

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

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES DE NANOFIBRAS DE POLI-
D,L-ÁCIDO LÁCTICO PELA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING* PARA
UTILIZAÇÃO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO PARA A
ENGENHARIA DE TECIDOS**

Daniela Steffens

Dissertação de Mestrado
Porto Alegre, março de 2012.

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

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES DE NANOFIBRAS DE POLI-
D,L-ÁCIDO LÁCTICO PELA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING* PARA
UTILIZAÇÃO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO PARA A
ENGENHARIA DE TECIDOS**

Daniela Steffens

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

Porto Alegre
2012

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Patrícia Pranke. As notas dominantes da tua orientação foram a utilidade das suas recomendações e a cordialidade com que sempre me recebeste, além da liberdade de ação que me proporcionaste, que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Desde os tempos de graduação, na Iniciação Científica, apresentando-me o mundo das células-tronco e proporcionando experiências únicas... Não caberiam outras palavras que não fossem: Obrigada por tudo!

À minha família, PAI, MÃE e Guilherme. Vocês são o meu porto seguro. Aqueles em que incontáveis vezes descarreguei o meu cansaço, os meus descontentamentos, as minhas derrotas e tristezas. Aqueles que também souberam vibrar e se alegrar com todas as minhas conquistas. Obrigada pelo contínuo estímulo e por não medir esforços em me ajudar.

Ao meu namorado, **Gustavo**... Todos que conviveram conosco neste período sabem o quanto você foi importante nessa trajetória. “Responsável” pela minha vinda à Porto Alegre... Soube compreender as inúmeras “crises de existência” e continuar ao meu lado durante todos esses anos. É tão difícil expressar em palavras a gratidão por todos os momentos passados juntos e pelo companheirismo mútuo desde o início das nossas graduações...

Enfim, obrigada por estar sempre presente e compreender a minha ausência em alguns momentos... mas, os frutos virão!

À família do Gustavo, **Jorge e Maria Helena**... agradeço todo o carinho durante estes oito anos que nos conhecemos. A todos os veraneios passados juntos, sendo muito bem acolhida.

Às companheiras de apê, **Jéssica e Amanda**, pelas noites mais divertidas e pelo compartilhamento de desabafos e alegrias da vida científica e pessoal... O convívio com vocês torna os dias mais leves!

Às minhas queridas e inesquecíveis “**Dilís**”, **Nina, Lila, Gí, Gabi, Ana, Érica e Deni**. Meninas, nossa convivência e amizade tornaram-nos uma família, a minha família de PoA. Juntas nos bons momentos e nos não tão bons, mas o mais importante é saber que estamos sempre juntas. Obrigada por incansavelmente me fazerem “ver luz” nas minhas “tragédias”!

À minha querida bolsista, **Michelle Lersch**, pelas inúmeras ajudas durante os experimentos. A disponibilidade e competência deixaram saudades. Obrigada!

Aos queridos colegas de “Lab” Daí, Kerlín, Thay, Anne, Gerson, Pedro, Cris, Davi, Régis, Fer Z., Lisi e Virgínia, por muitas vezes aguentarem algumas manias, desabaços e pelos inúmeros momentos de descontração. Vocês são pessoas especiais e juntos formamos um grupo muito bom (seja na bancada do laboratório ou na mesa de um bar!).

Às técnicas: Fernanda e Simone... .. quanta disponibilidade! Fer, em especial, por sempre ter sorriso franco no rosto aos inúmeros pedidos de orçamento e cobranças. E, Simone, por sempre “dar um jeito” na bagunça!

Ao Doutor Roland Fleck, pelas análises de confocal.

Ao doutorando, Felipe Kessler, pela ajuda no teste de ângulo de contato.

Ao Doutor Rafael Otoniel, pelas imagens de Microscopia de Força Atômica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais desta Universidade pela excelência científica no ensino.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-tronco, pelo apoio financeiro que proporciona a todos, tornando-nos profissionais mais capacitados.

E aos demais que contribuíram de alguma maneira com este trabalho, obrigada!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.2 - A NANOTECNOLOGIA NA ENGENHARIA DE TECIDOS	4
2.3 – BIOMATERIAIS.....	4
2.4 – ELECTROSPINNING.....	5
2.5 - SPIRULINA	6
2.6 – NANOFIBRAS COMO BIOMATERIAIS PARA O CULTIVO DE CÉLULAS.....	7
2.7 – CÉLULAS-TRONCO	8
2.8 – MATRIZES DE POLI- <i>D,L</i> -ÁCIDO LÁCTICO (PDLA) COM CÉLULAS- TRONCO PARA PROMOVER A REGENERAÇÃO DE PELE	8
3 – OBJETIVOS.....	10
3.1 – OBJETIVO GERAL.....	10
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4 – MATERIAIS E MÉTODOS:	11
4.1 – OBTENÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>SPIRULINA</i> :	11
4.2 – PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS:.....	11
4.3 – PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE <i>ELECTROSPINNING</i>	11
4.4 – OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS:	12
4.5 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS:.....	14
4.6 – PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS:	16
4.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	18
5.2 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS.....	19
5.3 – PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS:	27
6 – CONCLUSÃO	32
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um equipamento de *electrospinning* (Fonte: <http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-wendorff/research>).

Figura 2: Ilustração da estrutura do polímero Poli-D,L-ácido láctico.

Figura 3: Diferenciação celular *in vitro* em 3 tipos celulares: adipócitos, condrócitos, osteócitos e grupo controle (não submetido à diferenciação).

Figura 4: Morfologia do biomaterial avaliada por fotografias de MEV: A) PDLLA com ampliação de 7.000 vezes. B) PDLLA/*Spirulina* com ampliação de 7.500 vezes.

Figura 5: Demonstração da distribuição de diâmetros de fibras de ambas as matrizes utilizadas no estudo.

Figura 6: Gráfico da percentagem de perda de massa para as matrizes de PDLLA, PDLLA/*Spirulina* e para a biomassa de *Spirulina*.

Figura 7: Gráfico da perda de peso molecular avaliados em diferentes períodos: 0 (não submetido ao processo de degradação), 7, 14, 30 e 60 dias.

Figura 8: Gráfico do perfil de emissão de fluorescência dos scaffolds de PDLLA e PDLLA/*Spirulina* e da biomassa pura da *Spirulina*.

Figura 9: Fotografias do teste de ângulo de contato em matrizes de PDLLA e PDLLA/*Spirulina*, respectivamente.

Figura 10: Gráfico de teste de ângulo de contato em três diferentes tempos: 30, 60 e 120 segundos.

Figura 11: Imagens de Microscopia de Força Atômica de matrizes de PDLLA e PDLLA/*Spirulina*, respectivamente.

Figura 12: Ensaio de adesão de 5 diferentes culturas de células-tronco mesenquimais de rins de camundongos.

Figura 13: Teste de viabilidade celular de células-tronco mesenquimais de rins de camundongos nos dias 1, 4, 7 e 14.

Figura 14: Dosagem de Lactato Desidrogenase no sobrenadante de 5 diferentes culturas de células-tronco mesenquimais de rins de camundongos nos dias 4, 7 e 14.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGL Ácido gama-linolênico
- AL Ácido linoléico
- AsAp Ácido ascórbico-2 fosfato
- CMF solução tampão de fosfato adicionado de glicose
- CT Célula-tronco
- CTM Célula-tronco mesenquimal
- DAPI do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DMEM meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DP desvio padrão
- ECM *Extra cellular matrix*
- EDTA ácido etilenodiaminotetracético
- EP Erro padrão
- ET Engenharia de Tecidos
- FDA *Food and Drug Administration*
- G força que exerce a gravidade
- GPC Cromatografia de permeação em gel (do inglês *Gel Permeation Chromatography*)
- HEPES n-2 hidroxietil piperazine- n' - 2 ácido sulfônico etano
- HFIP 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
- IMDM Meio de Dulbecco modificado por Iscove
- λ Comprimento de onda
- LDH Lactato Desidrogenase
- MEC matriz extracelular
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- MFA Microscopia de Força Atômica
- MTT Método do sal de tretazolium
- MW Peso molecular (do inglês *molecular weight*)
- NADH Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido
- °C Graus Celsius
- °C/min Graus Celsius por minuto
- PBS Solução tampão de fosfato (do inglês *phosphate buffer solution*)

PDLLA Poli-D,L- ácido láctico

PDLLA/*Sp* Biomassa da microalga *Spirulina* incorporado ao *scaffold* de Poli-D,L- ácido láctico

PE Ficoeritrina (do inglês *Phycoeritrin*)

PM Peso molecular

ppm Parte por milhão

Ra Rugosidade média

RPM Rotações por minuto

SC Stem cell

SFB Soro fetal bovino

TGA Análise termogravimétrica (do inglês *Termogravimetric Analysis*)

TGFb1 fator de crescimento transformador beta 1 (do inglês *Transforming growth factor beta 1*)

THF Tetrahidrofurano

UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul

U/mL Unidades por mililitro

v/v Volume/volume

7AAD 7-Amino Actinomicina D

RESUMO

A associação das células-tronco (CT) com os biomateriais prometem ser os protagonistas para o futuro da medicina regenerativa no tratamento de lesões de tecidos e órgãos. No presente trabalho, as células-tronco foram cultivadas em matrizes construídas pela técnica de *electrospinning*, usando o polímero poli-D,L-ácido láctico (PDLLA) associado ou não à biomassa da microalga *Spirulina* (PDLLA/*Sp*), que possui componentes bioativos de interesse para a engenharia de tecidos (ET). As análises físico-químicas realizadas foram a avaliação da morfologia, do diâmetro das fibras, da degradabilidade, da rugosidade, do teor de solvente residual, do ângulo de contato com água, entre outros. A adesão e a proliferação celular, bem como a citotoxicidade do biomaterial também foram avaliados. As nanofibras obtidas apresentaram-se sem *beads* e com características semelhantes às da matriz extracelular natural (MEC) em termos de propriedades mecânicas e topográficas. Nos testes biológicos, verificou-se que as CTs aderiram mais e tiveram maior viabilidade nos *scaffolds* de PDLLA/*Sp*, quando comparado com as matrizes de nanofibras de PDLLA. Ambos os biomateriais mostraram-se atóxicos para as CTs. Pode-se concluir que as matrizes desenvolvidas neste trabalho apresentam as características necessárias de um novo biomaterial adequado para uso na ET.

ABSTRACT

The association of stem cells (SCs) with biomaterials promises to be the protagonist for future regenerative medicine in the treatment of tissue and organ lesions. Stem cells were cultivated in scaffolds constructed by the electrospinning technique, using poly-D,L-lactic acid (PDLLA) associated or not with *Spirulina* biomass (PDLLA/*Sp*), which has bioactive components of interest for tissue engineering (TE). Physicochemical analyses were performed, such as morphology, fiber diameter, degradability, residual solvent, roughness, contact angle with water, among others. SC adhesion and proliferation and scaffold cytotoxicity were also evaluated. Nanofibers without beads and with characteristics similar to the natural extracellular matrix (ECM) in terms of mechanical and topographical properties were obtained. In biological tests it was found that SCs adhered more and had greater viability in the PDLLA/*Sp* molds, when compared to the PDLLA scaffolds. The scaffolds were shown to be atoxic for the SCs. It can be concluded that the scaffolds developed in this work have the characteristics to be a new biomaterial suitable for use in TE.

1 – INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão imunologicamente competente do corpo. Esse tecido é formado basicamente por duas camadas: a epiderme e a derme. Essas camadas variam em sua espessura, força e flexibilidade e, dessa forma, proporcionam à pele uma grande variedade de funções ¹. Uma vez que a pele serve como uma barreira protetora do nosso organismo ao mundo externo, qualquer lesão causada a ela deve ser rápida e eficientemente reparada.

Na queimadura, as altas temperaturas dilatam os vasos e fazem com que os líquidos contidos neles saiam, formando bolhas. Essas bolhas podem resultar em feridas vulneráveis a infecções. A gravidade das queimaduras é definida pela extensão do dano ocorrido na vítima e as mortes ocorrem em 5% a 7% dos casos ². Quanto maior a profundidade da lesão, maior o seu efeito sobre a cicatrização. Nas queimaduras profundas, os danos à derme envolvem a desnaturação do colágeno, o qual precisa ser retirado para que nova re-epitelização ocorra. Esse processo é feito através de degradação enzimática e fagocitose, aumentando a resposta inflamatória. Dessa forma, a cura leva um tempo maior e o resultado final do reparo da derme é a deposição de colágeno desorganizado, o que fisicamente aparece como uma cicatrização tecidual ¹.

O enxerto de pele tem sido usado para o tratamento de vítimas de extensas e profundas queimaduras de segundo e terceiro grau. No entanto, esse tipo de tratamento geralmente resulta em contração da cicatriz, sendo esse efeito principalmente problemático em crianças devido ao seu crescimento corporal ³.

Dessa forma, a regeneração de pele é um importante campo para a engenharia tecidual ³⁻⁴. Principalmente nas grandes queimaduras e feridas crônicas, os tratamentos disponíveis são insuficientes para prevenir a formação de cicatrizes e promover a cura do paciente ⁴⁻⁵.

O desafio lançado aos pesquisadores dessa área é combinar novos materiais com células vivas para produzir equivalentes cutâneos que sejam duráveis e funcionais e que permitam a integração e manipulação da biologia celular das células hospedeiras e a multiplicidade de sinais que controlam o seu comportamento ⁶.

Atualmente, existe uma variedade de substitutos de pele para uso clínico, sendo que os materiais comumente usados como matriz extracelular artificial incluem aqueles derivados de fontes naturais (colágeno e ácido hialurônico, por exemplo) e aqueles manufaturados (tais como poli-ácido láctico e poli-ácido glicólico) ⁶.

Entretanto, a grande maioria dos produtos atualmente utilizados emprega fontes animais como matéria-prima para a produção desses substitutos cutâneos⁶⁻⁸. Tais substitutos são conhecidos como xenoenxertos. Alguns problemas na sua utilização são a possibilidade de transmissão de doenças e a rejeição imunológica⁹. Dessa forma, alternativas viáveis e seguras ainda são necessárias.

Nesse contexto, a estrutura desses biomateriais ou *scaffolds* é responsável por determinar o transporte de nutrientes, metabólitos e moléculas regulatórias, tanto no sentido meio extracelular-células, como também no sentido inverso¹⁰. Por isso, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para transformar matérias-primas em matrizes com arquitetura interna complexa e porosa. Dentre, elas encontra-se o *electrospinning*¹¹⁻¹² ou eletrofiação. Essa técnica funciona pelo princípio eletrostático, onde soluções poliméricas produzidas com diferentes solventes e polímeros são processadas, obtendo-se filamentos contínuos com diâmetros que podem variar de micrometros a poucos nanometros.

Com relação ao tratamento de queimaduras, muitos são os produtos comercialmente disponíveis^{6, 8}. Muitos deles também são utilizados no tratamento de outras doenças e situações clínicas, assim como em estudos de desenvolvimento de novos fármacos, produtos antiidade, protetores solares, bem como uma alternativa para evitar testes em animais, entre outros^{7, 13-18}.

Entretanto, não existem materiais que mimetizem completamente a anatomia, a fisiologia, a estabilidade biológica ou a natureza estética da pele saudável. Alguns problemas como a baixa vascularização, a má cicatrização, a ausência de componentes diferenciados, entre outros, ainda são freqüentes nos atuais equivalentes disponíveis^{6, 8, 19-20}.

Devido à grande necessidade de substitutos cutâneos capazes de regenerar grandes perdas de pele, bem como à falta de um substituto ideal, o atual projeto científico visou produzir matrizes de nanofibras. Essas, por sua vez, devem ser capazes de servir como um suporte adequado para o crescimento celular durante um período de tempo necessário para que ocorra a regeneração do tecido cutâneo. Além disso, também se realizou a incorporação da microalga brasileira *Spirulina* ao polímero poli-D,L-ácido láctico (PDLA), para posterior produção de matrizes de nanofibras pela técnica de *electrospinning*. Essa microalga é aceita pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em humanos. Sendo assim, as suas conhecidas propriedades antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica podem conferir uma vantagem em associar a sua biomassa durante a produção da matriz de nanofibras visando a regeneração de pele²¹⁻²³.

O polímero utilizado, poli- D,L – ácido láctico (PDLLA), também já é aceito pelo FDA para uso em humanos e já foi utilizado como suporte para o crescimento de osteoblastos, condrócitos e células de carcinoma pulmonar²⁴⁻²⁷.

Para que ocorra uma interação adequada entre as células e o biomaterial se faz necessário que o mesmo possua características semelhantes ao nicho natural das células. Dessa forma, diversas características do biomaterial para a sua posterior aplicação *in vivo* devem ser avaliadas. Entre as variáveis estudadas estão o tempo de degradabilidade, a hidroflicidade/hidrofobicidade, as análises morfológicas e topográficas, a capacidade de adesão celular, a compatibilidade do biomaterial com as células-tronco, a taxa de proliferação celular, entre outros.

Assim, pretende-se, posteriormente, promover o cultivo de células-tronco com esse novo biomaterial produzido (patente requerida) para testes em modelo animal de lesão cutânea, objetivando a substituição de pele, por exemplo, em pacientes queimados.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – ENGENHARIA DE TECIDOS

A crescente tendência de aumento da expectativa de vida da população, assim como as sérias limitações na utilização de enxertos alógenos, autólogos ou xenoenxertos tem levado cientistas ao redor do mundo a deterem-se cada vez mais na busca de novas alternativas. Dessa forma, as pesquisas nessa área buscam aplicar os princípios do transplante de células e da bioengenharia para a construção de substitutos biológicos. Esses, por sua vez, são utilizados na tentativa de restaurar e manter as funções normais dos órgãos e tecidos até então doentes ou lesados. Esse campo de pesquisa chama-se engenharia de tecidos, fazendo parte da medicina regenerativa²⁸⁻²⁹.

O enfoque da engenharia de tecidos é reparar os tecidos perdidos ou danificados através do uso de fatores de crescimento, terapia celular, biopolímeros injetáveis e biomateriais que sirvam como suporte para o desenvolvimento das células¹⁰.

Essa área engloba conhecimentos de campos diversos como a ciência dos materiais, a biologia celular, o transplante e a engenharia, unindo esforços a fim de desenvolver novos substitutos biológicos tridimensionais que mimetizem a arquitetura do tecido humano³⁰.

A expectativa atual é que o uso da engenharia de tecidos possibilite regenerar tecidos danificados por doenças como câncer, diabetes, lesões medulares, tratamento dentários, queimaduras e outras ³¹⁻³³.

2.2 - A NANOTECNOLOGIA NA ENGENHARIA DE TECIDOS

A nanotecnologia e a medicina regenerativa são as grandes inovações desse século. A associação dessas duas áreas inovadoras, através da combinação do uso de nanofibras e das células-tronco, vem quebrando paradigmas, mostrando-se ser o futuro da terapia regenerativa de órgãos e tecidos e, conseqüentemente, a esperança para inúmeras doenças até então consideradas incuráveis.

As células interagem com o ambiente ao seu redor através de milhares de interações na ordem nanométrica. Dessa forma, o objetivo da engenharia de tecidos em nanoescala é a criação de biomateriais que direcionem as interações entre as células e o seu micro ambiente, pela criação na ordem nanométrica de sinais moleculares de interesse biológico. Além disso, a mimetização da MEC requer biomateriais que sejam ajustáveis até a ordem nanométrica. Assim, as células recebem, processam e respondem à informação apresentada no ambiente circundante, sendo essas ações essenciais no controle do comportamento celular ³⁴.

2.3 – BIOMATERIAIS

A tecnologia de biomateriais tem se desenvolvido gradualmente, sendo os biomateriais construídos com base em conhecimentos das áreas de ciência e engenharia de materiais.

Dentro do grupo de biomateriais, existem os polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que em condições ótimas devem degradar de maneira controlada e sem toxicidade. Ao contrário dos implantes de próteses, os biomateriais devem permanecer o tempo suficiente para realizar a união de células recrutadas ou aplicadas no indivíduo, sem, no entanto, persistir por tempo tão longo que possa obstruir o acoplamento fisiológico célula-célula necessário para a regeneração ou formação de um novo tecido ¹⁰.

As pesquisas nessa área buscam identificar os melhores polímeros para serem usados com células-tronco. Para tanto, deve-se considerar que a estrutura e organização dos componentes da MEC e as interações entre os fatores celulares e solúveis encontrados em tecidos adjacentes são conhecidos por desempenhar um papel significativo na função fisiológica dos tecidos e órgãos ³⁵⁻³⁶.

Nesse sentido, a estrutura desses biomateriais ou *scaffolds* é responsável por determinar o trânsito de nutrientes, metabólitos e moléculas regulatórias entre o meio extracelular e as células, enquanto a estrutura química do biomaterial tem um papel importante na fixação e diferenciação celular. As propriedades mecânicas do biomaterial devem, idealmente, corresponder as do tecido original, proporcionando a integridade mecânica do tecido formado e apoiando uma mecanotransdução entre as células e seu meio ambiente ¹⁰. O sucesso do desenvolvimento e organização de tecidos depende dessas propriedades, porque eles podem, eventualmente, ditar a adesão celular, o transporte de nutrientes/resíduos, a diferenciação celular, a viabilidade celular e a síntese e organização da MEC ³⁰.

Portanto, é importante que os biomateriais recriem este microambiente para desenvolver tecidos com função apropriada. Por isso, é necessário que características como tempo de degradabilidade e biocompatibilidade, entre outros parâmetros físico-químicos e biológicos, sejam avaliados ³⁵⁻³⁶.

Os biomateriais podem ser desenvolvidos com base em substâncias naturais ou sintéticas ³⁷⁻³⁸, além de poderem ser preparados utilizando-se diferentes técnicas como, *electrospinning*, prototipagem, *foaming*, entre outros, gerando morfologias porosas que facilitam o crescimento das células para a formação dos tecidos ^{36, 39-41}.

2.4 – ELECTROSPINNING

O *electrospinning* ou eletrofiação é um método altamente versátil de transformar soluções, principalmente feitas a partir de polímeros, em filamentos contínuos com diâmetros que podem variar de micrometros a poucos nanometros. Essa técnica pode ser aplicada a polímeros sintéticos ou naturais, ligas poliméricas, polímeros carregados com nanopartículas, cromóforos ou agentes ativos, assim como metais e cerâmicas. Por esse método, as fibras podem ser obtidas arranjadas aleatoriamente ou de modo orientado ⁴¹⁻⁴².

As matrizes de nanofibras preparadas pelo método de *electrospinning* apresentam diversas vantagens. Por esse método, as nanofibras formadas mimetizam a estrutura da matriz extracelular em termos de variabilidade de diâmetros de fibras, topologia e textura das fibras e, de modo limitado, também em termos de propriedades mecânicas ⁴³.

O método de *electrospinning* funciona pelo princípio eletrostático, onde são processadas soluções poliméricas feitas com diferentes solventes e polímeros. A solução é suprida ao sistema por meio de uma seringa e é submetida a uma diferença de voltagem elétrica. A solução forma um fio que, devido ao campo de alta tensão, colapsa e forma um jato saindo deste fio indo em direção ao eletrodo oposto (Figura 1) ⁴¹⁻⁴².

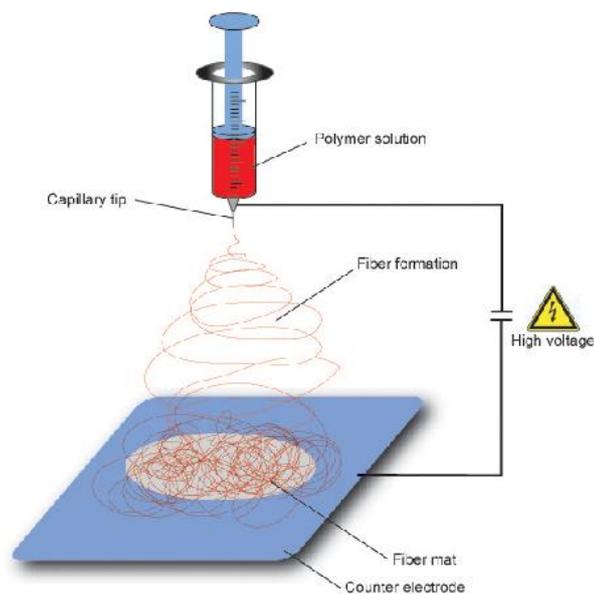


Figura 1: Esquema de um equipamento de *electrospinning* (Fonte: <http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-wendorff/research>).

Os produtos obtidos possuem aplicação em diversas áreas como, indústria têxtil, eletrodos, filtração, catálise, agricultura, optoeletrônica, tecnologia de sensores, além da medicina, onde está presente em diferentes setores⁴¹⁻⁴².

2.5 - SPIRULINA

A *Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa da família *Oscillatoriaceae*. Essa microalga está ganhando atenção de cientistas da área médica devido a suas propriedades nutracêuticas e como fonte de fármacos em potencial²².

Devido à sua aparente capacidade de estimular a fisiologia humana inteira, essa cianobactéria apresenta funções terapêuticas tais como antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticâncer, anti-inflamatória, anti-alérgica, antiparasitária e antidiabética^{21-23, 44-45}.

Outros benefícios também foram atribuídos à biomassa de *Spirulina*. Entre esses, destaca-se a redução do colesterol no sangue, o estímulo do sistema imunológico e de lactobacilos intestinais, a redução da hiperlipidemia, da obesidade, dos efeitos da radiação, bem como de drogas e metais pesados^{21-23, 46}.

Além da biomassa, podem ser obtidos biopolímeros dessa cianobactéria para o desenvolvimento de nanofibras com características de biodegradabilidade e biocompatibilidade com células e tecidos⁴⁷.

A *Spirulina* é aceita pelo FDA para uso humano sob a categoria Geralmente Reconhecido como Seguro (*Generally Recognized as Safe*)⁴⁸. Além disso, as suas conhecidas propriedades antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica podem conferir uma vantagem em associar a biomassa durante a produção das matrizes de nanofibras, para a regeneração de pele.

2.6 – NANOFIBRAS COMO BIOMATERIAIS PARA O CULTIVO DE CÉLULAS

A aplicação de modelos de bioengenharia para a medicina regenerativa é uma área de crescente interesse e atividade⁴⁹. O uso de matrizes de nanofibras para a engenharia de tecidos é uma ferramenta promissora que pode ser utilizada como suporte para o crescimento das células-tronco.

A MEC é uma malha de fibras, que variam de dezenas a milhares de nanômetros em diâmetro, formando um arcabouço celular com porosidade da ordem nanométrica. As células, nesse contexto, encontram-se em um ambiente tridimensional estruturalmente complexo, repleto de um conjunto de informações exclusivas para elas. Dessa forma, a mimetização destas condições *in vitro* é necessária para um maior entendimento das funções celulares, assim como a sua utilização na construção e reparo de órgãos e tecido doentes³⁴. Nesse sentido, as matrizes produzidas por *electrospinning* encaixam-se brilhantemente nesse contexto, pois são formados de diâmetros de fibras que podem ir de nanômetros a micrometros, possuindo grande área superficial e porosidade elevada⁴¹.

Outro importante questionamento em relação ao estudo das células-tronco, sanado pela utilização das nanofibras, é a via de aplicação adequada. O ideal, é que se propicie maior contato das células no tecido a ser regenerado, bem como a melhora da sua capacidade proliferativa no local certo da lesão, evitando que elas migrem para outras regiões, carregadas pela corrente circulatória. Para tanto, a utilização de biomateriais, colocado sob a área da lesão, permitiria um maior contato e interação dessas células com a lesão, bem como a sua liberação gradual e lenta o que poderia ser importante para regenerar o tecido lesado, como ocorre no defeito cutâneo⁵⁰.

A literatura científica relata uma grande variedade de células que têm sido testadas sobre as matrizes produzidas pelo método de *electrospinning*. Entre elas, células-tronco mesenquimais e neurais, queratinócitos, cardiomiócitos, condrócitos, células musculares lisas, osteoblastos, células endoteliais, entre outras. Com isso, objetiva-se a regeneração de tecidos tais como pele, ossos, cartilagem, sistema nervoso, bem como coração, vasos sanguíneos e tecido pulmonar³²⁻³³.

2.7 – CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) representam uma parcela importante para a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos. Essas células podem ser facilmente isoladas, cultivadas e expandidas em laboratório, além de terem a grande vantagem de não serem imunogênicas⁵¹⁻⁵².

As CT são divididas basicamente em dois grandes grupos: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas.

Dentre as células-tronco adultas encontram-se as células-tronco mesenquimais (CTMs), que têm sido demonstradas em uma diversidade de tecidos fetais e adultos, incluindo a medula óssea, o sangue e o fígado fetal, o cordão umbilical, o cérebro, rins, pele e, em algumas circunstâncias, o sangue periférico do adulto⁵²⁻⁵⁵.

Essas células têm sido consideradas como células-tronco adultas multipotentes com grande plasticidade, ou seja, capazes de originar diversos tipos de tecidos⁵⁶⁻⁶⁰.

Em 2006, devido a uma falta de regulamentação, a Sociedade Internacional de Terapia Celular sugeriu 3 propriedades que devem ser comprovadas para que as células possam ser designadas como CTMs: (1) proliferação como células aderentes; (2) imunofenótipo característico e (3) capacidade de diferenciação *in vitro* em células como os osteoblastos, adipócitos e condroblastos⁶¹.

2.8 – MATRIZES DE POLI-D,L-ÁCIDO LÁCTICO (PDLA) COM CÉLULAS-TRONCO PARA PROMOVER A REGENERAÇÃO DE PELE

A pele, um órgão que serve como uma barreira física ao ambiente externo, é formado principalmente pela epiderme e derme^{1, 62-63}.

A epiderme é rica em queratinócitos, responsáveis pela produção de queratina². Nela também estão os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel, entre outras estruturas⁶⁴⁻⁶⁵.

A derme encontra-se diretamente abaixo da epiderme e é composta por colágeno e quantidades menores de elastina e glicosaminoglicanos. Essa camada também contém um complexo arranjo de plexos capilares e venosos, sendo responsável, dessa forma, pelo suporte mecânico e pela nutrição da epiderme⁶²⁻⁶³. As estruturas anexas, como os folículos capilares e as glândulas sudoríparas e sebáceas possuem sua origem nessa camada^{1, 62-63}.

Devido ao fato de a pele atuar como uma barreira protetora do nosso organismo ao mundo externo, qualquer lesão a ela causada deve ser rápida e eficientemente reparada. A maioria das lesões na pele é curada rapidamente, em uma ou duas semanas. Entretanto, o resultado final nem sempre é estético e funcionalmente perfeito, restando uma cicatriz de tecido conjuntivo no local onde as fibras de colágeno foram destruídas. Além disso, as estruturas anexas perdidas não são mais regeneradas ^{1, 62}.

O tratamento disponível para vítimas de queimaduras graves muitas vezes mostra-se ineficaz, resultando em formação de grandes cicatrizes e impossibilidade de movimentos na pessoa afetada ³.

Além disso, quanto maior a profundidade da lesão, maior o seu efeito sobre a cicatrização. Em queimaduras profundas, danos à derme envolvem a desnaturação de colágeno, que então precisa ser retirado para que nova re-epitelização ocorra. Esse processo é feito através de degradação enzimática e fagocitose, aumentando a resposta inflamatória. Logo, a cura leva um tempo maior. A inflamação inicia uma cascata de eventos, com leucócitos polimorfonucleares sendo atraídos para o local, ocasionando proteólise e fagocitose. Os macrófagos ativados pelos polimorfonucleares também liberam citocinas, recrutando fibroblastos para iniciar o processo de reposição do colágeno perdido. Os fibroblastos envolvidos no reparo do tecido possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de colágeno, porém não possuem a capacidade de organizar essas fibras de colágeno. O resultado final do reparo da derme é a deposição de colágeno desorganizada, o que fisicamente aparece como uma cicatrização tecidual ¹.

Dessa forma, a regeneração de pele é um importante campo para a engenharia tecidual ³⁻⁴. Principalmente nas grandes queimaduras e feridas crônicas, os tratamentos disponíveis são insuficientes para prevenir a formação de cicatrizes e promover a cura do paciente ⁴⁻⁵.

Estudos de Dai e colaboradores mostraram que CTMs contribuíram significativamente para a regeneração epitelial em modelo animal, sugerindo ser essa uma fonte ideal de células para a regeneração de epiderme, incluindo nos casos de queimaduras ⁶⁶.

O polímero usado nesse estudo, o Poli—D,L- ácido láctico (PDLLA) (Figura 2), é um polímero biodegradável e biocompatível, de estrutura semicristalina, com massa molecular que varia de 75.000 a 120.000, temperatura de transição vítrea de aproximadamente 50°C e temperatura de fusão de 262 °C ⁶⁷⁻⁶⁸. Esse polímero degrada-se hidroliticamente via erosão de massa e o subproduto ácido láctico é fisiologicamente removido através de vias metabólicas

Já foi demonstrado anteriormente que o PDLLA, sozinho ou em compósito, suporta o crescimento de osteoblastos, condrócitos e células de carcinoma pulmonar²⁴⁻²⁷.

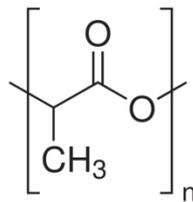


Figura 2: Ilustração da estrutura do polímero Poli-D,L-ácido láctico.

Sabe-se que a pele é um dos órgãos que mais rapidamente se recupera. Nas grandes perdas cutâneas, a pele necessita de cerca de um mês para alcançar uma estrutura superficial e em até um ano já está novamente com aproximadamente 80% de sua resistência mecânica⁶⁹. Dessa forma, para o desenvolvimento do presente trabalho, necessitava-se de um polímero adequado a esse tempo de regeneração. Logo, por ter uma estrutura amorfa, o PDLLA possui um tempo de degradação mais curto, o que possibilita a sua utilização como um biomaterial para regeneração de pele, propiciando estruturação e barreira física necessária nos períodos iniciais de recuperação da pele lesada^{1,37}.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Desenvolver um substituto tecidual para o tratamento de um defeito cutâneo total (simulando uma queimadura de 3º grau), através do estudo do uso de polímeros para a construção de nanofibras (com e sem a biomassa da *Spirulina*) e de suas propriedades físico-químicas e biológicas.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, cultivar e caracterizar as células obtidas de rim de camundongo como células-tronco mesenquimais;
- Desenvolver matrizes com fibras nanométricas de Poli-D,L-Láctico;
- Construir um novo biomaterial com a incorporação da microalga *Spirulina* a servir como base para a engenharia de tecidos;

- Determinar as propriedades físico-químicas dos biomateriais desenvolvidos tais como morfologia, diâmetro das fibras, rugosidade, ângulo de contato, teor residual de solventes, entre outros dos biomateriais desenvolvidos;
- Determinar a interação dos biomateriais produzidos com as células-tronco mesenquimais através de análises biológicas como adesão, proliferação e citotoxicidade.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 – OBTENÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA *SPIRULINA*:

A microalga utilizada neste estudo foi a *Spirulina* LEB 18 (*Arthrospira* LEB 18) isolada da Lagoa Mangueira no sul do Brasil, localizada entre o Oceano Atlântico e a Lagoa Mirim.

Essa microalga foi cultivada em uma planta piloto localizada nas bordas do Lagoa Mangueira em biorreatores com capacidade de 10.000 L. A biomassa foi coletada utilizando filtro de 200 µm, concentrada em uma prensa hidráulica e, subsequentemente, extrudido. Após a extrusão, a biomassa foi submetida a secagem a 50 ° C durante 4 h em bandeja secadora sob vácuo, embalada e armazenada. A biomassa final apresentou a seguinte composição: 6,7% de cinzas, 0,19% de lipídios, 5,3% de umidade e 86% de proteína.

4.2 – PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS:

A solução polimérica constituída de PDLLA (PM 75.000 – 120.000) (Sigma-Aldrich®) foi produzida numa concentração de 7 % (m/m), utilizando o solvente 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma-Aldrich®). Já a solução PDLLA/*Spirulina* (PDLLA/*Sp*) foi preparada a 8% (m/m) de PDLLA em HFIP, acrescido de 2% da biomassa de *Spirulina*. Essa microalga foi cultivada pelo grupo no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Brasil ⁴⁷.

Ambas as soluções foram deixadas 24 horas sob agitação à temperatura ambiente e mantidas sob refrigeração até o momento de uso.

4.3 – PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING*

A construção de biomateriais (matrizes) de nanofibras poliméricas biodegradáveis para os testes descritos foi realizada pelo método de *electrospinning*. A respectiva solução polimérica foi posicionada entre eletrodos, os quais foram ligados a uma alta tensão. A tensão

utilizada para a solução de PDLLA foi de 20 kV, utilizando agulha de diâmetro interno de 0,45 mm e vazão de 1,88 mL/h e para a solução de PDLLA/*Sp* foi de 15 kV, com agulha de diâmetro interno de 0,60 mm, com vazão de 2 mL/h. A distância entre a agulha e a placa coletora, para ambas as soluções, foi de 15 cm. Todas as matrizes foram esterilizadas com banho de luz com lâmpada ultravioleta por 2 horas, em placas de cultivo de 24 poços, dentro de uma capela de fluxo laminar vertical.

4.4 – OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS:

4.4.1 - Obtenção de Células de Rim de Camundongos:

Para a extração das células do rim, utilizadas nos testes biológicos, camundongos adultos da linhagem C57/B16N foram anestesiados e sacrificados mediante deslocamento cervical. Os rins foram extraídos, cortados e, após, lavados com solução tampão de fosfato (PBS), foram deixados em contato com colagenase do tipo I (Gibco®) para liberação das células por 60 min à 37°C. Decorrido o tempo necessário, as células foram lavadas e centrifugadas a $400 \times g$ por 10 min e suspensas em placas de cultivo de 6 poços⁷⁰.

Todo o procedimento foi realizado após a autorização do Comitê de Ética (Aprovado no CEP da UFRGS em 24 de junho de 2010, sob o número 14.715).

4.4.2 - Cultura de Células-tronco Mesenquimais (CTMs) a partir de rim de camundongo C57/B16N:

Para iniciar o cultivo, as células foram cultivadas em placas de cultura e estas mantidas em incubadora umidificada a 5% CO₂ e 37°C por 72 h, quando as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas subsequentes foram realizadas a cada 3 a 4 dias.

Para a proliferação de células aderentes, as células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich®) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Gibco®) e 0,45 µg/mL de gentamicina.

Ao atingirem cerca de 90% de confluência, as culturas primárias foram lavadas com PBS e, em seguida, uma solução de 0,25% de tripsina (Sigma-Aldrich®) foi adicionada à garrafa por aproximadamente 5 min a 37°C para soltar as células da superfície plástica. As células então foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas em novas garrafas para expansão. Passagens subsequentes foram realizadas de forma idêntica.

4.4.3 – Caracterização das Células- tronco Mesenquimais:

4.4.3.1 - Análise morfológica das culturas celulares:

A presença das células aderentes, assim como sua confluência foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Olympus.

4.4.3.2 - Análise imunofenotípica das células cultivadas:

A presença de marcadores de células mesenquimais e ausência de células hematopoéticas foi avaliada através de citometria de fluxo, usando-se o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences), para 3 fluorescências, equipado com laser de argônio para 488 nm e a análise foi realizada através do *software* CELLQuest (BD Biosciences). Para a avaliação da presença ou ausência de marcados, 10.000 eventos foram adquiridos.

Para as células de camundongo, foram utilizados os marcadores CD11b, CD49e, CD49d, CD45R, Sca-1 e CD90.2, marcados com o fluorocromo PE, todos da marca BD Biosciences. A presença das moléculas foi avaliada utilizando-se 5 µL de anticorpo monoclonal anti-camundongo para cada uma das moléculas.

Após a incubação das células com os anticorpos por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS e, em seguida, a aquisição dos eventos foi realizada.

4.4.3.3 - Diferenciação celular *in vitro*:

A diferenciação em tipos celulares mesenquimais, necessária para confirmação da identidade da população obtida, foi testada na quinta passagem. Ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados seguindo protocolos já descritos por Meirelles e Nardi⁷⁰.

4.4.3.3.1 - Diferenciação osteogênica:

Para a diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas por 3 a 4 semanas em meio contendo soro fetal bovino (10%), dexametasona (10^{-8} M), ácido ascórbico 2-fosfato (5 µg/ml) e β-glicerofosfato (10mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S em pH 4,2.

4.4.3.3.2 - Diferenciação adipogênica:

Para a diferenciação adipogênica das células de camundongo, as mesmas foram cultivadas por 3 a 4 semanas em meio contendo 10% de soro fetal bovino, dexametasona (10^{-8} M), e insulina (5 µg/ml).

4.4.3.3.3 - Diferenciação Condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células aderentes foram cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias. O meio é constituído de DMEM e suplementado com 15 mM HEPES, 6,25 µg/mL de insulina, 10 ng/mL TGF-β1 e 50 nM da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). O meio foi trocado a cada 3-4 dias e as células foram fixadas no dia 21, com 4% paraformaldeído. A condrogênese foi demonstrada pela coloração com *Alcian Blue*.

4.5 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS:

Para todos os testes descritos a seguir, foram analisadas matrizes de PDLLA e de PDLLA/*Sp*.

4.5.1 - Morfologia:

A morfologia das matrizes de nanofibras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) modelo JOEL - JSM 6060, com voltagem de aceleração de 10 kV.

Para isso, as nanofibras 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 retiradas em diversos aumentos.

4.5.2 - Diâmetro das Fibras:

Após a microscopia eletrônica de varredura, realizada conforme descrita no item anterior, os diâmetros das fibras poliméricas foram avaliados através de leitura de 30 fibras, em 3 diferentes campos da mesma amostra, em triplicata, resultando em 270 fibras analisadas, por amostra, através do software ImageJ.

4.5.3 – Ângulo de Contato:

A análise de ângulo de contato foi realizada em 5 amostras de cada tipo de biomaterial (PDLLA e PDLLA/*Sp*). Para isso, uma gota de água (aproximadamente 10 µL) foi instilada sobre a superfície da matriz, previamente afixada em lamínulas de vidro, com o auxílio de uma seringa e, em seguida, uma foto foi feita, em 3 diferentes tempos: 30 segundos, 1 e 2 minutos. Utilizando-se o *software* Surftens 3.0, no mínimo 3 medidas de cada foto foram realizadas, através da utilização de 5 pontos de medida dispostos ao redor da gota. O resultado foi obtido pela média das medidas e apresentado como média±desvio padrão.

4.5.4 - Teor de Solvente Residual:

O teor de solvente foi avaliado através da análise termogravimétrica (TGA). As amostras (matriz de PDLLA, matriz de PDLLA/*Sp* e biomassa de *Spirulina*) foram submetidas à temperatura de 25°C durante 5 minutos em atmosfera de nitrogênio, em seguida, seguiu-se um programa de aquecimento de 20°C/min, na faixa de temperatura compreendida entre 25 a 750°C e após, 70°C/min até 800°C. Utilizou-se aproximadamente 10-12 mg de cada amostra para as análises. As mesmas foram realizadas em triplicata. O equipamento utilizado foi o SDT Q600 – DSC – TGA simultâneo (TA Instruments) no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica – LAMAT da UFRGS.

4.5.5 - Degradabilidade:

Amostras das matrizes foram deixadas sob agitação a 130 rpm à 37°C em PBS 1X durante períodos de 0 (matriz não submetida ao teste de degradabilidade), 7, 14, 30 e 60 dias, com trocas da solução a cada 3-4 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Após esses períodos, os biomateriais foram secados em calor seco a 37°C e, em seguida, realizadas a determinação da massa molecular ponderal (Mw) do polímero através da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) em um Viscotek VE 2001, equipado com detector de índice de refração e calibrado com padrões de poliestireno. Para as análises, no mínimo, 10 mg de cada amostra foram dissolvidas em 2 mL de tetrahydrofurano (THF) e filtradas antes de ser injetada no equipamento. Para as matrizes de PDLLA/*Sp*, uma coluna cromatográfica foi realizada antes das análises em GPC, utilizando-se sílica gel (Sigma-Aldrich®) como fase sólida e THF como fase líquida.

As análises foram realizadas em 3 amostras diferentes para cada período de incubação e os resultados apresentadas através do cálculo da média dos dados obtidos.

4.5.6 – Verificação da Incorporação da Biomassa de *Spirulina* nos Scaffolds de PDLLA/*Sp*:

A verificação da incorporação da biomassa de *Spirulina* nos *scaffolds* de PDLLA/*Sp* foi realizada através das determinação do perfil de emissão de fluorescência das matrizes de PDLLA e PDLLA/*Sp* e da biomassa de *Spirulina* pura. Para isso, foram realizadas varreduras em diversos comprimentos de onda (λ), de 410 a 700 nm, utilizando o laser de 403 nm. Dessa forma, iniciou-se a determinação pela verificação do perfil de emissão de fluorescência da biomassa de *Spirulina*, onde se estabeleceram os parâmetros de análise, que foram posteriormente aplicados para as matrizes de PDLLA e PDLLA/*Sp*. As análises foram realizadas em microscópio confocal Olympus FV1000.

4.5.7 – Rugosidade:

A topografia e a rugosidade média central da superfície, Ra, determinada usando um *software* (Nano Scope® Scanning Probe Microscope Controller - Digital Instruments) foram obtidas para especificar a rugosidade da superfície das matrizes de nanofibras, através da técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA). Para isso, dois diferentes locais (50 $\mu\text{m}^2/\text{área}$) na superfície de três diferentes amostras de cada matriz foram analisadas no modo *tapping*.

4.6 – PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS:

Para a realização dos testes abaixo descritos, as matrizes poliméricas (PDLLA e PDLLA/Sp) foram utilizadas afixadas em lamínulas de vidro com 1,5 cm de diâmetro. As lamínulas foram distribuídas em poços de placas de cultivos celulares de 24 poços e previamente esterilizadas por luz ultravioleta (524nm) por 120 minutos em capela de fluxo laminar.

4.6.1 - Adesividade Celular

A adesividade celular foi avaliada através de coloração histoquímica. Foram utilizadas 30.000 células por matriz e os grupos testes e controle (células semeadas diretamente sobre as placas de cultivo celular) foram avaliados em triplicata. A análise foi realizada nas células obtidas de rim de camundongo, tendo sido utilizadas 5 culturas primárias diferentes. No experimento, as células integradas às matrizes celulares foram coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), um marcador de núcleo celular, após 6 horas de semeadura nos *scaffolds*. Decorridas as 6 horas de experimento, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% e coradas com DAPI 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS por 1 minuto. Após diversas lavagens com PBS 1X, para a retirada do excesso de corante, foram realizadas fotografias em 9 pontos aleatoriamente escolhidos em cada matriz com aumento de 400x. Depois de realizada a contagem do número das células nas fotografias, a média de células por tipo de matriz foi avaliada e o resultado expresso como média de células por aumento de 400x para cada grupo.

4.6.2 – Avaliação de Células Metabolicamente Ativas nas Matrizes de Nanofibras

O método do sal de tretazolium (MTT) é amplamente utilizado para verificar a viabilidade e/ou o estado metabólico das células ⁷¹. Dessa forma, o número de células metabolicamente ativas foi avaliado por esse ensaio colorimétrico (Sigma-Aldrich®), em triplicata, nos dias 1, 4, 7 e 14 após a semeadura das células nas matrizes poliméricas. Um

total de 45.000 células foi semeado por matriz em placas de 24 poços, tendo sido utilizadas cinco culturas primárias diferentes. Após decorrido o tempo de experimento, com trocas de meio a cada 3 a 4 dias, as células foram incubadas com 0,25ug/mL de MTT em tampão CMF, resultando em 400µL de solução por poço de cultivo, durante 2h. O tampão CMF é formado por sais de sódio e potássio, adicionado de glicose. Após a remoção do reagente, adicionou-se 400µL de dimelsulfóxido (DMSO) por poço para dissolver os cristais que se formaram, seguido de agitação por alguns instantes. A absorbância foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 560 nm e 630 nm. Para esse experimento, os grupos testes (PDLLA e PDLLA/Sp) e controle foram analisados. Os resultados foram calculados através da diferença entre os comprimentos de onda (560nm – 630nm) e expressos como valor médio de absorbância por grupo. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento Wallac EnVision (Perkin Elmer). Somente as células viáveis são capazes de reduzir o MTT, aumentando a absorbância da amostra.

4.6.3 – Citotoxicidade

A citotoxicidade celular foi avaliada através da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH), através do NADH formado pela ação enzimática, pelo método colorimétrico (Labtest). Nesse teste, o extravazamento da enzima citoplasmática LDH é medido e a sua presença no meio de cultura onde as células são cultivadas é indicativo de dano à membrana celular⁷². O aumento da dosagem dessa enzima aumenta com a morte celular. Para realização do teste, alíquotas do sobrenadante das culturas foram dosadas após 4, 7 e 14 dias de cultivo. Para isso, foram utilizados poços controles e poços testes. Os controles negativos foram as células aderidas diretamente nos poços. Os controles positivos foram os poços controles de morte celular total, nos quais as células foram cultivadas diretamente no poço e, no dia da dosagem, o Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) foi adicionado ao poço para obter uma concentração de 1% (v/v) a fim de se verificar a liberação máxima de LDH. Os poços testes compreendiam os poços contendo as células-tronco cultivadas sobre as matrizes de PDLLA e PDLLA/Sp. Para o teste de citotoxicidade, cinco culturas primárias diferentes foram utilizadas e, para cada cultura celular, as análises foram realizadas em triplicata. A leitura da absorbância foi realizada no Wallac EnVision (Perkin Elmer).

4.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes físico-químicos foram comparados utilizando teste *t de Student* para amostras não pareadas. Todas as avaliações biológicas foram comparadas usando One-Way ANOVA

seguido pelo *post hoc* Tukey. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células obtidas foram cultivadas e caracterizadas com sucesso. As células apresentaram morfologia tipo célula mesenquimal no cultivo *in vitro*, assim como, foram diferenciadas em adipócitos, condrócitos e osteócitos de maneira bem sucedida (Fig. 3).

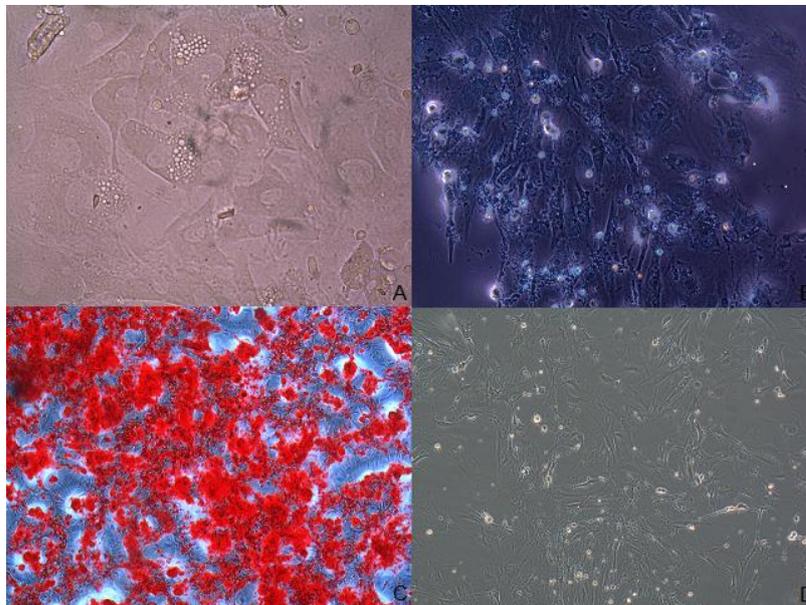


Figura 3: Diferenciação celular *in vitro* em 3 tipos celulares: (A) adipócitos, (B) condrócitos, (C) osteócitos e (D) grupo controle (não submetido à diferenciação).

Para corroborar a diferenciação *in vitro*, a análise imunofenotípica também mostrou positividade para um marcador típico de células-tronco mesenquimais, o CD90.2. Essas células foram negativas para marcadores não-mesenquimais, como o CD45R, o CD11b e o CD49e. Além disso, houve uma positividade parcial para Sca-1, o que está de acordo com achados anteriores⁷⁰.

5.2 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS

5.1.1 – Morfologia e diâmetro da fibra

Diversos parâmetros foram padronizados para obtenção das matrizes com fibras nanométricas, dentre eles: concentração polimérica, tendo sido testadas as concentrações de 4, 6, 7, 8, 10, 15 e 30% (m/m); solventes, como acetona, dimetilformamida, diclorometano, clorofórmio e HFIP, assim como misturas desses respectivos solventes; distância entre agulha e coletor metálico, sendo 10, 15, 20 e 25 cm, e; diferença de voltagem aplicada, partindo de 5 kV até 20 kV. Também foram avaliados os parâmetros ambientais, tais como umidade e temperatura. Diferentes concentrações da biomassa de *Spirulina* também foram testadas. Entretanto, devido ao aumento na viscosidade da solução polimérica causada pela adição dessa cianobactéria, 2% de adição foi a máxima concentração para obtenção de fibras.

Ambos os biomateriais apresentaram fibras bem formadas, aleatoriamente distribuídas, sem *beads* e com poros interconectados, tendo sido resultado da otimização de parâmetros do *electrospinning* durante este estudo. As fibras produzidas a partir de PDLLA mostraram um diâmetro médio de $276 \pm 65,9$ (163-581) nm (Figura 4A) e as matrizes fabricadas com PDLLA/*Sp* apresentaram um diâmetro médio de fibra de 263 ± 82 (91-576) nm (Figura 4B).

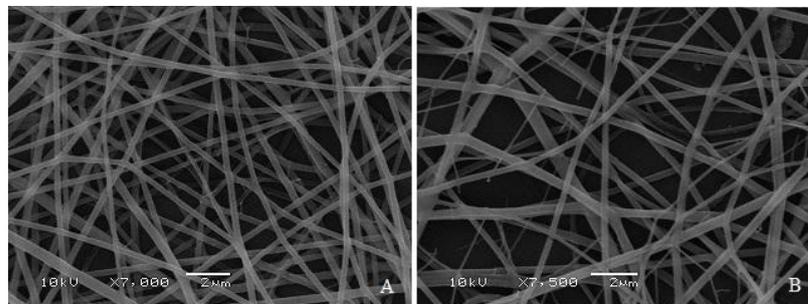


Figura 4: Morfologia do biomaterial avaliada por fotografias de MEV: A) PDLLA com ampliação de 7.000 x. B) PDLLA/*Sp* com ampliação de 7.500 x.

Como pode ser visto na Figura 5, ambas as matrizes apresentam fibras com diâmetros com ampla distribuição, variando de 91 a 576 nm para as fibras de PDLLA/*Sp* e de 163 a 581 nm para as fibras de PDLLA. O diâmetro das fibras, assim como sua distribuição, foram estatisticamente diferentes para os dois grupos testados ($p= 0,041$).

O diâmetro das fibras obtidas pela técnica de *electrospinning* é diretamente proporcional à concentração da solução polimérica, ou seja, quanto maior a concentração da solução, maior deveria ser o diâmetro da fibra. Dessa forma, esperava-se que as fibras de

PDLLA/*Sp* possuíssem um diâmetros de fibra maiores que as encontradas nas matrizes de PDLLA. Entretanto, como observado pela medida realizada no software ImageJ, as fibras onde a microalga foi incorporada apresentaram diâmetros menores. Logo, tal efeito foi atribuído à presença da microalga *Spirulina*.

Focando suas aplicações para a engenharia de tecidos, biomateriais de PDLLA e PDLLA/*Sp* foram desenvolvidos com o objetivo de mimetizar a MEC natural das células, propiciando, portanto, um ambiente ideal para a adesão e proliferação celulares. Para isso, fibras cujos diâmetros variam de 163 a 581 nm, nas matrizes de PDLLA, e de 91 a 576 nm, nas matrizes de PDLLA/*Sp*, foram obtidas. Essas nanofibras são semelhantes às fibras de colágeno na MEC, cujos diâmetros variam de 50 a 500 nm ⁷³.

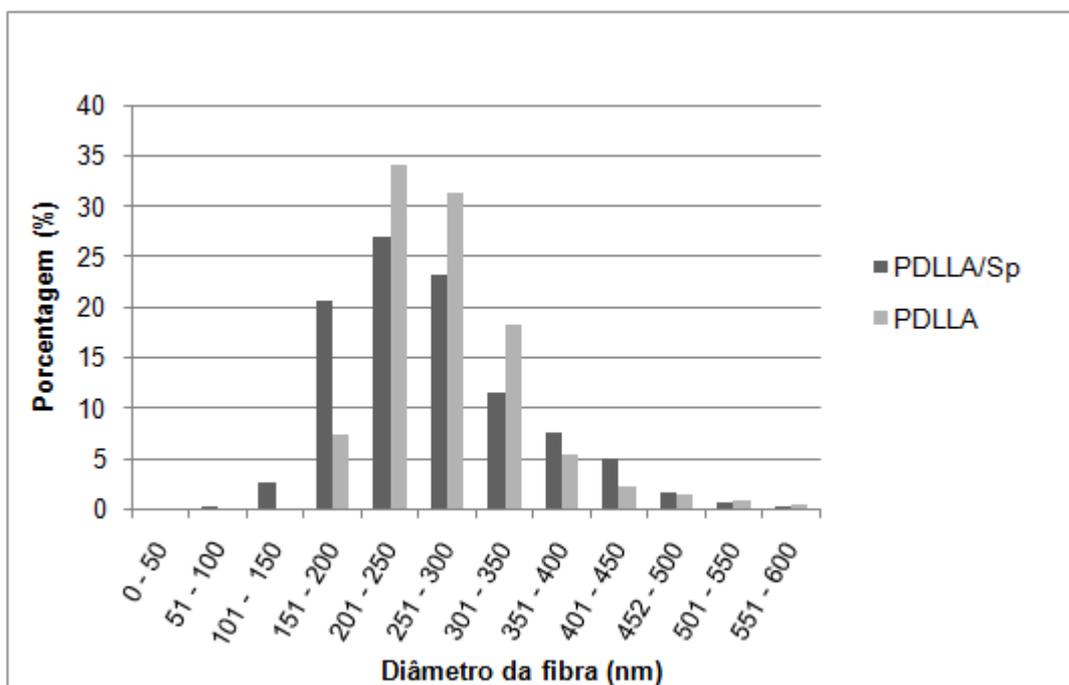


Figura 5: Demonstração da distribuição de diâmetros de fibras de ambas as matrizes utilizadas no estudo.

Além disso, embora haja diferença estatística entre os dois grupos de matrizes no presente estudo, não se pode considerá-la relevante fisiologicamente, pois ambos os diâmetros das fibras são próximos aos valores encontrados no nicho natural das células. Em relação ao tamanho dos poros, através da observação das fotos de MEV, é possível observar que os biomateriais produzidos têm uma alta porosidade e um grande número de poros interconectados. Dessa forma, além de permitirem um arranjo tridimensional, onde a célula preenche a estrutura da matriz, essa estrutura também permite o trânsito de moléculas pelo espaço extracelular, tais como nutrientes, fatores reguladores e produtos de degradação,

essenciais para a sobrevivência das células ⁷⁴. Se tal processo é impedido, a atividade metabólica do tecido é reduzida e surgem áreas de sofrimento celular e necrose. Dessa forma, a regeneração necessária no tecido lesado não é alcançada.

5.1.2 – Teor de solvente residual

O uso de solventes orgânicos, que são na sua maioria tóxicos para as células, levou à necessidade de verificação da ausência de solventes nas matrizes fabricadas. Neste tipo de experimento, perdas de massa em temperaturas abaixo de 200 ° C, normalmente referem-se à volatilização de solventes presentes na amostra, podendo ser água ou um solvente orgânico. Nenhum solvente orgânico foi usado para obter e analisar a biomassa da microalga *Spirulina*. Por outro lado, os biomateriais (PDLLA e PDLLA/*Sp*) haviam sido previamente tratados com HFIP para a produção de solução polimérica e *electrospinning* subsequentes.

Analisando os gráficos (Figura 8) obtidos com a metodologia de análise termogravimétrica, foi determinado que a primeira perda de peso nas matrizes de PDLLA, PDLLA/*Sp* e na biomassa de *Spirulina* foram 4,07, 7,66 e 10,21%, respectivamente. Esse achado deve ser diretamente relacionado com a perda do solvente ou umidade.

Além disso, as curvas das matrizes têm o mesmo perfil de decomposição, embora o percentual de cinzas na decomposição final tenha sido superior nas matrizes de PDLLA/*Sp* quando comparadas às matrizes de PDLLA, seguindo o perfil de decomposição da biomassa da *Spirulina*.

Como os resultados mostram, a primeira perda de massa, correspondente à presença de umidade ou solvente foi de cerca de 4,07, 7,66 e 10,21% para os grupos PDLLA, PDLLA/*Sp* e biomassa da *Spirulina*, respectivamente. Avaliando a matriz de PDLLA (a qual foi preparada apenas com o polímero e o solvente), foi observado que aproximadamente 0,4 mg de solvente e/ou umidade estavam presentes na matriz. Na literatura os limites de tolerância temporária de exposição (TEELs) para HFIP são 7,5 ppm ou 50 mg/m³ ⁷⁵⁻⁷⁶. Como nos experimentos contendo células foram utilizadas matrizes com 15 mm de diâmetro, pesando aproximadamente 0,5 mg e distribuídos em poços de placas de cultura com volume de 4,5 x 10⁻⁴ m³, a concentração calculada para tais condições foi de cerca de 45 mg/m³. Portanto, mesmo o solvente estando presente, a quantidade estaria dentro do estabelecido como limite de exposição temporária e, por isso, não seria prejudicial ao desenvolvimento das células, quando diluído em meio de cultura. O mesmo achado também é corroborado pelo desenvolvimento das células nos *scaffolds*. Caso os solventes estivessem causando toxicidade,

as células não continuariam se multiplicando semelhante ao controle, mas teriam apresentados valores de absorvância bem inferiores ao grupo controle.

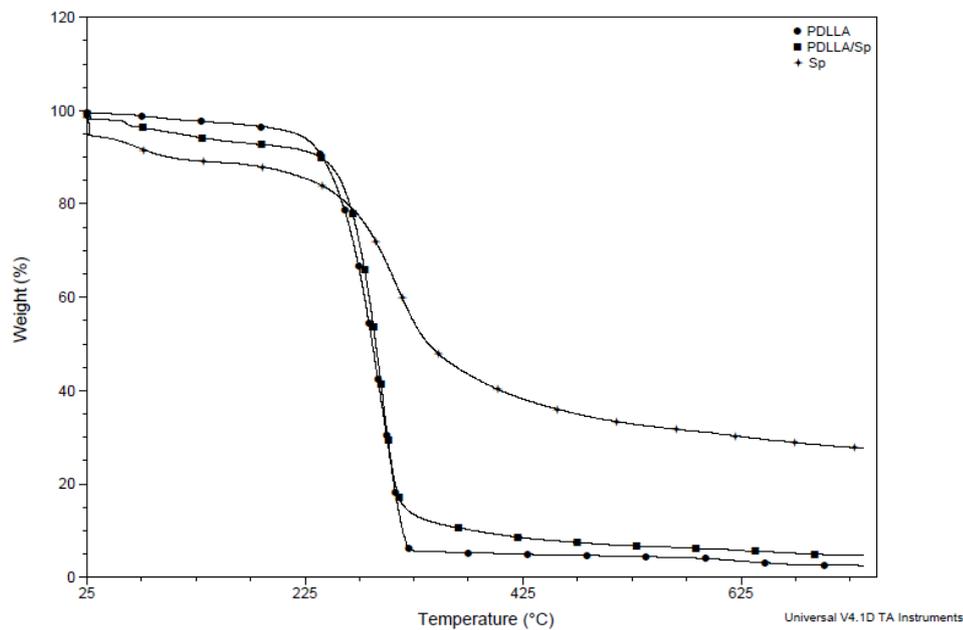


Figura 6: Gráfico da percentagem de perda de massa para as matrizes de PDLLA, PDLLA/Sp e para a biomassa de *Spirulina*.

5.1.3 – Degradabilidade

O sucesso de um biomaterial tridimensional depende de muitos parâmetros os quais variam desde uma escala macro até nanométrica. Por isso, para uma melhor adequação do biomaterial desenvolvido ao tecido que se pretende regenerar, diversas características físico-químicas precisam ser avaliadas. Dentre essas, estão o tempo de degradabilidade, a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, o teor residual de solventes, as propriedades mecânicas e de superfície.

A degradabilidade é um parâmetro estreitamente relacionado com a solubilidade dos materiais. Se a solubilidade for muito alta, os biomateriais serão reabsorvidos pelos fluidos do corpo muito rapidamente, sem que a regeneração dos tecidos acompanhe tal processo. No entanto, se a solubilidade for muito baixa, ele permanecerá por muito tempo no organismo e impedirá a regeneração tecidual adequada. Dessa forma, a degradabilidade está intimamente relacionada com a estabilidade do biomaterial *in vivo*. Assim, um tempo apropriado de degradação é extremamente importante para uma regeneração tecidual adequada⁷⁷, O ideal é que a taxa de degradação do biomaterial seja equivalente à taxa de regeneração do tecido.

Dessa forma, o biomaterial agiria como um suporte ao desenvolvimento do tecido, sem, ao mesmo tempo, atuar como um empecilho à regeneração do mesmo.

A degradabilidade foi medida em diferentes períodos, simulando as características fisiológicas do corpo humano, com utilização de temperatura de 37°C e solução salina com pH de aproximadamente 7,4. Como resultado, foi possível observar, através da Figura 7, que ambas as matrizes degradaram-se mais rapidamente nos primeiros sete dias de análise, com a degradação mais lenta após este período. Aproximadamente 50% do polímero foi degradado no prazo de 60 dias de experimento. Embora não haja diferença estatística entre os grupos ($p=0,534$), foi notável que as matrizes de PDLLA degradaram mais rápido que os de PDLLA/Sp. Além disso, há diferença estatística entre os diferentes períodos de degradação ($p<0,001$), o que mostra que ambos os biomateriais estavam perdendo partes das suas cadeias moleculares, ou seja, os mesmos estavam em um processo de degradação.

Outro fato analisado foi a massa molecular polimérica inicial de ambos os biomateriais. A matriz de PDLLA/Sp apresentou uma redução inicial nas suas cadeias poliméricas desde o dia 0 de análise. Uma hipótese para tal achado é que a presença da Spirulina pode estar acelerando esse processo, pela liberação de substância que atuariam como aceleradores hidrolíticos.

O polímero utilizado neste projeto, PDLLA, é um polímero biocompatível e biodegradável com estrutura amorfa ⁶⁷, o que lhe confere uma degradação relativamente rápida, essencial para utilização em regeneração de tecidos com rápida recuperação, como no caso da pele ⁷⁸. Já foi demonstrado, anteriormente, que o PDLLA, isoladamente ou em compósito, é um ótimo suporte para a proliferação celular ⁷⁸ e o mesmo já foi citado como um bom suporte ao crescimento de osteoblastos, condrócitos e de células de carcinoma de pulmão ²⁴⁻²⁷. Logo, uma vez que já foram demonstrados resultados satisfatórios desse polímero em relação à adesão e proliferação de diferentes tipos celulares, bem como devido sua rápida degradação, optou-se por sua utilização no desenvolvimento das matrizes de nanofibras a fim de serem utilizadas futuramente para a regeneração do tecido cutâneo.

Esses *scaffolds* são, portanto, bons candidatos para uso na medicina regenerativa porque, apesar de seu tempo de degradação rápido, propiciam tempo suficiente para a regeneração do tecido, quando se almeja a sua utilização em tecidos com regeneração rápida, como é o caso da pele humana.

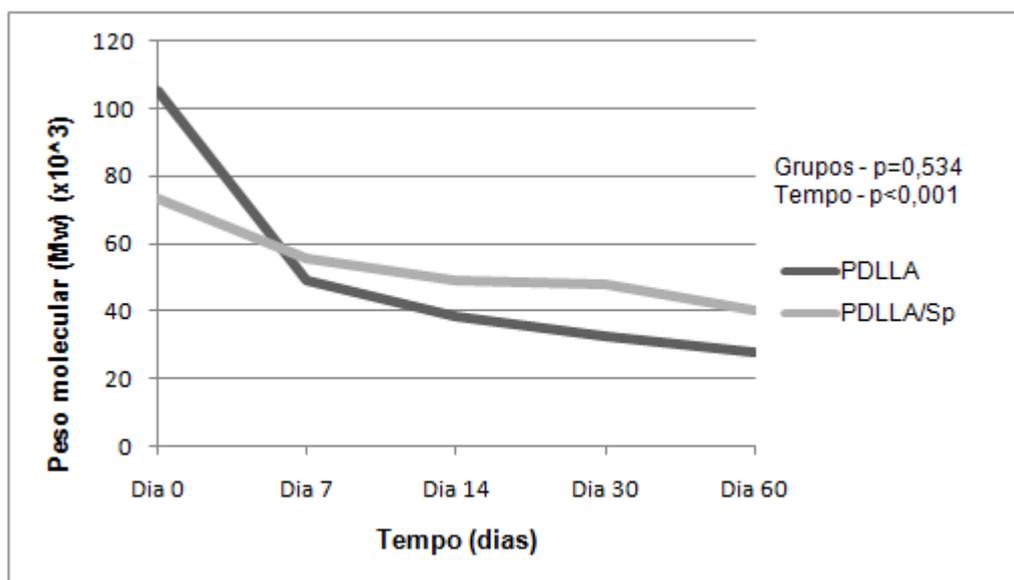


Figura 7: Gráfico da perda de massa molecular avaliados em diferentes períodos: 0 (não submetido ao processo de degradação), 7, 14, 30 e 60 dias.

5.1.4 – Verificação da incorporação da biomassa de *Spirulina* em scaffolds de PDLLA/Sp

A verificação da incorporação da biomassa de *Spirulina* em scaffolds de PDLLA/Sp foi realizada através da determinação do perfil de emissão de fluorescência nas matrizes de PDLLA e PDLLA/Sp e na biomassa pura da *Spirulina*. Para alcançar este objetivo varreduras foram realizadas em vários comprimentos de onda (λ), de 410-700 nm usando laser de 403 nm.

A presença de clorofila e de carotenos é responsável pelo perfil de fluorescência de *Spirulina*⁷⁹. Como resultado, a matriz de PDLLA/Sp mostrou o mesmo perfil de emissão de fluorescência obtidos para a biomassa de *Spirulina*, o que confirma a incorporação desta microalga em sua constituição. A matriz de PDLLA não apresentou emissão de fluorescência (Figura 8).

5.1.5 – Ângulo de Contato

O ângulo de contato analisado nas matrizes (Figura 9) foi medido em três momentos diferentes: 30, 60 e 120 segundos. Conforme mostrado na Figura 10, as duas matrizes têm um ângulo de contato com água de cerca de 140 ° em todos os pontos de análise, não havendo diferença estatística entre os grupos e o tempo de análise. Portanto, ambos os biomateriais são considerados como tendo características hidrofóbicas.

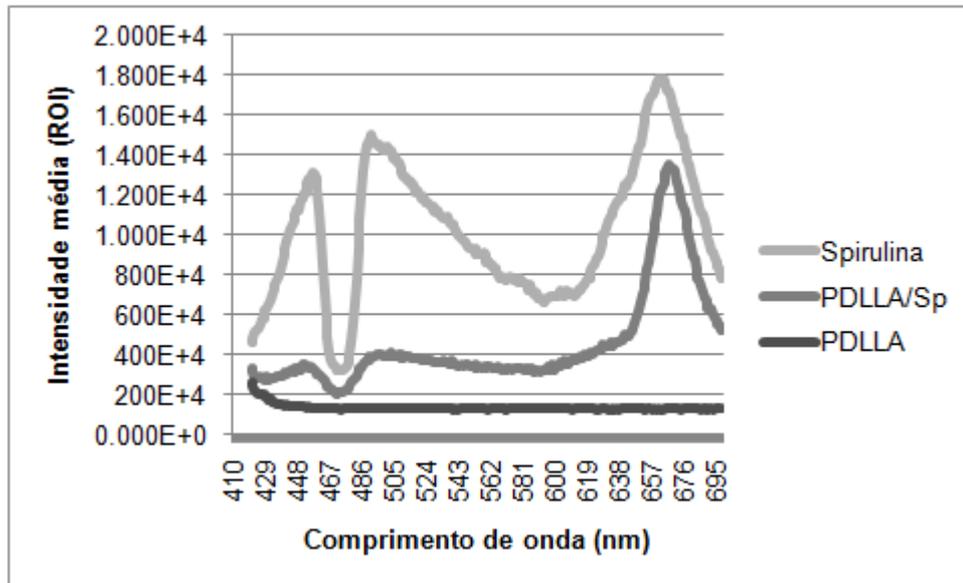


Figura 8: Gráfico do perfil de emissão de fluorescência dos *scaffolds* de PDLLA e PDLLA/Sp e da biomassa pura da *Spirulina*.

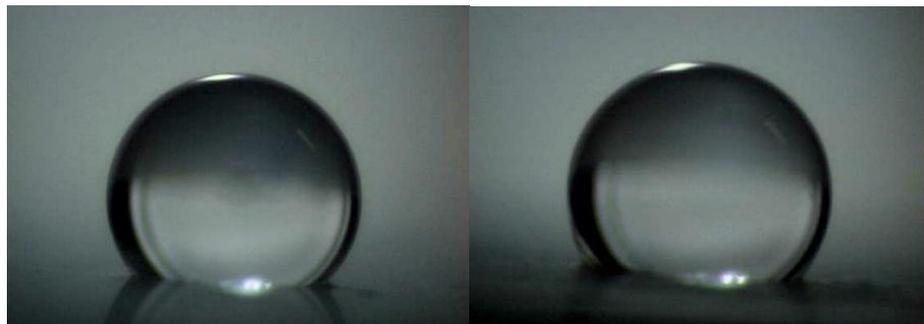


Figura 9: Fotografias de teste de ângulo de contato em matrizes de PDLLA e PDLLA/Sp, respectivamente.

5.1.6 – Rugosidade

A rugosidade média (Ra) obtida para a matriz de PDLLA foi de $413,1 \pm 68,9$ (289,9-493,8) nm (Fig. 11A), e os *scaffolds* feitos de PDLLA/Sp tiveram uma rugosidade média de $409,9 \pm 122,6$ (261,2-589,9) nm (Fig. 11B). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,960$).

Uma característica fundamental para a aplicação bem sucedida dos biomateriais na engenharia de tecidos é que os mesmos precisam promover a adesão celular. A adesão à matriz é fundamental para a sobrevivência das células, visto que a ausência de contato induz mecanismos relacionados com a morte celular programada⁸⁰⁻⁸¹. Essa interação é mediada principalmente pela adsorção de proteínas da MEC elaboradas pelas células na superfície das

matrizes. Em seguida, vias de sinalização são ativadas e a adesão celular ocorre nas matrizes por meio de receptores. Portanto, a acomodação e comportamento das células são fortemente afetadas pela estrutura dos biomateriais ⁸².

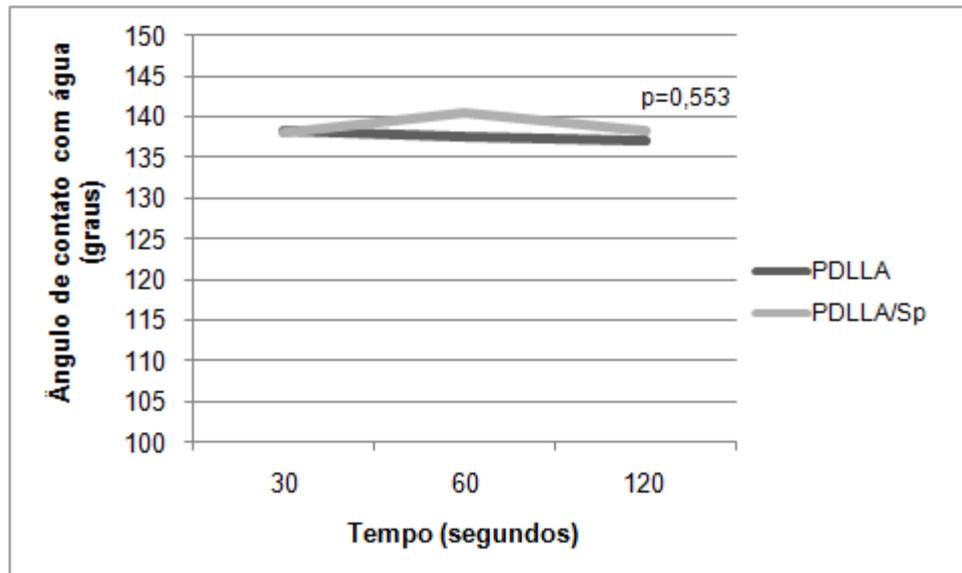


Figura 10: Gráfico de teste de ângulo de contato em três diferentes tempos: 30, 60 e 120 segundos.

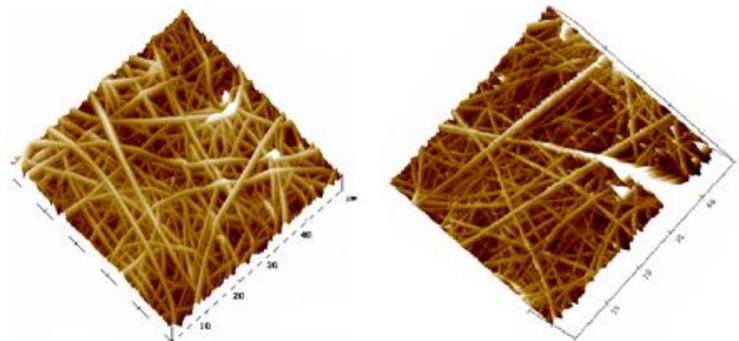


Figura 11: Imagens de MFA de matrizes de PDLLA e PDLLA/Sp, respectivamente.

Devido a esses fatores, a análise de rugosidade e de ângulo de contato com água foram realizados neste trabalho. A rugosidade influencia diretamente a adesão, a proliferação e a viabilidade celular ⁸³, enquanto o ângulo de contato com a água reflete a hidrofiliicidade da matriz e, conseqüentemente, a interação célula-matriz ⁸⁴. Como mostrado no presente trabalho, ambos os biomateriais têm altos valores de ângulo de contato com água e rugosidade. De acordo com a literatura, os resultados para a adesão celular em superfícies

não-estruturadas com rugosidade distintas permanecem variáveis, sendo dependentes do tipo de material e do tipo de célula. Até os dias atuais, ainda não existe um perfil disponível para interpretar os resultados obtidos devido ao efeito da rugosidade do biomaterial aplicável a todos os tipos celulares e biomateriais, de modo que seja possível determinar qual é o melhor valor para esta propriedade ⁸³. Em relação ao ângulo de contato, vários estudos já demonstraram que as características mais hidrofílicas resultam em maior adesão e proliferação ⁸⁵⁻⁸⁷. Embora o teste de ângulo de contato seja o teste considerado o padrão ouro para a análise de ângulo de contato, surpreendentemente, as matrizes de PDLLA/*Sp* possuíam o mesmo valor de ângulo de contato com água, quando comparado com o valor obtido a partir das matrizes produzidas somente com polímero. Quando o teste foi realizado avaliando-se o contato com o meio de cultura celular ou com líquidos biológicos, sempre foi possível perceber, a olho nú, uma maior e mais rápida molhabilidade do grupo de matrizes com a *Spirulina* incorporada, quando comparada com as matrizes de PDLLA sozinho. Esse resultado pode ser atribuído à interferência do ar na análise. Visto que o ar possui características hidrofóbicas e que as matrizes produzidas possuem estrutura altamente porosa. Dessa forma, análises de filmes poderiam resultar em resultados mais verídicos da interação do scaffold com as células.

5.3 – PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS:

5.3.1 – Adesividade Celular

O ensaio de adesão mostrou que as células aderem mais nas matrizes de PDLLA/*Sp* quando comparadas com as de PDLLA ($p=0,028$). Esses dois grupos são estatisticamente diferentes entre si, mas ambos são semelhantes ao grupo controle (Figura 12).

5.3.2 – Avaliação de Células Metabolicamente Ativas nas Matrizes de Nanofibras

Em relação ao ensaio de viabilidade, em três pontos de medição - dia 1, dia 4 e dia 14 - não houve diferença estatística entre os grupos. No dia 7, a quantidade de células metabolicamente ativas no biomaterial de PDLLA foi estatisticamente menor que a do grupo controle ($p=0,014$). No mesmo dia de análise, o número de células viáveis na matriz de PDLLA/*Sp* foi semelhante ao controle ($p=0,144$) e ao grupo PDLLA ($p=0,411$) (Figura 13).

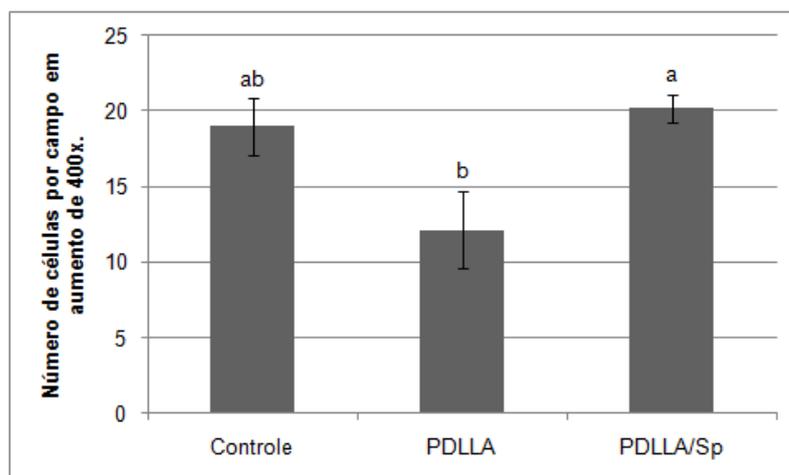


Figura 12: Ensaio de adesão de 5 diferentes culturas de células-tronco mesenquimais de rins de camundongos.

5.3.3 – Citotoxicidade

Em relação à dosagem de LDH nas culturas, nos dias 4 e 14 de análise, as matrizes de PDLLA e PDLLA/Sp foram semelhantes ao controle e todos eles foram estatisticamente diferentes do grupo Triton ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente para os dias 4 e 14 de análise), que representa a liberação máxima de LDH (controle positivo) (Figura 14). No Dia 7, não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,205$), embora a dosagem de LDH tenha sido muito maior no grupo Triton.

No que diz respeito aos ensaios celulares, as células-tronco mesenquimais obtidas a partir de rins de camundongos foram utilizadas. Essas células foram selecionadas devido a perspectivas futuras que envolvem a utilização das mesmas, juntamente com esse biomaterial desenvolvido, em defeitos de pele em camundongos com modelo de queimadura de terceiro grau. Por isso, antes de submeter os animais ao tratamento com os novos biomateriais cultivados com células foi realizada a caracterização *in vitro* da interação dessas células com as matrizes desenvolvidas, através de ensaios de adesão, viabilidade e citotoxicidade. Outro fato relevante é a questão da imunogenicidade. Embora as células-tronco mesenquimais adultas sejam conhecidas pelo seu baixo potencial em causar reações imunes⁵¹⁻⁵², optou-se pela utilização de células-tronco provenientes da mesma espécie de animais isogênicos que serão futuramente testados. Dessa forma, evita-se qualquer possibilidade de possível rejeição do biomaterial em associação com as células, quando do implante dos biomateriais nos animais com modelo de queimadura de 3º grau.

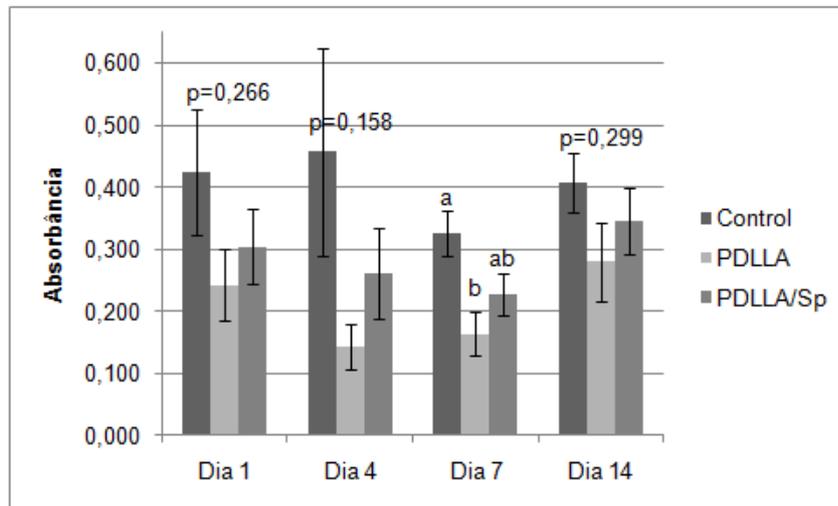


Figura 13: Teste de viabilidade celular de células-tronco mesenquimais de rins de camundongos nos dias 1, 4, 7 e 14.

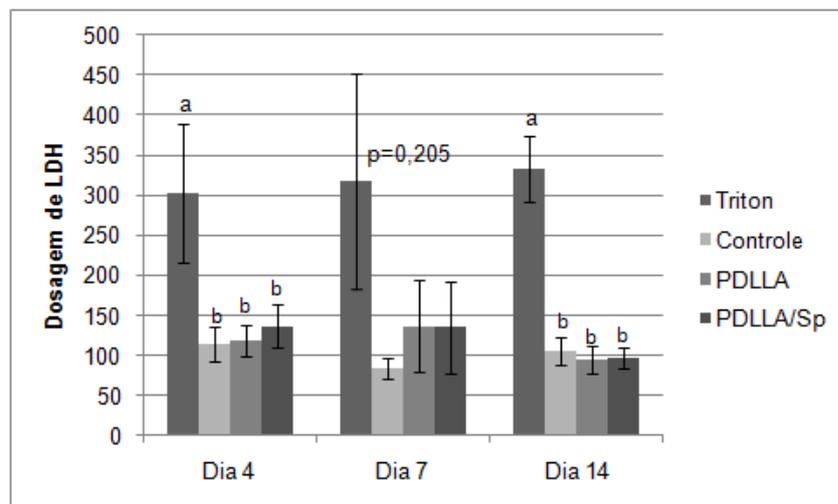


Figura 14: Dosagem de LDH no sobrenadante de 5 diferentes culturas de células-tronco mesenquimais de rins de camundongos nos dias 4, 7 e 14.

As espécies de *Spirulina* contém quantidade significativa de importantes proteínas, como ficocianina e aloficocianina, além de serem fontes de pelo menos nove aminoácidos essenciais, vitaminas B e E, betacaroteno, substâncias minerais (ferro, magnésio, zinco, etc.), ácidos graxos essenciais, como o ácido linoléico (AL) e o gama-linolênico (AGL), polissacarídeos, glicolípídeos e sulfolípídeos. Na sua estrutura, também está presente o pigmento clorofila, responsável pela cor verde de sua biomassa^{21, 23}.

Estudos em modelos animais demonstraram que a ficocianina da *Spirulina* estimula a hematopoese e a eritropoese, especialmente através da indução do hormônio eritropoetina. Há também evidências de que a c-ficocianina e polissacarídeos dessa microalga tenham aumentado a produção de glóbulos brancos em camundongos, hamsters, perus, gatos e peixes. Este aumento foi atribuído não somente ao estimular o sistema imune desses animais, mas a uma melhora na habilidade do organismo em gerar novas células sanguíneas, com aumento das funções da medula óssea, das glândulas tímicas e do baço^{21-22, 88-89}. Em outro estudo realizado, cosméticos contendo a microalga *Spirulina* e seus hidrolisados enzimáticos mostraram ser capazes de promover o metabolismo cutâneo e reduzir a formação de cicatrizes²¹.

Ao comparar os resultados obtidos para a adesão e a viabilidade celular, um importante dado é o fato de que as matrizes de nanofibras não interferiram na viabilidade e consequente proliferação das células, uma vez que o comportamento celular nos biomateriais foi semelhante ao grupo controle. Outra observação importante é que as células aderem mais e têm maior viabilidade quando a microalga *Spirulina* é incorporada à matriz, mesmo quando não há diferença estatística entre os *scaffolds* de PDLLA e PDLLA/Sp. Como todos os parâmetros físico-químicos são semelhantes entre as duas matrizes, com exceção ao diâmetro das fibras, essa diferença só pode ser atribuída à presença da microalga.

Portanto, uma hipótese sobre tal diferença seria a possibilidade de que uma pequena quantidade dos produtos bioativos da *Spirulina* esteja sendo liberada dos biomateriais. Dessa forma, esse evento poderia estar produzindo atividade biológica, o que, em última instância, estaria influenciando o metabolismo celular. No entanto, apesar do fato que maior viabilidade celular foi observada quando as matrizes com a incorporação da *Spirulina* foram utilizadas, a quantidade de substâncias bioativas liberadas provavelmente não parece suficiente para produzir uma melhoria significativa na quantidade de células metabolicamente ativas, visto que não foi suficiente para que uma diferença estatística fosse observada. Talvez se a análise fosse realizada por mais tempo ou mesmo na sua utilização *in vivo* - onde a degradação do polímero é mais rápida - a quantidade de substância bioativas seria maior, resultando em um efeito mais pronunciado. Entretanto, nada pode-se afirmar categoricamente nesse sentido devido a pouca literatura na área e à falta de análises que busquem identificar tais substâncias.

Embora essa microalga seja amplamente utilizada ao redor do mundo e também seja aprovada pelo *FDA*, criou-se um questionamento se o processo para obter tais matrizes poderia ser prejudicial para a microalga, resultando na geração de alguns metabólitos prejudiciais para as células. Para avaliar essa influência, o potencial citotóxico dos *scaffolds*

de PDLLA/*Sp* foi verificado. Em dois momentos de análises - dias 1 e 14 - os resultados da citotoxicidade das matrizes de PDLLA e PDLLA/*Sp* foram semelhantes ao grupo controle e diferentes do grupo Triton. Somente no dia 7 não houve diferença estatística entre todos os grupos, embora o grupo Triton tenha apresentado o maior valor de liberação da enzima LDH, quando comparado aos outros grupos, como pode ser observado na figura 14. Com relação a esse fato, quando cada amostra foi analisada separadamente, houve diferença estatística entre o grupo Triton e os outros grupos, em todas as culturas celulares utilizadas. O resultado do dia 7 foi, portanto, atribuído ao erro padrão, que, devido ao agrupamento das amostras, foi significativo. Por isso é possível afirmar que ambas as matrizes não possuem potencial citotóxico.

Dessa forma, espera-se utilizar esses novos biomateriais desenvolvido através de nanotecnologia em associação com células-tronco em modelos animais de queimaduras graves. Há também a intenção de verificar se a microalga *Spirulina* e seus compostos poderiam estimular e a regeneração da lesão nesses animais quando comparados com animais tratados com biomaterial produzido somente com polímero.

6 – CONCLUSÃO

As células utilizadas no trabalho foram isoladas de rim de camundongos, cultivadas e caracterizadas como células-tronco mesenquimais. Os biomateriais desenvolvidos foram caracterizados quanto a parâmetros físico-químicos e biológicos. Neste estudo, ambas as matrizes demonstraram estrutura fibrosa e porosa semelhante à MEC natural das células e, portanto, mostraram características adequadas para a cultura de células. Essas matrizes mostraram-se seguras para o uso clínico, devido à presença mínima de solventes orgânicos. As mesmas também se mostraram apropriadas para uso em tecidos com regeneração relativamente rápida, devido ao tempo mínimo de degradação. Com relação às propriedades biológicas, ambas as matrizes tiveram características semelhantes ao grupo controle. Além disso, o uso de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis com a agregação das propriedades da microalga *Spirulina* foi realizado, conduzindo a uma melhora na adesão e viabilidade das células-tronco utilizadas quando comparada somente ao biomaterial de PDLLA. Portanto, pode-se concluir que as matrizes desenvolvidas pelo presente trabalho têm as características adequadas para serem usadas como um novo biomaterial para uso na engenharia de tecidos. Trabalhos futuros demonstrarão se a hipótese de que a incorporação da microalga *Spirulina* pode contribuir com uma melhora na regeneração tecidual em modelo animal, quando comparada a um biomaterial produzido somente com polímero.

Com isso, espera-se desenvolver um substituto cutâneo nacional para ser usado em pacientes queimados.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burd, A.; Ayyappan, T.; Huang, L., Cord Blood: Opportunities and Challenges for the Reconstructive Surgeon. In *Frontiers of Cord Blood Science.*, 1st ed.; Bhattacharya, N.; Stubblefield, P., Eds. Springer: 2009; Vol. 24, pp 273-287.
2. Leite, F., Apagão traz risco de queimaduras. *Folha de São Paulo* 05/20/2001, 2001.
3. Fujimori, Y.; Ueda, K.; Fumimoto, H.; Kubo, K.; Kuroyanagi, Y., Skin regeneration for children with burn scar contracture using autologous cultured dermal substitutes and superthin auto-skin grafts: preliminary clinical study. *Ann Plast Surg* **2006**, 57, (4), 408-14.
4. Middelkoop, E.; van den Bogaerdt, A. J.; Lamme, E. N.; Hoekstra, M. J.; Brandsma, K.; Ulrich, M. M., Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials* **2004**, 25, (9), 1559-67.
5. Yamaguchi, R.; Takami, Y.; Yamaguchi, Y.; Shimazaki, S., Bone marrow-derived myofibroblasts recruited to the upper dermis appear beneath regenerating epidermis after deep dermal burn injury. *Wound Repair Regen* **2007**, 15, (1), 87-93.
6. Metcalfe, A. D.; Ferguson, M. W., Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface* **2007**, 4, (14), 413-37.
7. Atiyeh, B. S.; Gunn, S. W.; Hayek, S. N., State of the art in burn treatment. *World J Surg* **2005**, 29, (2), 131-48.
8. Brohem, C. A.; Cardeal, L. B.; Tiago, M.; Soengas, M. S.; Barros, S. B.; Maria-Engler, S. S., Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res* **2011**, 24, (1), 35-50.
9. Yoeruek, E.; Bayyoud, T.; Maurus, C.; Hofmann, J.; Spitzer, M. S.; Bartz-Schmidt, K. U.; Szurman, P., Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta Ophthalmol* **2011**.
10. Venugopal, J. R.; Prabhakaran, M. P.; Mukherjee, S.; Ravichandran, R.; Dan, K.; Ramakrishna, S., Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *J R Soc Interface* **2012**, 9, (66), 1-19.
11. Seitz, H.; Rieder, W.; Irsen, S.; Leukers, B.; Tille, C., Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2005**, 74, (2), 782-8.

12. Li, M.; Mondrinos, M. J.; Gandhi, M. R.; Ko, F. K.; Weiss, A. S.; Lelkes, P. I., Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, 26, (30), 5999-6008.
13. MacNeil, S., Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* **2007**, 445, (7130), 874-80.
14. Welss, T.; Basketter, D. A.; Schroder, K. R., In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro* **2004**, 18, (3), 231-43.
15. Bernerd, F.; Vioux, C.; Asselineau, D., Evaluation of the protective effect of sunscreens on in vitro reconstructed human skin exposed to UVB or UVA irradiation. *Photochem Photobiol* **2000**, 71, (3), 314-20.
16. Horning, J. L.; Sahoo, S. K.; Vijayaraghavalu, S.; Dimitrijevic, S.; Vasir, J. K.; Jain, T. K.; Panda, A. K.; Labhassetwar, V., 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. *Mol Pharm* **2008**, 5, (5), 849-62.
17. Pasonen-Seppanen, S.; Suhonen, T. M.; Kirjavainen, M.; Miettinen, M.; Urtti, A.; Tammi, M.; Tammi, R., Formation of permeability barrier in epidermal organotypic culture for studies on drug transport. *J Invest Dermatol* **2001**, 117, (5), 1322-4.
18. Smalley, K. S.; Lioni, M.; Herlyn, M., Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2006**, 42, (8-9), 242-7.
19. Pereira, C.; Gold, W.; Herndon, D., Review paper: burn coverage technologies: current concepts and future directions. *J Biomater Appl* **2007**, 22, (2), 101-21.
20. Supp, D. M.; Wilson-Landy, K.; Boyce, S. T., Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB J* **2002**, 16, (8), 797-804.
21. Khan, Z.; Bhadouria, P.; Bisen, P. S., Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr Pharm Biotechnol* **2005**, 6, (5), 373-9.
22. Kulshreshtha, A.; Zacharia, A. J.; Jarouliya, U.; Bhadauriya, P.; Prasad, G. B.; Bisen, P. S., Spirulina in health care management. *Curr Pharm Biotechnol* **2008**, 9, (5), 400-5.
23. Karkos, P. D.; Leong, S. C.; Karkos, C. D.; Sivaji, N.; Assimakopoulos, D. A., Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evid Based Complement Alternat Med* **2008**.
24. Roether, J. A.; Boccaccini, A. R.; Hench, L. L.; Maquet, V.; Gautier, S.; Jerjme, R., Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2002**, 23, (18), 3871-8.

25. Blaker, J. J.; Gough, J. E.; Maquet, V.; Notingher, I.; Boccaccini, A. R., In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A* **2003**, 67, (4), 1401-11.
26. Verrier, S.; Blaker, J. J.; Maquet, V.; Hench, L. L.; Boccaccini, A. R., PDLA/Bioglass composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. *Biomaterials* **2004**, 25, (15), 3013-21.
27. Maquet, V.; Boccaccini, A. R.; Pravata, L.; Notingher, I.; Jerome, R., Porous poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterisation. *Biomaterials* **2004**, 25, (18), 4185-94.
28. Atala, A., Technology insight: Applications of tissue engineering and biological substitutes in urology. *Nat Clin Pract Urol* **2005**, 2, (3), 143-9.
29. Langer, R., Selected advances in drug delivery and tissue engineering. *J Control Release* **1999**, 62, (1-2), 7-11.
30. Naderi, H.; Matin, M. M.; Bahrami, A. R., Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl* **2011**, 26, (4), 383-417.
31. Kanaparthi, R.; Kanaparthi, A., The changing face of dentistry: nanotechnology. *Int J Nanomedicine* **2011**, 6, 2799-804.
32. Shields, K. J.; Beckman, M. J.; Bowlin, G. L.; Wayne, J. S., Mechanical properties and cellular proliferation of electrospun collagen type II. *Tissue Eng* **2004**, 10, (9-10), 1510-7.
33. Xu, C.; Yang, F.; Wang, S.; Ramakrishna, S., In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res A* **2004**, 71, (1), 154-61.
34. Wheeldon, I.; Farhadi, A.; Bick, A. G.; Jabbari, E.; Khademhosseini, A., Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions. *Nanotechnology* **2011**, 22, (21), 212001.
35. Burdick, J. A.; Vunjak-Novakovic, G., Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A* **2009**, 15, (2), 205-19.
36. Gauvin, R.; Khademhosseini, A., Microscale technologies and modular approaches for tissue engineering: moving toward the fabrication of complex functional structures. *ACS Nano* **2011**, 5, (6), 4258-64.
37. Barbanti, S. H.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R., Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Ciência e Tecnologia* **2005**, 15, (1), 13-21.

38. Boudriot, U.; Goetz, B.; Dersch, R.; Greiner, A.; Wendorff, J.-H., Role of electrospun nanofibers in stem cell technologies and tissue engineering. *Macromolecular Symposia* **2005**, 225, 09-16.
39. Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A., Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. *Adv Mater* **2009**, 21, (32-33), 3343-51.
40. Cunha, C.; Panseri, S.; Villa, O.; Silva, D.; Gelain, F., 3D culture of adult mouse neural stem cells within functionalized self-assembling peptide scaffolds. *Int J Nanomedicine* **2011**, 6, 943-55.
41. Greiner, A.; Wendorff, J. H., Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46, (30), 5670-703.
42. Li, D.; McCann, J. T.; Xia, Y., Use of electrospinning to directly fabricate hollow nanofibers with functionalized inner and outer surfaces. *Small* **2005**, 1, (1), 83-6.
43. Hohman, M. M.; Shin, M.; Rutledge, G.; Brenner, M. P., Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids* **2001**, 13, (8), 2201-2220.
44. Hirahashi, T.; Matsumoto, M.; Hazeki, K.; Saeki, Y.; Ui, M.; Seya, T., Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of Spirulina platensis. *Int Immunopharmacol* **2002**, 2, (4), 423-34.
45. Matsui, M. S.; Muizzuddin, N.; Arad, S.; Marenus, K., Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl Biochem Biotechnol* **2003**, 104, (1), 13-22.
46. Costa, J. A.; Colla, L. M.; Duarte Filho, P. F., Improving Spirulina platensis biomass yield using a fed-batch process. *Bioresour Technol* **2004**, 92, (3), 237-41.
47. de Moraes, M. G.; Stillings, C.; Dersch, R.; Rudisile, M.; Pranke, P.; Costa, J. A.; Wendorff, J., Preparation of nanofibers containing the microalga Spirulina (Arthrospira). *Bioresour Technol* **2010**, 101, (8), 2872-6.
48. Tarantino, L. M., Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127. In Nutrition, O. o. F. A. S.-C. f. F. S. a. A., Ed. U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, 2003.
49. Modino, S. A.; Sharpe, P. T., Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol* **2005**, 50, (2), 255-8.
50. Teng, Y. D.; Lavik, E. B.; Qu, X.; Park, K. I.; Ourednik, J.; Zurakowski, D.; Langer, R.; Snyder, E. Y., Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a

unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, (5), 3024–3029.

51. Radisic, M.; Park, H.; Gerecht, S.; Cannizzaro, C.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G., Biomimetic approach to cardiac tissue engineering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2007**, 362, (1484), 1357-68.
52. Zwaginga, J. J.; Doevendans, P., Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2003**, 30, (11), 900-8.
53. Miao, Z.; Jin, J.; Chen, L.; Zhu, J.; Huang, W.; Zhao, J.; Qian, H.; Zhang, X., Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* **2006**, 30, (9), 681-7.
54. Sakai, T.; Ling, Y.; Payne, T. R.; Huard, J., The use of ex vivo gene transfer based on muscle-derived stem cells for cardiovascular medicine. *Trends Cardiovasc Med* **2002**, 12, (3), 115-20.
55. Gronthos, S.; Zannettino, A. C.; Hay, S. J.; Shi, S.; Graves, S. E.; Kortessidis, A.; Simmons, P. J., Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* **2003**, 116, (Pt 9), 1827-35.
56. Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M.; Lu, B.; Fisher, L. W.; Robey, P. G.; Shi, S., SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, (10), 5807-12.
57. Ju, X. L.; Huang, Z. W.; Shi, Q.; Hou, H. S.; Duan, C. H., [Biological characteristics and induced differentiation ability of in vitro expanded umbilical cord blood mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **2005**, 43, (7), 499-502.
58. Hou, L.; Cao, H.; Wang, D.; Wei, G.; Bai, C.; Zhang, Y.; Pei, X., Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol* **2003**, 78, (3), 256-61.
59. Caterson, E. J.; Nesti, L. J.; Albert, T.; Danielson, K.; Tuan, R., Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. *MedGenMed* **2001**, E1.
60. 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* **2003**, 21, (1), 105-10.
61. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent

mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, 8, (4), 315-7.

62. Martin, P., Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* **1997**, 276, 75-81.

63. Blanpain, C., Stem cells: Skin regeneration and repair. *Nature* **2010**, 464, (7289), 686-7.

64. Phillips, T. J., New skin for old: developments in biological skin substitutes. *Arch Dermatol* **1998**, 134, (3), 344-9.

65. Feliciani, C.; Gupta, A. K.; Sauder, D. N., Keratinocytes and cytokine/growth factors. *Crit Rev Oral Biol Med* **1996**, 7, (4), 300-18.

66. Dai, Y.; Li, J.; Dai, G.; Mu, H.; Wu, Q.; Hu, K.; Cao, Q., Skin epithelial cells in mice from umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Burns* **2007**, 33, (4), 418-28.

67. Wang, C.; Chien, H.; Yan, K.; Hung, C.; Hung, K.; Tsai, S.; Jhang, H., Correlation between processing parameters and microstructure of electrospun poly(D,L-lactic acid) nanofibers. *Polymer* **2009**, 50, 6100-6110.

68. Sigma-Aldrich, Safety Data Sheet P-1691. In 2011; pp 1-6.

69. Theoret, C., Tissue engineering in wound repair: the three "R"s--repair, replace, regenerate. *Vet Surg* **2009**, 38, (8), 905-13.

70. da Silva Meirelles, L.; Chagastelles, P. C.; Nardi, N. B., Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **2006**, 119, (Pt 11), 2204-13.

71. Saad, B.; Dakwar, S.; Said, O.; Abu-Hijleh, G.; Al Battah, F.; Kmeel, A.; Aziازه, H., Evaluation of medicinal plant hepatotoxicity in co-cultures of hepatocytes and monocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* **2006**, 3, (1), 93-8.

72. Saad, B.; Abu-Hijleh, G.; Suter, U. W., Cell culture techniques for assessing tissue compatibility of biomaterials. In *Introduction Polymeric Biomaterials*, R, A., Ed. The Citus Books: 2003; Vol. I, pp 263–299.

73. Barnes, C. P.; Sell, S. A.; Boland, E. D.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L., Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, 59, (14), 1413-33.

74. Jain, R. K., Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* **1987**, 47, (12), 3039-51.

75. Pohanish, R. P., *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. 6th ed.; Elsevier Inc.: 2012; p 3,000.

76. EMISIG, E. M. I. S. I. G.-. Protective Action Criteria (PAC) with AEGLs, ERPGs, & TEELs: Rev. 26 for Chemicals of Concern (09/2010). <http://www.atlintl.com/DOE/teels/teel/complete.asp> (11-30),
77. Navarro, M.; Aparicio, C.; Charles-Harris, M.; Ginebra, M. P.; Engel, E.; Planell, J. A., Development of a Biodegradable Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering: Physicochemical, Topographical, Mechanical, Degradation, and Biological Properties. *Advances in Polymer Science* **2006**, 200, 209–231.
78. Li, W. J.; Cooper, J. A., Jr.; Mauck, R. L.; Tuan, R. S., Fabrication and characterization of six electrospun poly(alpha-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater* **2006**, 2, (4), 377-85.
79. Nelson, D. L.; Cox, M. M., Fotossíntese: captura da energia luminosa. In *Lehninger Principios de Bioquímica*, 3th ed.; Sarvier: São Paulo, 2002; p 975.
80. Geiger, B.; Bershadsky, A.; Pankov, R.; Yamada, K. M., Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, 2, (11), 793-805.
81. Streuli, C. H., Integrins and cell-fate determination. *J Cell Sci* **2009**, 122, (Pt 2), 171-7.
82. Andrews, K. D.; Hunt, J. A.; Black, R. A., Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. *Biomaterials* **2007**, 28, (6), 1014-26.
83. Gentile, F.; Tirinato, L.; Battista, E.; Causa, F.; Liberale, C.; di Fabrizio, E. M.; Decuzzi, P., Cells preferentially grow on rough substrates. *Biomaterials* **2010**, 31, (28), 7205-12.
84. Sahoo, S.; Ouyang, H.; Goh, J. C.; Tay, T. E.; Toh, S. L., Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Eng* **2006**, 12, (1), 91-9.
85. Jin, G.; Prabhakaran, M. P.; Ramakrishna, S., Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomater* **2011**, 7, (8), 3113-22.
86. Wei, J. D.; Tseng, H.; Chen, E. T.; Hung, C. H.; Liang, Y. C.; Sheu, M. T.; Chen, C. H., Characterizations of Chondrocyte Attachment and Proliferation Scaffolds of PLLA and PBSA for Use in Cartilage Tissue Engineering. *J Biomater Appl* **2011**.
87. Ku, S. H.; Park, C. B., Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials* **2010**, 31, (36), 9431-7.

88. Qureshi, M. A.; Ali, R. A., Spirulina platensis exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **1996**, 18, (3), 457-63.
89. Qureshi, M. A.; Garlich, J. D.; Kidd, M. T., Dietary Spirulina platensis enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **1996**, 18, (3), 465-76.