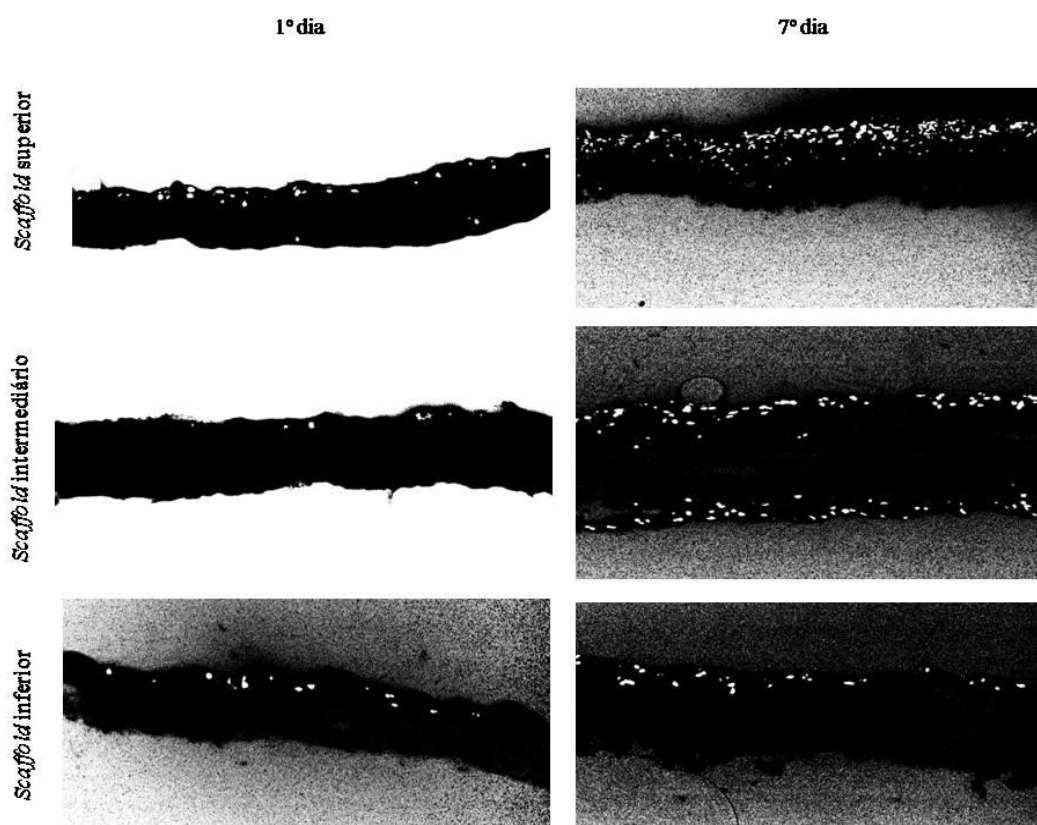


Figura 32. Imagens de histologia das células nos *scaffolds* (superior, intermediário e inferior) do cultivo dinâmico, para o biorreator com vazão de $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, nos dias 1 e 7 de cultivo celular.

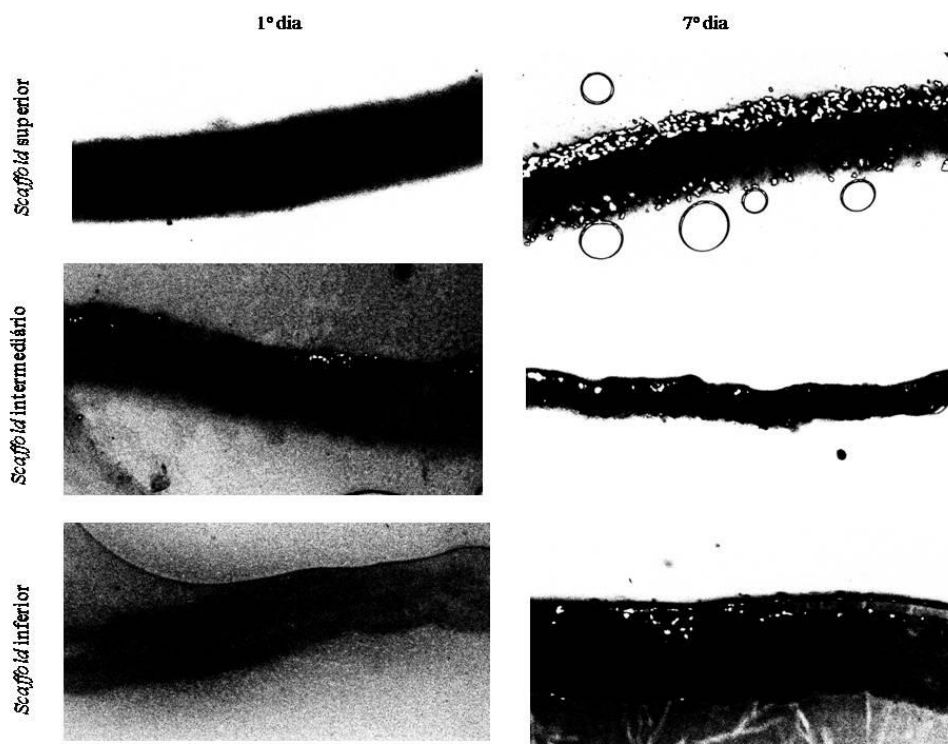


Figura 33. Imagens de histologia das células nos *scaffolds* (superior, intermediário e inferior) para o biorreator com vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para os dias 1 e 7.

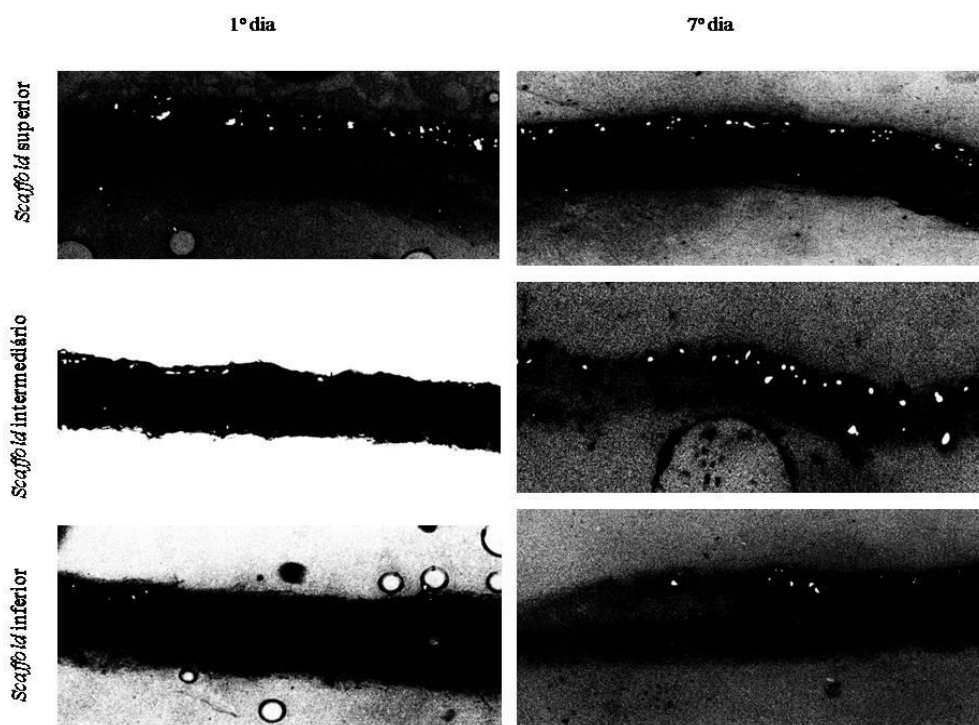


Figura 34. Imagens de histologia das células nos *scaffolds* (superior, intermediário e inferior) para o biorreator com vazão de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para os dias 1 e 7.

5.6 Análises de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através da dosagem da enzima LDH. A adição de Triton X-100 a alguns poços da placa de cultura foi utilizada a fim de se ter um controle positivo para a medida de LDH. A tabela 3 apresenta os resultados da dosagem das concentrações de LDH no sobrenadante dos cultivos dinâmicos.

Tabela 3. Concentração de LDH (u/L) presente no sobrenadante dos cultivos dinâmicos nas vazões 0,1 mL.min⁻¹, 0,08 mL.min⁻¹ e 0,05 mL.min⁻¹.

| Dia | LDH (u/L) | | |
|-----|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 0,1 mL.min ⁻¹ | 0,08 mL.min ⁻¹ | 0,05 mL.min ⁻¹ |
| 1 | 116 ± 7,07 | 105 ± 2,83 | 82 ± 7,07 |
| 3 | 108 | 95,5 ± 3,54 | 64,5 ± 3,54 |
| 7 | 111,5 ± 7,78 | 88 ± 11,31 | 91,5 ± 6,36 |

A densidade inicial de células era igual em ambos os cultivos. No entanto, no cultivo dinâmico foram utilizados 30 mL de meio para cada biorreator, enquanto que no cultivo estático, utilizou-se 1 mL de meio em cada poço da placa de cultivo. Como há diferença de volumes nos quais a enzima está diluída, a dosagem final da concentração de LDH no meio do cultivo dinâmico foi recalculada pela seguinte relação:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Onde:

1. C_1 é a concentração da enzima LDH no volume V_1 (u/L);
2. V_1 é o volume de 30 mL de meio do reservatório no cultivo dinâmico;
3. C_2 é a concentração da enzima LDH no volume V_2 (u/L);
4. V_2 é o volume de 1 mL do cultivo estático.

Resultados e Discussão

Através da análise estatística presente na figura 35, observou-se que as vazões tiveram influência sobre a morte celular ($p = 0,0002$). Na vazão mais alta, de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, os resultados demonstraram uma maior dosagem de LDH, embora entre os dias de cultivo a avaliação da dosagem não tenha sido estatisticamente diferente. No cultivo dinâmico, quando as células foram cultivadas nos *scaffolds* sob vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de meio, os resultados demonstraram valores menores em relação ao ensaio de citotoxicidade. Na menor vazão testada, de $0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, obteve-se valores menores quanto à citotoxicidade em relação aos resultados obtidos no cultivo sob a vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Esse comportamento repetiu-se quando comparado aos resultados de dosagem da enzima quando o meio era bombeado à $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, exceto para o sétimo dia, quando as dosagens foram semelhantes.

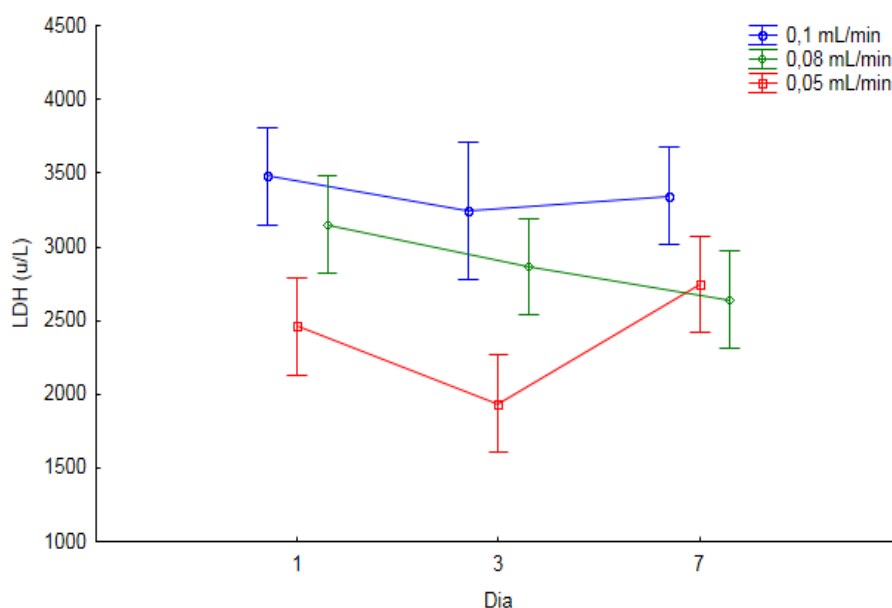


Figura 35. Dosagem de LDH no sobrenadante dos cultivos dinâmicos (realizados com diferentes vazões). Houve influência das vazões sobre o cultivo celular, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A maior concentração de LDH no cultivo na maior vazão testada pode ser explicada pela proliferação das células. No fluxo de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a viabilidade foi maior que nos demais fluxos, ou seja, havia uma quantidade de células maior em relação às demais vazões testadas. Essas células competem pelos nutrientes disponíveis no meio de cultivo e, eventualmente, aquelas que não obtêm sucesso nessa competição irão morrer. Como a

quantidade de nutrientes disponíveis era a mesma em todos os fluxos (30 mL de meio), pode-se inferir que havia menos células disputando esses nutrientes na vazão de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, conduzindo a uma morte celular menor.

As células podem sofrer um processo de morte celular por causas naturais, a chamada taxa de apoptose, necessária para manter a renovação das células. Dessa forma, quanto maior o número de células presentes, maior será o número de células morrendo por processos normais, independentes do cisalhamento. Provavelmente ocorrem os dois processos, com células morrendo normalmente e células competindo por nutrientes, além de um terceiro fator, presente no cultivo dinâmico, que é a tensão de cisalhamento.

A tabela 4 apresenta os resultados das dosagens de LDH e a figura 36 a análise de citotoxicidade para os cultivos estáticos e controle positivo. O controle realizado alcançou valores superiores aos cultivos estáticos para todos os dias de cultivo. Isto indica que os *scaffolds* não foram citotóxicos para as células e que as medições estavam de acordo com os valores esperados após a morte forçada das células pela adição do Triton X-100 nos poços.

No cultivo estático, as dosagens de LDH foram significativamente influenciadas pelos dias de cultivo ($p = 0,00018$) e entre os próprios cultivos estáticos ($p = 0,0216$), em concordância com a diferença estatística observada na avaliação da viabilidade. Como os valores foram menores que o cultivo dinâmico, sugere-se novamente que a tensão de cisalhamento pode ter influenciado na morte das células.

De maneira geral, a vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ apresentou resultados melhores de viabilidade e adesão celular com relação as demais vazões testadas e também em relação ao cultivo estático. Com isso, sugere-se que, para estudos futuros, sejam testadas vazões mais altas que $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, durante um período maior que 7 dias. A parametrização de novos *scaffolds* de PCL, com diâmetros de poros maiores, que tenham pelo mesmo o mesmo diâmetro das CTMs e que permitam a infiltração das mesmas nos biomateriais, pode levar a formação da MEC.

Repetições dos experimentos dos cultivos estáticos e dinâmicos serão necessárias para confirmar os resultados obtidos e validar o protocolo definido em ambos os cultivos, tendo em vista que o número de amostras para a realização das análises foi pequeno. Entretanto, as análises realizadas são um indício do comportamento das células nos cultivos dinâmicos e

Resultados e Discussão

estáticos e apontam uma direção para pesquisas futuras que envolvam também a otimização do processo para a engenharia de tecidos.

Tabela 4. Concentração de LDH (u/L) presente no sobrenadante dos cultivos estáticos e controle positivo.

| Dia | LDH (u/L) | | |
|-----|----------------|----------------|-------------------|
| | Estático 1 | Estático 2 | Controle Positivo |
| 1 | 188 ± 36,51 | 177,33 ± 28,36 | 505 ± 21,38 |
| | | | 599,33 ± 15,95 |
| | | | 536 ± 63,10 |
| 3 | 301 ± 28,58 | 255,33 ± 13,43 | 691 ± 14,11 |
| | | | 773,33 ± 21,46 |
| | | | 589 ± 20,52 |
| 7 | 278,75 ± 24,07 | 230,67 ± 37,74 | 1.524,67 ± 41,58 |

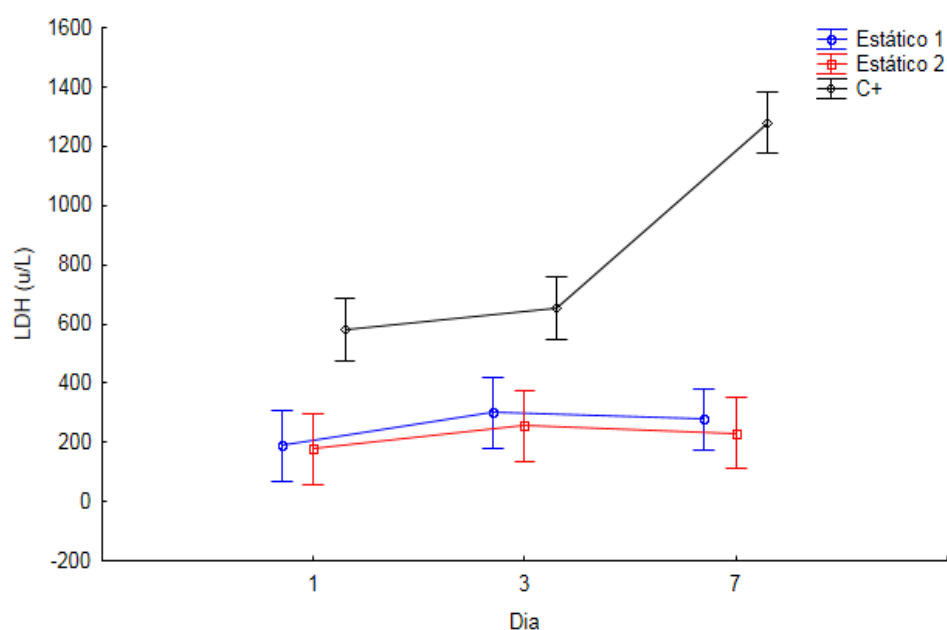


Figura 36. Dosagem de LDH no sobrenadante do cultivo estático. O controle positivo representa o controle de morte celular, onde houve um extravasamento máximo da enzima LDH.

CAPÍTULO 6

As conclusões obtidas a partir dos objetivos definidos para esse trabalho e sugestões para trabalhos futuros estão descritas a seguir.

6. Conclusões

O presente estudo buscou definir um protocolo de cultivo de células-tronco em *scaffolds* multicamada em biorreatores de perfusão. Os biorreatores de perfusão projetados e construídos para esse trabalho foram de fácil manuseio durante os experimentos e não foram observadas contaminações do meio. No entanto, ajustes no sistema de perfusão devem ser realizados para validação do protocolo. Os *scaffolds* de PCL fabricados por *electrospinning* podem ter sido decisivos para a não penetração das células no biomaterial, por isso, sugere-se que novos parâmetros sejam testados para a construção de *scaffolds* com fibras e poros maiores. Nos cultivos estáticos, as análises de viabilidade demonstraram que células cultivadas sob as mesmas condições apresentaram resultados diferentes, o que pode ter sido causado por fatores ligados à interação das células com o biomaterial e à montagem da estrutura em camadas. No cultivo dinâmico, dentre as vazões de meio utilizadas, embora sejam necessários testes de reprodutibilidade para confirmar os resultados, a taxa de $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ foi promissora para a viabilidade e adesão celular dentro das condições específicas desse experimento. Aliados a estes novos testes, a modelagem da cinética de proliferação das células e do transporte de nutrientes podem auxiliar na elucidação do comportamento das células nos *scaffolds*, fazendo dessa, uma estratégia de cultivo fundamental para o sucesso da engenharia de tecidos.

7. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, C. M., RAY, R. B., Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 55, p. 141-150, 2001.

ANKRUM, J., KARP, J. M. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends in Molecular Medicine.*, v. 16, p. 203-209, 2010.

ARTHUR, A., RYCHKOV, G., SHI, S., KOBLAR, S. A., GRONTHOS, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, v. 26, p. 1787-1795, 2008.

BALGUID, A., MOL, A., van MARION, M. H., BANK, R. A. BOUTEN, C. V. C., BAAIJENS, F. P. T. Tailoring Fiber Diameter in Electrospun Poly (ϵ -Caprolactone) Scaffolds for Optimal Cellular Infiltration in Cardiovascular Tissue Engineering. *Journal of Tissue Engineering: Part A*, v. 15, p. 437-444, 2009.

BANCROFT, G. N., SIKAVITSAS, V. I., van den DOLDER, J., SHEFFIELD, T. L., AMBROSE, C. G., JANSEN, J. A., MIKOS, A. G. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Applied Biological Sciences*, v. 99, p. 12600-12605, 2002.

BANCROFT, G.N., SIKAVITSAS, V.I., MIKOS, A.G., Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue engineering applications. *Tissue Engineering*, v. 9, p. 549-554, 2003.

BERNARDI, L., LUISI, S. B., FERNANDES, R., DALBERTO, T. P., VALENTIM, L., CHIES, J. A. B., FOSSATI, A. C. M., PRANKE, P. The Isolation of Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp Is Related to the Physiological Process of Resorption. *Journal of Endodontics*, v. 37, p. 973-979, 2011.

BJERRE, L., BUNGER, C. E., KASSEM, M., MYGIND, T. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials*, v. 29, p. 2616-2627, 2008.

Referências Bibliográficas

BOLAND, E. D., MATTHEWS, J. A., PAWLOWSKI, K. J., SIMPSON, D. G., WNEK, G. E., BOWLIN, G. L. Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, p. 1422-1432, 2004.

BRAGHIROLI, D. I., STEFFENS, D., QUINTILIANO, K., ACASIGUA, G. A. X., GAMBA, D., FLECK, R. A., PETZOLD, C. L., PRANKE, P. The effect of sterilization methods on electrospun poly (lactide-co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 102, p. 700-708, 2013.

BRAGHIROLI, D. I., STEFFENS, D., PRANKE, P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discovery Today*, v. 19, p. 743-753, 2014.

BUSSOLATI, C., TETTA, G., CAMUSSI, G. Contribution of stem cells to kidney repair. *American Journal of Nephrology*, v. 28, p. 813-822, 2008.

BUTLER, D. L., GOLDSTEIN, S. A., GUILAK, F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *Journal Biomechanical Engineering*, v. 122, p. 570-575, 2000.

CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *Journal of Cellular Physiology*, v. 213, p. 341-347, 2007.

CHAN, B. P., LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, v. 17, p. 467-479, 2008.

CHARY, S. R., JAIN, R. K. Direct measurement of interstitial convection and diffusion of albumin in normal and neoplastic tissues by fluorescence photobleaching. *Proceedings of the National Academy Sciences*, v. 14, p. 5385-5389. DAFNI, H., ISRAELY, T., BHUJWALLA, Z. M., BENJAMIN, L. E., NEEMAN, M. Over expression of vascular endothelial growth factor 165 drives peritumor interstitial convection and induces lymphatic drain: magnetic resonance imaging, confocal microscopy, and histological tracking of triple-labeled albumin. *Cancer Research*, v. 22, p. 6731-6740, 2002.

d'AQUINO, R., PAPACCIO, G., LAINO, G., GRAZIANO, A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 4, p. 21-26, 2008.

Referências Bibliográficas

DASH, T. K., KONKIMALLA, V. B. *Poly-ε-caprolactone* based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, v. 158, p. 15-33, 2012.

DAWSON, E., MAPILI, G., ERICKSON, K., TAQVI, S., ROY, K., Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 215-228, 2008.

DECLERQ, H. A., CALUWÉ, T. D., KRYSKO, O., BACHERT, C., CORNELISSEN, M. J. Bone grafts engineered from human-adiposed derived stem cells in dynamics 3D-environments. *Biomaterials*, v. 34, p. 1004-1017, 2013.

DERMENOUDIS, S., MISSIRLIS, Y. F. Bioreactors in tissue engineering. *Advanced Engineering Materials*, v. 12, p. 592-608, 2010.

DHANDAYUTHAPANI, B., YOSHIDA, Y., MAEKAWA, T., KUMAR, D. S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, v. 2011, p. 1-19, 2011.

DOMINICI, M., BLANC, K. L., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., DEANS, R. J., KEATING, A., PROCKOP, D. J., HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315-317, 2006.

DUNN, J. C. Y., CHAN, W., CRISTINI, V., KIM, J. S., LOWENGRUB, J., SINGH, S., WU, B. M. Analysis of Cell Growth in Three-Dimensional Scaffolds. *Tissue Engineering*, v. 12, p. 705-716, 2006.

EIBL, R., EIBL, D., PORTNER, R., CATAPANO, G., CZERMAK, P. Cell and Tissue Reaction Engineering. *Springer*, 2008.

EL HAJ, A. J., WOOD, M. A., YANG, Y. Controlling cell biomechanics in orthopaedic tissue engineering and repair. *Pathologie Biologie*, v. 53, p. 581-589, 2005.

ESTELLÉS, J. M., VIDAURRE, A., DUEÑAS, J. M. M., CORTÁZAR, I. C. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, p. 189-195, 2008.

FERNANDES-PLATZGUMMER, A., DIOGO, M. M., DA SILVA, C. L., CABRAL, J. M. S. maximizing mouse embryonic stem cell production in a stirred tank reactor by controlling

Referências Bibliográficas

dissolved oxygen concentration and continuous perfusion operation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 82, p. 81-90, 2014.

FLEMMING, R. G., MURPHY, C. J., ABRAMS, G. A., GOODMAN, S. L., NEALEY, P. F. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, v. 20, p. 573-588, 1999.

GARZÓN, I., MARTIN-PIEDRA, M. A., ALAMINOS, M. Human Dental Pulp Stem Cells. A promising epithelial-like cell source. *Medical Hypotheses*, v. 84, p. 516-517, 2015.

GOLDSTEIN, A. S., JUAREZ, T. M., HELMKE, C. D., GUSTIN, M. C., MIKOS, A. G. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer scaffolds. *Biomaterials*, v. 22, p. 1279-1288, 2001.

GRIFFITH, L. G., Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 961, p. 83-95, 2002.

GRONTHOS, S., MANGANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, PG. & SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 13625-13630, 2000.

GUO, T., LI, Y., CAO, G., ZHANG, Z., CHANG, S., CZAJKA-JAKUBOWSKA, A., NÖR, J. E., CLARKSON, B. H., LIU, J. Fluorapatite-modified Scaffold on Dental Pulp Stem Cell Mineralization. *Journal of Dental Research*, v. 12, p. 1290-1295, 2014.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, v. 4, p. 518-524, 2005.

HORWITZ, E., LE, B. K., DOMINICI, M. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 7, p. 393-395, 2005.

HUSSAIN, D., LOYAL, F., GREINER, A., WENDORFF, J. H. Structure property correlations for electrospun nanofiber nonwovens. *Polymer*, v. 51, p. 3989-3997, 2010.

IOHARA, K., ZHENG, L., WAKE, H., ITO, M., NABEKURA, J., WAKITA, H., NAKAMURA, H., INTO, T., MATSUSHITA, K., NAKASHIMA, M. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*, V. 26, P. 2408-2418, 2008.

Referências Bibliográficas

JAASMA, M.J., PLUNKETT, N.A., O'BRIEN, F.J., Design and validation of a dynamic flow perfusion bioreactor for use with compliant tissue engineering scaffolds. *Journal of Biotechnology*, v. 133, p. 490–496, 2008.

JANSSEN, F. W., OOSTRA, J., VAN OORSCHOT, A., VAN BLIITERSWIJK, C. A. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*, v. 27, p. 315-323, 2006.

KAIHARA, S.; VACANTI, J.P. Tissue engineering – Toward new solutions for transplantation and reconstructive surgery. *Archives of Surgery*, v. 134, p. 1184-1188, 1999.

KARP, J. M., DALTON, P. D., SHOICHET, M. S. Scaffolds for tissue engineering. *Materials Research Society Bulletin*, p. 301-306, 2003.

KHANNA-JAIN, R., MANNERSTRÖM, B., VUORINEN, A., SÁNDOR, G. K. B., SUURONEN, R., MIETTINEN, S. Osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on β -tricalcium phosphate/poly(L-lactic acid/caprolactone) three-dimensional scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, v. 3, p. 1-11, 2012.

KIM, B.S., PUTNAM, A. J., KULIK, T. J., MOONEY, D. J. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 57, p. 46-54, 1998.

KIM, B. C., BAE, H., KNOW, II. K., LEE, E. J., PARK, J. H., KHADEMHOSEINI, A., HWANG, Y. S. Osteoblastic/Cementoblastic and Neural Differentiation of Dental Stem Cells and Their Applications to Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Engineering: Part B*, v. 18, p. 235-244, 2012.

KIROUAC, D. C., ZANDSTRA, P. W. The Systematic Production of Cells for Cell Therapies. *Cell Stem Cell*, v. 3, p. 369-381, 2008.

KNAÄN-SHANZER, S. Concise Review: The Immune Status of Mesenchymal Stem Cells and Its Relevance for Therapeutic Application. *Stem Cells*, v. 32, p. 603-608, 2014.

KOROSSIS, S. A., BOLLAND, F., KEARNEY, J. N., FISHER, J., INGHAM, E. Bioreactors in tissue engineering. *Topics in Tissue Engineering*, v. 2, c. 8, 2005.

Referências Bibliográficas

LALAN, S., POMERANTSEVA, I., VACANTI, J. P. Tissue Engineering and Its Potential Impact on Surgery. *World Journal of Surgery*, v. 25, p. 1458-1446, 2001.

LANGER, R., VACANTI, J. P. Tissue Engineering. *Science*, v. 260, p. 920-926, 1993.

LAU, R., PAUS, S., TIEDE, P. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology*, v. 18, p. 921-933, 2009.

LAWRENCE, B. J., DEVARAPALLI, M., MADIHALLY, S. V. Flow dynamics in bioreactors containing tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, p. 935-947, 2009.

LI, Y., MA, T., YANG, S. T., KNISS, D. A. Thermal compression and characterization of three-dimensional nonwoven PET matrices as tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, v. 22, p. 609-618, 2001b.

LI, W. J., TULI, R., HUANG, X., LAQUERRIERE, P., TUAN, R. S. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials*, v. 26, p. 5158-5166, 2005.

LI, D., TANG, T., LU, J., DAI, K. Effects of Flow Shear Stress and Mass Transport on the Construction of a Large-Scale Tissue Engineered Bone in a Perfusion Bioreactor. *Tissue Engineering: Part A*, v. 15, p. 2773-2783, 2009.

LIAO, J., GUO, X., GRANDE-ALLEN, K. J., KASPER, F. K., MIKOS, A. G. Bioactive polymer/extracellular matrix scaffolds fabricated with a flow perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, p. 8911-8920, 2010.

LIU, X., MA, P. X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 32, p. 477-486, 2004.

LIU, C., XIA, Z., CZERNUSKA, J. T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design: Part A*, v. 85, p. 1051-1064, 2007.

LIU, C., ABEDIAN, R., MEISTER, R., HAASPER, C., HURSCHLER, C., KRETTEK, C., von LEWINSKI, G., JAGODZINSKI, M. Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Biomaterials*, v. 33, p. 1052-1064, 2012.

Referências Bibliográficas

MAQUET, V., JEROME, R. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Materials Science Forum*, v. 250, p. 15-42, 1997.

MARTIN, I., WENDT, D., HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, v. 22, p. 80-86, 2004.

MARTIN, Y., VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, v. 26, p. 7481-7503, 2005.

MATTHEWS, J. A., WNEK, G. E., SIMPSON, D. G., BOWLIN, G. L. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*, v. 3, p. 232-238, 2002.

McDEVITT, T., PALECEK, S. P. Innovation in the culture and derivation of pluripotent human stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, p. 527-533, 2008.

MEINEL, I., KARAGEORGIU, V., FAJARDO, R., SNYDER, B., SHINDE-PATIL, V., ZICHNER, L., KAPLAN, D., LANGER, G., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 32, p. 112-122, 2004.

MEIRELLES, L. S., NARDI, N. B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *British Journal of Hematology*, v. 123, p. 702-711, 2003.

MIN, B. M., LEE, G., KIM, S. H., NAM, Y. S., LEE, T. S., PARK, W. H. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*, v. 25, p. 1289-1297, 2004.

MIURA, M., GRONTHOS, S., ZHAO, M., LU, B., FISHER, L. W., ROBEY, PG. & SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100,p. 5807-5812, 2003.

MO, X. M., XU, C. Y., KOTAKI, M., RAMAKRISHNA, S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials*, v. 25, p. 1883-1890, 2004.

MOONEY, D. J., MAZZONI, C. L., BREUER, C. Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 17, p. 115, 1996.

Referências Bibliográficas

MORSCZECK, C., GOTZ, W., SCHIERHOLZ, J., ZEILHOFER, F., KUHN, U., MOHL, C., SIPPEL, C., HOFFMANN, K. H. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, v. 24, p.155-165, 2005.

MYGIND, T., STIEHLER, M., BAATRUP, A., LI, H., ZOUA, X., FLYVBJERG, A., KASSEM, M., BUNGER, C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite. *Biomaterials*, v. 28, p. 1036-1047, 2007.

NAM, J., HUANG, Y., AGARWAL, S., LANNUTTI, J. Improved Cellular Infiltration in Electrospun Fiber via Engineered Porosity. *Tissue Engineering*, v. 13, p. 2249-2257, 2007.

NEREM, R. M. Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future. *Tissue Engineering*, v. 12, p. 1143-1150, 2006.

NERURKAR, N. L., SEN, S., BAKER, B. M., ELLIOTT, D. M., MAUCK, R. L. Dynamic culture enhances stem cell infiltration and modulates extracellular matrix production on aligned electrospun nanofibrous scaffolds. *Acta Biomaterialia*, v. 7, p. 485-491, 2011.

NISHINO, Y., EBISAWA, K., YAMADA, Y., OKABE, K., KAMEI, Y., UEDA, M. Human deciduous teeth dental pulp cells with basic fibroblast growth factor enhance wound healing of skin defect. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 22, p. 438-442, 2011.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, v. 14, p. 88-95, 2011.

O'BRIEN, F. J., HARLEY, B. A., YANNAS, I. V., GIBSON, L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, v. 25, p. 1077-1086, 2004.

OH, J. Y., KIM, M. K., SHIN, M. S. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*, v. 26, p. 1047-1055, 2008.

PAPENBURG, B. J., LIU, J., HIGUERA, G. A., BARRADAS, A. M. C., de BOER, J., van BLITTERSWIJK, C. A., WESSLING, M., STAMATIHALIS, D. Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, p. 6228-6239, 2009.

PASSIER, R., MUMMERY, C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research*, v. 58, p. 324-335, 2003.

Referências Bibliográficas

PHAM, Q. P., SHARMA, U., MIKOS, A. G. Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 2796-2805, 2006.

PITTINGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C. JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S., MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-147, 1999.

PORTER, B., ZAUDEL, R., STOCKMAN, H., GULDBERG, R., FYHRIE, D. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor. *Journal of Biomechanics*, v. 38, p. 543-549, 2005.

PÖRTNER, R., NAGEL-HEYER, S., GOEPFERT, C., ADAMIETZ, P., MEENEN, N. M. Bioreactor Design for Tissue Engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p. 235-245, 2005.

POUNTOS, I., GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cells. *International Journal of the Care of the Injured*, v. 36, p. 8-12, 2005.

POUNTOS, I., CORSCADDEN, D., EMERY, P., GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Internacional Journal of the Care of the Injured*, v. 38S4, p. S23-S34, 2007.

RADISIC, M., EULOTH, M., YANG, L., LANGER, R., FREED, L. E., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, p. 403-414, 2003.

RADISIC, M., MARSANO, A., MAIDHOF, R., WANG, Y., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems. *Nature Protocols*, v. 3, p. 719-738, 2008.

RATCLIFFE, A., NIKLASON, L. E. Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 961, p. 210-215, 2002.

RODRIGUES, C. A. V., FERNANDES, T. G., DIOGO, M. M., SILVA, C. L., CABRAL, J. M. S. Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 815-829, 2011.

Referências Bibliográficas

ROLFE, P. Sensing in tissue bioreactors. *Measurement Science and Technology*, v. 17, p. 578-583, 2006.

ROMANOV, Y. A., SVINTSITSKAYA, V. A., SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, v. 21, p. 105-110, 2003.

RUSSEL, P.S. Selective Transplantation. *Annals of Surgery*, v. 201, p. 255-262, 1985.

RUTKOWSKI, J. M., SWARTZ, M. A. A driving force for change: Interstitial flow as a morphoregulator. *Trends in Cell Biology*, v. 17, p. 44-50, 2007.

SACHLOS, E., CZEMUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work: review on the application of sff technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*, v. 5, p. 29-40, 2003^a.

SAFSHEKAN, F., SHADPOUR, M. T., SHOKRGOZAR, M. A., HAGHIGHIPOUR, N., MAHDIAN, R., HEMMATI, A. Intermittent hydrostatic pressure enhances growth factor-induced chondroinduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Artificial Organs*, v. 36, p. 1065-1071, 2012.

SAILON, A. M., ALLORI, A. C., DAVIDSON, E. H., REFORMAT, D. D., ALLEN JR., R. J., WARREN, S. M. A Novel Flow-Perfusion Bioreactor Supports 3D Dynamic Cell Culture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2009, p. 1-7, 2009.

SALEHI-NIK, N., AMOABEDINY, G., POURAN, B., TABESH, H., SHOKRGOZAR, M. A., HAGHIGHIPOUR, N., KHATIBI, N., ANISI, F., MOTTAGHY, K., ZANDIEH-DOULABI, B. Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. *BioMed Research International*, p. 1-15, 2013.

SEO, B. M., MIURA, M., GRONTHOS, S., BARTOLD, P. M., BATOULI, S., BRAHIM, J., YOUNG, M., ROBEY, PG., WANG, C. Y., SHI, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, v. 364, p. 149-155, 2004.

SERAKINCI, N., KEITH, W. N. Therapeutic potential of adult stem cells. *European Journal of Cancer*, v. 42, p. 1243-1246, 2006.

Referências Bibliográficas

SHIGEMURA, N., OKUMURA, M., MIZUNO, S. Autologous transplantation of adipose tissue-derived stromal cells ameliorates pulmonary emphysema. *American Journal of Transplantation*, v. 6, p. 2592-2600, 2006.

SIKAVITSAS, V.I., BANCROFT, G.N., MIKOS, A.G. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 62, p. 136-148, 2002.

SIKAVITSAS, V. I., BANCROFT, G. N., HOLTORF, H. L., JANSEN, J. A., MIKOS, A. G. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 14683-14688, 2003.

SIKAVITSAS, V. I., BANCROFT, G. N., LEMOINE, J. J., LIEBSCHNER, M. A. K., DAUNER, M., MIKOS, A. G. Flow Perfusion Enhances the Calcified Matrix Deposition of Marrow Stromal Cells in Biodegradable Nonwoven Fiber Mesh Scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 33, p. 63-70, 2005.

SILVA, T. H. A., BUTERA, A. P., LEAL, D. H. S., ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese– Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, p. 1-17, 2007.

SILVA, A. R. P. *Avaliação da diferenciação osteogênica de células-tronco do tecido adiposo humano, cultivadas em espuma de vidro bioativo e biorreator de perfusão para engenharia de tecido ósseo*. Tese de Doutorado, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2012.

SMITH, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 17, p. 435-462, 2001.

SOLIMAN, S., PAGLIARI, S., RINALDI, A., FORTE, G., FIACCAVENTO, R., PAGLIARI, F., FRANZESE, O., MINIERI, M., NARDO, P. D., LICOCIA, S., TRAVERSA, E. Multiscale three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering via multimodal electrospinning. *Acta Biomaterialia*, v. 6, p. 1227-1237, 2010.

SONG, J. J., GUYETTE, J., GLIPIN, S., GONZALEZ, G., VACANTI, J. P., OTT, H. C. Regeneration and Experimental Orthotopic Transplantation of a Bioengineered Kidney. *Nature Medicine*, v. 5, p. 646-651, 2013.

Referências Bibliográficas

SONOYAMA, W., LIU, Y., FANG, D., YAMAZA, T., SEO, B.M., ZHANG, C., LIU, H., GRONTHOS, S., WANG, C. Y., SHI, S., WANG, S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, v. 1, p. 1-8, 2006.

SROUJI, S., KIZHNER, T., SUSS-TOBI, E., LIVNE, E., ZUSSMAN, E. 3-D Nanofibrous electrospun multilayered construct is an alternative ECM mimicking scaffold. *Journal of Materials Science*, v. 19, p. 1249-1255, 2008.

STAMATIALLIS, D. F., PAPPENBURG, B. J., GIRONÉS, M., SAIFUL, S., BETTAHALLI, S. N. M., SCHMITMEIER, S., WESSLING, M. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, v. 308, p. 1-34, 2008.

STOCK, A., VACANTI, J. P. Tissue engineering: current state and prospects. *Annual Review of Medicine*, v. 52, p. 443-451, 2001.

SUBBIAH, T., BHAT, G. S., TOCK, R. W., PARAMESWARAN, S., RAMKUMAR, S. S. Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 96, p. 557-569, 2005.

SUCHANEK, J., SOUKUP, T., VISEK, B., IVANCAKOVA, R., KUCEROVA, L., MOKRY, J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical Papers*, v. 153, p. 31-36, 2009.

SUN, B., LONG, Y. Z., ZHANG, H. D., LI, M. M., DUVAIL, J. L., JIANG, X. Y., YIN, H. L. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science*, v. 39, p. 862-890, 2014.

TAKAHASHI, Y., TABATA, Y. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomaterials Science: Polymer*, v. 15, p. 41-57, 2004.

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

THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S., JONES, J. M. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts. *Science*, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

Referências Bibliográficas

TUZLAKOGLU, K., BOLGEN, N., SALGADO, A. J., GOMES, M. E., PISKIN, E., REIS, R. L. Nano- and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 16, p. 1099-1104, 2005.

VACANTI, J. Beyond transplantation. *Archives in Surgery*, v. 123, p. 545-549, 1988.

VACANTI, J. P., LANGER, R. L. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, v. 32, p. 354, 1999.

VACANTI, J.; VACANTI, C. A. The History and Scope of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering*, 3^a ed., Elsevier, c. 1, p. 3-6, 2007.

VAIL, N. K., SWAIN, L. D., FOX, W. C., AUFDLEMORTE, T. B., LEE, G., BARLOW, J. W. Materials for biomedical applications. *Materials and Design*, v. 20, p. 123-132, 1999.

VALINA, C., PINKERNELL, K., SONG, Y. H. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, v. 28, p. 2667-2677, 2007.

Van VELTHOVEN, C. T., KAVELAARS, A., van BEL, F. Regeneration of the ischemic brain by engineered stem cells: Fuelling endogenous repair processes. *Brain. Res.*, v. 61, p. 1-13, 2009.

VATS, A., TOLLEY, N.S., POLAK, J.M., BUTTERY, L.D.K. Stem cells: sources and applications. *Clinical Otolaryngology*, v. 27, p. 227-232, 2002.

VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, p. 437-446, 2009.

VOLKMER, E., DROSSE, I., OTTO, S., STANGELMAYER, A., STENGELE, M., KALLUKALAM, B.C., MUTSCHLER, W., SCHIEKER, M., Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Engineering: Part A*, v. 14, p. 1331-1340, 2008.

WEI, X., YANG, X., HAN, Z. P., QU, F. F., SHAO, L., SHI, Y. F. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, p. 747-754, 2013.

Referências Bibliográficas

WENDT, D., TIMMINS, N., MALDA, J., JANSSEN, F., RATCLIFFE, A., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., MARTIN, I. Bioreactors for tissue engineering. *Tissue Engineering: Part C*, p. 484-506, 2008.

WHANG, K., TSAI, D. C., NAM, E. K., AITKEN, M., SPRAGUE, S. M., PATEL, P. K., HEALY, K. E. Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 42, p. 491, 1998.

WNEK, G. E., CARR, M. E., SIMPSON, D. G., BOWLIN, G. L. Electrospinning of Nanofiber Fibrinogen Structures. *American Chemical Society*, v. 3, p. 213-216, 2003.

WOO, B. H., KOSTANSKI, J. W., GEBREKIDAN, S., DANI, B. A., THANOO, B. C., DeLUCA, P. P. Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly(D,L-lactide) leuprolide microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 75, p. 307-3015, 2001.

WOODRUFF, M. A., HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 1217-1256, 2010.

YAMADA, Y., ITO, K., NAKAMURA, S., UEDA, M., NAGASAKA, T. Promising Cell-Based Therapy for Bone Regeneration Using Stem Cells From Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow. *Cell Transplantation*, v. 20, p. 1003-1013, 2011.

YANG, S. F., LEONG, K. F., DU, Z. H., CHUA, C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I: Traditional factors. *Tissue Engineering*, v. 7, p. 679-689, 2001.

YANG, J.F., CAO, C., WANG, W., TONG, X.M., SHI, D.Y., WU, F.B., ZHENG, Q., GUO, C.J., PAN, Z.J., GAO, C.Y., WANG, J.F., Proliferation and osteogenesis of immortalized bone marrow-derived mesenchymal stem cells in porous polylactic glycolic acid scaffolds under perfusion culture. *Journal of Biomedical Materials Research: Part. A*, v. 92, p. 817–829, 2009.

YANG, X., SHAH, J. D., WANG, H. Nanofiber Enabled Layer-by-Layer Approach Toward Three-Dimensional Tissue Formation. *Tissue Engineering*, v. 15, p. 945-956, 2009.

YANG, X., YANG, F., WALLBOOMERS, X. F., BIAN, Z., FAN, M., JANSEN, J. A. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, p. 247-257, 2009.

Referências Bibliográficas

YEATTS, A.B., FISHER, J.P. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering: Part C Methods*, v. 17, p. 337–348, 2011.

YEATTS, A.B., CHOQUETTE, D. T., FISHER, J. P. Bioreactors to influence stem cell fate: Augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, p. 2470–2480, 2013.

YELICK, P. C., VACANTI, J. P. Dental Stem Cells. *Handbook of Stem Cells*, v. 2, cap.26, p. 279-292, 2004.

YOON, J. J., KIM, J H., PARK, T. G. Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method. *Biomaterials*, v. 24, p. 2323-2329, 2003.

YOSHIMOTO, H., SHIN, Y. M., TERAJ, H., VACANTI, J. P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 24, p. 2077-2082, 2003.

YOUNG, H. E., STEELE, T. A., BRAY, R.A., et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical Record*, v. 264, p. 51-62, 2001.

ZAVAN, B., BRESSAN, E., SIVOLELLA, S., BRUNELLO, G., CHIARA, G., FERRARESE, N., FERRONI, L., STELLINI, E. Dental Pulp Stem Cells and Tissue Engineering Strategies for Clinical Application on Odontoiatric Field. *Biomaterials Science and Engineering*, 2011.

ZHAO, F., MA, T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 91, p. 482-493, 2005.

ZHAO, F., CHELLA, R., MA, T. Effects of Shear Stress on 3-D Human Mesenchymal Stem Cell Construct Development in a Perfusion Bioreactor System: Experiments and Hydrodynamic Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 96, p. 584-595, 2007.

Referências Bibliográficas

ZHAO, F., GRAYSON, W. L., MA, T., IRSIGLER, A. Perfusion Affects the Tissue Developmental Patterns of Human Mesenchymal Stem Cells in 3D Scaffolds. *Journal Cellular Physiology*, v. 219, p. 421-429, 2009.

ZHAO, Q., REN, H., ZHU, D. Stem/progenitor cells in liver injury repair and regeneration. *Biology of the Cell.*, v 101, p. 557-571, 2009.

ZHU, X., CUI, W., LI, X., JIN, Y. Electrospun Fibrous Mats with High Porosity as Potential Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 1795-1801, 2008.

ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell.*, v. 13, p. 4279-4295, 2002.