

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE  
MATRIZES DE NANOFIBRAS PARA APLICAÇÃO EM LESÕES DO SISTEMA  
NERVOSO: INFLUÊNCIA DOS SUBSTRATOS E DA INCORPORAÇÃO DO FATOR  
DE CRESCIMENTO NEURAL**

KERLIN QUINTILIANO

**Dissertação de Mestrado**

PORTO ALEGRE, 2013.

KERLIN QUINTILIANO

**DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE  
MATRIZES DE NANOFIBRAS PARA APLICAÇÃO EM LESÕES DO SISTEMA  
NERVOSO: INFLUÊNCIA DOS SUBSTRATOS E DA INCORPORAÇÃO DO FATOR  
DE CRESCIMENTO NEURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientação: Prof. Dr. Geraldo Pereira Jotz

Co-orientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patricia Pranke

PORTO ALEGRE

2013

## AGRADECIMENTOS

*A minha família querida (pai, mãe e irmã), pelo apoio constante, incentivo e compreensão. Em especial aos meus pais que fizeram o possível e o impossível para nos proporcionar educação e formação excelentes.*

*Ao Cassiano, por estar sempre ao meu lado e por admirar o meu trabalho. Em todo e qualquer momento difícil você estava lá com suas palavras confortantes. Obrigada por todo carinho, apoio, compreensão e paciência.*

*A minha querida amiga Cássia, que esteve muito presente nesses dois anos, sempre pronta para me “socorrer”.*

*Aos meus orientadores, Prof. Dr. Geraldo Jotz e Profa. Dra. Patricia Pranke, por me proporcionar a chance de desenvolver um trabalho inovador.*

*À Profa. Dra. Patricia Pranke, pelos ensinamentos, oportunidades e pela confiança depositada ao longo desses anos de convivência. Sou muito grata pela sua enorme contribuição para o meu crescimento como profissional.*

*Ao Prof. Diogo André Pilger, por toda a sua dedicação e disponibilidade em todos os momentos deste trabalho. Seu empenho e preocupação dignos de um profissional exemplar foram indispensáveis. Muito obrigada!*

*A minha querida amiga e parceira Thayane Crestani, com quem dividi muito trabalho, muitas alegrias e muitas angústias ao longo desses dois anos.*

*Aos queridos e inesquecíveis bolsistas Davi, Virginia e Eduardo. Obrigada pelo comprometimento admirável. Com certeza a realização deste trabalho se deve muito a todos vocês.*

*Aos colegas e amigos do Laboratório de Células-tronco, que contribuíram de alguma forma para este trabalho, ou que simplesmente tornaram os meus dias mais alegres.*

*Obrigada por tornar o nosso “lab” um ambiente de trabalho tão agradável!*

*Às queridas Simone e Fernanda, sempre prontas para ajudar em qualquer situação.*

*Aos coautores, pela grande ajuda e parceria na realização dos experimentos. Em especial à Annelise Rosa por “sofrer” junto comigo em muitas etapas do trabalho e à Daniela Steffens e ao Prof. Dr. Diogo André Pilger, pela execução de uma das partes mais importantes do trabalho.*

*À Patrícia Nardin, Mariane Secco e ao Fabrício Figueiró.*

*A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

## Sumário

Resumo .....	5
<i>Abstract</i> .....	6
Lista de abreviaturas .....	7
1. Introdução .....	10
1.1 Células-tronco .....	10
1.2 Células-tronco mesenquimais de dentes decíduos esfoliados humanos....	11
1.3 Terapia celular e Engenharia de Tecidos Neurais.....	12
1.4 Matrizes de nanofibras produzidas por <i>electrospinning</i> .....	13
1.5 Moléculas bioativas .....	16
1.6 NGF ( <i>Nerve Growth Factor</i> - Fator de Crescimento Neural) .....	17
1.7 Diferenciação neural .....	19
1.8 Perspectivas clínicas dos dispositivos produzidos .....	22
2. Objetivos .....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos .....	24
3. Artigo Científico .....	26
4. Discussão .....	60
5. Conclusão .....	72
6. Perspectivas .....	74
7. Referências Bibliográficas .....	75
ANEXO .....	83

## Resumo

O uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) na medicina regenerativa, principalmente quando associado ao sistema nervoso, requer alternativas em relação à via de aplicação. A associação da terapia celular com a nanotecnologia para uso em neurociências, desenvolvida nesse trabalho, é uma abordagem inovadora no Brasil. Dessa forma, as matrizes de nanofibras, produzidas pela técnica de *electrospinning* (ES), funcionam como suportes para a proliferação e diferenciação celular proporcionando uma alternativa para a reconstituição do tecido lesado. O processo de regeneração do tecido neural pode ser aperfeiçoado com a liberação controlada de fatores neurotróficos, através do uso dessas matrizes. Entre esses fatores, encontra-se o NGF (*Nerve Growth Factor* – fator de crescimento neural), o qual exerce um papel central no desenvolvimento, manutenção e sobrevivência dos neurônios. Além disso, características de superfície das matrizes, como o alinhamento de nanofibras, podem estimular a diferenciação neural. O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver matrizes de nanofibras alinhadas e não alinhadas com e sem o NGF incorporado, através da técnica ES de emulsão. Além disso, objetivou-se avaliar o comportamento celular, bem como a capacidade de diferenciação neural das CTMs, sobre as estruturas tridimensionais desenvolvidas. As CTMs foram extraídas da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos. Quatro grupos de *scaffolds* foram desenvolvidos, caracterizados e avaliados: *scaffolds* com fibras randomizadas e com fibras alinhadas, sendo cada tipo com e sem o NGF incorporado. As análises físico-químicas realizadas foram morfologia, diâmetro das fibras e degradabilidade do biomaterial. Os parâmetros biológicos avaliados foram morfologia, adesão, viabilidade e proliferação celular, bem como a citotoxicidade frente ao biomaterial. A diferenciação neural foi quantificada através da expressão dos genes neurais nestina,  $\beta$ -III tubulina e NSE (enolase específica para neurônios). As matrizes de nanofibras produzidas mostraram-se satisfatórias para o cultivo de CTMs, mimetizando a estrutura física da matriz extracelular (MEC). Além disso, a técnica utilizada permitiu a obtenção de estruturas com nanofibras alinhadas e randomizadas. As CTMs cultivadas nas matrizes foram capazes de aderir e proliferar com vantagens para adesão nas matrizes alinhadas contendo o NGF, em relação às matrizes alinhadas controle. As estruturas produzidas não apresentaram características tóxicas permitindo que as CTMs mantivessem a viabilidade ao longo do tempo. A avaliação da diferenciação neural das CTMs indicou que todos os grupos de matrizes foram capazes de promover o aumento da expressão de genes neurais. Tal capacidade foi observada tanto para CTMs cultivadas sobre as matrizes com o meio controle quanto com o meio de indução neural. Esses achados mostram a possível influência das características químicas e topográficas providas pelos substratos produzidos. As características da matriz artificial permitem que as CTMs respondam adequadamente ao microambiente e expressem genes neurais, podendo auxiliar na regeneração tecidual quando aplicada em lesões do sistema nervoso.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais, nanotecnologia, fator de crescimento neural, diferenciação neural, regeneração tecidual.

## **Abstract**

The use of mesenchymal stem cells (MSCs) in regenerative medicine, particularly when associated with the nervous system, requires alternatives with respect to cell application methods. The association of cellular therapy with nanotechnology for use in neuroscience, developed with this work, is an innovative approach in Brazil. Scaffolds produced by electrospinning (ES) technique act as supports for cell proliferation and differentiation, providing an alternative to reconstitute the damaged tissue. The process of neural tissue regeneration can be improved through the controlled release of neurotrophic factors from the scaffolds. Among these factors, NGF (Nerve Growth Factor) plays a central role in the development, maintenance and survival of neurons. Furthermore, surface characteristics of nanofibers, such as alignment, can stimulate neural differentiation. The main objective of this study was to develop aligned nanofiber scaffolds and random nanofiber scaffolds with and without NGF incorporated through emulsion ES. In addition it was aimed to characterize the physico-chemical properties of the scaffolds, related to the extracellular matrix (ECM) and evaluate the cell behavior, as well as the neural differentiation on these three-dimensional devices. The MSCs were extracted from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. Four groups of scaffolds were developed, characterized and evaluated: scaffolds with randomized fibers and with aligned fibers, each type with and without NGF incorporated. The physico-chemical analyzes performed were morphology, fiber diameter and degradability of the biomaterial. The biological parameters evaluated were cell morphology, adhesion, proliferation and viability, as well as cytotoxicity by the biomaterial. The neural differentiation was quantified by measuring gene expression for the neural genes nestin,  $\beta$ -III tubulin and NSE (neuron-specific enolase). The scaffolds produced demonstrated a satisfactory environment for MSC growth, mimicking the ECM physical structure. Furthermore, the technique allowed for the production of scaffolds with aligned and with randomized nanofibers. MSCs cultured on scaffolds were able to adhere and proliferate, with better adhesion performance on aligned nanofiber scaffolds with NGF incorporated, when compared to aligned nanofiber scaffolds control. The devices produced showed nontoxic characteristics permitting MSCs to maintain their viability over time. The evaluation of MSC neural differentiation indicated that all groups of scaffolds were able to upregulate neural genes expression. Such ability was observed for both MSCs cultured on scaffolds with control medium as on scaffolds under neural induction medium. These features provided by this artificial ECM permit proper MSC response to microenvironment, leading to neuronal genes expression, which could improve tissue regeneration when applied to nerve lesions.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, nanotechnology, nerve growth factor, neural differentiation, tissue regeneration.

### **Lista de abreviaturas**

$\mu\text{g/mL}$  - Micrograma por mililitro

$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  - Micrograma por micromol

$\text{mg/L}$  - Miligrama por litro

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{M}$  - Micromolar

AR – Ácido retinóico

AsAp - Ácido ascórbico-2 fosfato

BSA - Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

$\text{cm}^2$  - centímetro quadrado

CD - Do inglês *Cluster of Differentiation*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

$\text{CO}_2$  - Dióxido de carbono

CS – Células de Schwann

CT - Células-tronco

CTEs - Células-tronco Embrionárias

CTAs - Células-tronco Adultas

CTMs - Células-tronco mesenquimais

DAPI - do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DPSCs – Células-tronco da polpa dental (do inglês, *Dental Pulp Stem Cells*)

DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Desvio padrão

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ES – Eletrofição (do inglês, *Electrospinnig*)

ET - Engenharia de Tecidos

FC – Fator de crescimento

fg - Fentograma

g - Força que exerce a gravidade

Gal-C – Galactocerebrosídeo (do inglês *Galactocerebroside*)

GFAP – proteína acídica fibrilar glial (do inglês *Glial fibrillary acidic protein*)

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 (do inglês, *Iscove's Modified Dulbecco's Media*)

kV - kilovolts

LDH - Lactato Desidrogenase

M - Molar

m<sup>3</sup> - Metro cúbico

MEC - matriz extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MAP – proteína associada à micritúbulo (do inglês, *Microtubule-associated protein*)

mg/mL - Miligrama por mililitro

mL - Mililitro

mL/h - mililitro/hora

mm - Milimetro

mM - Milimolar

mmol/L - milimol por litro

m/m - massa/massa

MO - Medula Óssea

MTT – do inglês (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

N - número de amostra

NF-H – neurofilamento cadeia pesada (do inglês, *Neurofilament high molecular weight*)

NF-M – neurofilamento cadeia média (do inglês, *Neurofilament medium molecular weight*)

NeuN - antígeno neuronal nuclear (do inglês, *Neuronal Nuclei*)

ng - Nanograma

NGF - Fator de crescimento neural (do inglês, *Neural Growth Factor*)

nm - Nanometro

nM – Nanomolar



olig 2 – fator 2 de transcrição de oligodendrócitos (do inglês, *Oligodendrocyte transcription factor 2*)

P5 - Quinta passagem celular

PBS - Solução tampão de fosfato (do inglês *phosphate buffer solution*)

PDLLA - Poli-D,L- ácido lático

PLGA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

PE - Ficoeritrina (do inglês, *Phycoeritrin*)

ppm - Parte por milhão

PSA-NCAM - do inglês, *Polysialylated-neural cell adhesion molecule*

TH – tirosina hidroxilase (do inglês *Tyrosine hydroxylase*)

rpm - Rotações por minuto

*Real time* PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SFB - Soro fetal bovino

SHEDS – Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (do inglês, *Stem Cells from human exfoliated deciduos teeth*)

SN – Sistema nervoso

SNC (sistema nervoso central)

SNP (sistema nervoso periférico)

TGFb1 - Fator de crescimento transformador beta 1 (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*)

THF - Tetrahydrofurano

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

U/mL - Unidades por mililitro

x - Vezes

7AAD - 7-Amino Actinomicina D

## 1. Introdução

### 1.1 Células-tronco

As células-tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas que possuem a capacidade de se auto-renovar e de gerar células maduras de diferentes tecidos, através de estimulação adequada, por meio de diferenciação. A grande diferença entre os tipos de CT está em sua origem, sendo classificadas basicamente em embrionárias e adultas. As células-tronco embrionárias (CTEs) possuem origem na massa interna do blastocisto, sendo classificadas como células totipotentes, quando retiradas do embrião em até três dias, ou pluripotentes, quando oriundas da fase de blastocisto. Ambas são capazes de originar todas as linhagens celulares de um organismo completo, mas apenas as totipotentes podem originar os anexos embrionários (Helmy *et al.*, 2010). Já as células-tronco adultas (CTAs) são encontradas em tecidos já formados. Há diversos tipos de CTAs, sendo que a maioria não apresenta a mesma plasticidade das CTEs. Por exemplo, as células-tronco hematopoéticas (CTHs) são as CTAs mais estudadas em razão do seu uso clínico em transplantes medulares, tais células são comprometidas exclusivamente com o tecido hematopoético (Le Blanc and Ringden, 2005).

Um segundo tipo de CTAs bastante estudado são as células-tronco mesenquimais (CTMs), presentes em diversos tecidos adultos. Entre os mais pesquisados, pode-se citar a medula óssea (MO), o tecido adiposo, a polpa dentária e a parede dos vasos do cordão umbilical (Gronthos *et al.*, 2000; Secco *et al.*, 2008; Mosna *et al.*, 2010). As CTMs são o tipo de CT adulta considerado por muitos pesquisadores como pluripotentes, podendo tanto se diferenciar em todos os tipos celulares como osteoblastos, condrócitos, adipócitos (Pittenger *et al.*, 1999), bem como precursores neurais, neurônios e células gliais (Kopen *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006). As CTMs não possuem um marcador específico que defina sua população de maneira única. Sendo assim, em 2006, a *International Society for Cellular Therapy* estabeleceu os seguintes critérios para que uma determinada população celular seja designada como CTMs: capacidade de aderência ao plástico e proliferação *in vitro*; diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos; bem como perfil imunofenotípico positivo para os seguintes marcadores: CD73, CD90 e CD105, e negativo para os marcadores hematopoéticos CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (Dominici *et al.*, 2006).

### ***1.2 Células-tronco mesenquimais de dentes decíduos esfoliados humanos***

Dentre as diferentes fontes para obtenção das CTMs, a polpa de dentes decíduos humanos torna-se bastante acessível. Essa fonte celular, normalmente descartada, é considerada não invasiva quando não há indicação de extração, ou seja, após o processo natural de substituição do dente decíduo pelo dente permanente chamada esfoliação total. Com isso, essa fonte representa uma excelente alternativa tanto para a pesquisa da terapia endodôntica e periodontal, como em outras abordagens relacionadas à regeneração tecidual não ligada à área odontológica (Soares *et al.*, 2007).

Diversos pesquisadores têm conseguido isolar CTMs altamente proliferativas oriundas da polpa dental (Rodríguez-Lozano *et al.*, 2012). As CTMs da polpa de dentes decíduos apresentam uma maior taxa de proliferação e capacidade de formação de colônias, quando comparadas às CTMs da MO. Além disso, são capazes de expressar os marcadores de precursores neurais e de células gliais como nestina e proteína fibrilar acídica (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*), respectivamente (Miura *et al.*, 2003). Tais células apresentam grande potencial para a diferenciação neural, fato relacionado à sua origem (originam-se da crista neural), além de demonstrar características neuroprotetoras quando aplicadas em lesões neurológicas (Huang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

Miura e colaboradores (2003) foram os pioneiros no isolamento dessas células, as quais chamaram de SHEDS (*Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth*), constatando um potencial proliferativo superior às DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) anteriormente isoladas por Gronthos e colaboradores (Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003). Em relação à plasticidade das SHEDS, elas são capazes de se diferenciar em osteoblastos, odontoblastos, células endoteliais, adipócitos e células neurais *in vitro* (Miura *et al.*, 2003; Laino *et al.*, 2006; Chadipiralla *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2010). Outro aspecto importante é que a sua plasticidade é mantida *in vivo* após a criopreservação (Perry *et al.*, 2008). O uso das CTMs da polpa de dentes tanto decíduos quanto permanentes representa uma alternativa promissora no que diz respeito à pesquisa ou tratamento de traumas no sistema nervoso, devido ao seu potencial inerente para diferenciação neural (Govindasamy *et al.*, 2010).

### ***1.3 Terapia celular e Engenharia de Tecidos Neurais***

O sistema nervoso (SN) de mamíferos adultos possui habilidade limitada de regeneração após lesões ou doenças. Diversas estratégias têm sido sugeridas para superar essa limitação, entre elas o uso de fatores de crescimento (FC), terapia genética e terapia celular (Lindvall e Kokaia, 2010). A terapia celular visa ampliar o mecanismo natural de reparo de tecidos ou órgãos lesados utilizando, por exemplo, CT, para que essas possam agir sinergicamente com o organismo em resposta ao dano (Ikada, 2006). O uso de CTMs para a regeneração de tecidos neurais como a medula espinhal (Sahni *et al.*, 2010), a retina, o nervo óptico (Dahlmann-Noor *et al.*, 2010) e o nervo periférico (Kemp *et al.*, 2008), tem sido recentemente relatado. Portanto, a indução de CTMs a células de linhagem neural, por meio de diferenciação, representa uma alternativa promissora na terapia celular (Ibarretxe *et al.*, 2012).

No entanto, quando relacionado ao sistema nervoso, o uso das CTMs ainda requer alternativas em relação à sua via de aplicação. Nesse contexto, encontra-se a engenharia de tecidos neurais a qual busca possibilidades para associar as CTMs aos biomateriais, que funcionariam como veículos de aplicação da terapia celular. Os biomateriais podem ser definidos como materiais não vivos utilizados como dispositivos médicos (Davis *et al.*, 2005). Para a área de engenharia de tecidos, os biomateriais servirão de suporte para as células, as quais permanecerão por mais tempo no local da aplicação. Portanto, a estratégia da engenharia de tecidos neurais é facilitar a regeneração nervosa através da combinação de um tipo celular adequado com um determinado biomaterial (Lee e Arinzeh, 2011).

A engenharia de tecidos (ET) em geral requer a utilização básica de três ferramentas, que não necessariamente precisam ser utilizadas de forma concomitante, sendo estas: as células, um suporte celular (*scaffold* ou matriz) e um ou mais FC. Cada um dos componentes dessa tríade possui uma função específica no que diz respeito à regeneração. A matriz fornece o ambiente adequado para manter as células no local favorecendo a proliferação no tecido lesado, enquanto as células são as responsáveis diretas pela síntese da nova matriz extracelular (MEC), facilitada pelo uso de FC (Ikada, 2006).

Portanto, o objetivo da engenharia de tecidos é criar uma estrutura viva que mimetize a complexidade do tecido humano funcional (Norman e Desai, 2006; Liao, Chan and Ramakrishna, 2008). Para isso, é preciso fabricar matrizes que possam promover o crescimento e proliferação celular, de forma realmente tridimensional (Lannutti *et al.*, 2007) ou ainda servir como um guia ou uma “ponte” que consiga restabelecer as conexões perdidas

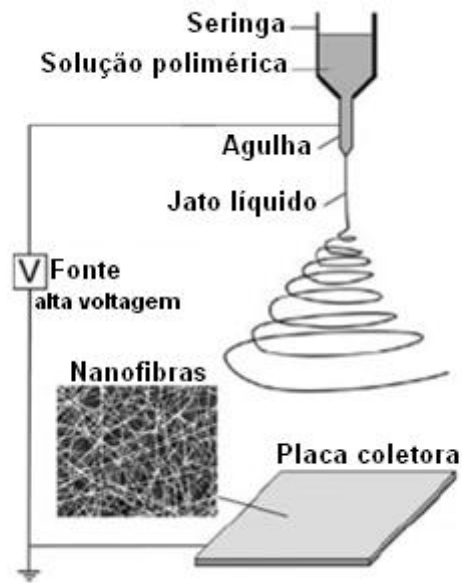
como no caso de lesões do nervo periférico ou após o trauma raquimedular (Kim *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 2009).

#### ***1.4 Matrizes de nanofibras produzidas por electrospinning***

O suporte celular pode ser composto por matrizes poliméricas formadas por fibras que variam de nanômetros a micrometros de diâmetro, produzidas por uma técnica conhecida como eletrofiação (do inglês *electrospinning* - ES), caracterizando um molde onde as CT podem ser cultivadas, permitindo o desenvolvimento do novo tecido.

As matrizes, ou *scaffolds*, testadas no presente trabalho foram produzidas por essa técnica, a qual envolve o uso de uma fonte de alta tensão para induzir a formação de um jato líquido proveniente de um polímero. A fibra sólida é formada ao passo que o jato carregado é continuamente deformado devido a repulsão eletrostática entre as cargas de superfície e a evaporação do solvente (Li e Xia, 2006). As fibras produzidas por ES podem atingir a escala nanométrica, apresentando uma grande área de superfície, facilitando a adesão e proliferação celular, mimetizando fisicamente as estruturas necessárias para a sobrevivência das células (Martins *et al.*, 2007).

As nanofibras produzidas por ES podem estar organizadas de maneira alinhada ou dispersas aleatoriamente (randomizadas, como são popularmente conhecidas) representando substratos celulares distintos. Para a produção das nanofibras randomizadas o aparato básico de ES, mostrado na figura 1, é suficiente, pois as fibras são atraídas à placa coletora onde se acomodarão de maneira aleatória (Li and Xia, 2006). Apesar das matrizes de nanofibras randomizadas serem empregadas com sucesso para diversas aplicações na área da ET, essas podem ser menos vantajosas em aplicações mais específicas, onde o uso de estruturas altamente alinhadas possa apresentar melhores resultados. Um exemplo seria a utilização dessas matrizes, para alongar e direcionar o crescimento de neuritos e regenerar axônios lesados (Kim *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).



**Figura 1** – Ilustração esquemática do aparato básico de *electrospinning* (fonte: adaptado de Li e Xia, 2006).

A alternativa mais comum para a produção das matrizes de nanofibras alinhadas consiste em acoplar um cilindro com alta capacidade de rotação à estrutura básica do ES, permitindo através da aplicação de alta voltagem, que as nanofibras sejam coletadas sobre ele. A velocidade linear do cilindro deve coincidir com a velocidade do jato a fim de que as fibras sejam mecanicamente esticadas e alinhadas em torno da circunferência do cilindro. Rotações mais baixas diminuem a precisão do alinhamento das fibras enquanto que uma velocidade de rotação muito elevada pode exercer uma carga de tensão que pode fazer com que a fibra se quebre (Xie *et al.*, 2009).

A diferenciação de CTMs pode ser controlada através de sinais bioquímicos, topográficos e elétricos. Portanto, matrizes de nanofibras alinhadas desempenham um papel crítico no fornecimento de características topográficas para o crescimento de neuritos em comparação às matrizes de nanofibras randomizadas (Han and Cheung, 2011). O aparato para a realização da técnica de ES no presente trabalho, as matrizes de nanofibras alinhadas e randomizadas produzidas, bem como o seu processamento até a semeadura das células podem ser observados nas figuras 1 a 3 (Anexo I).

Em função de sua potencial aplicação clínica é necessário que as matrizes de nanofibras randomizadas ou alinhadas sejam biodegradáveis (com dispersão *in vivo*, porém sem eliminação de produtos e/ou subprodutos no organismo), bioreabsorvíveis (com eliminação total pelo organismo através das rotas metabólicas) e bioabsorvíveis (dissolvidos em fluídos corpóreos) (Barbanti *et al.*, 2005). Os polímeros mais utilizados nesses sistemas biológicos, conforme apresentado por Santos e Wada (2007), são baseados em poliésteres derivados de  $\alpha$ -hidróxi ácidos como o poli(L-ácido lático) (PLLA) e o poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA).

As matrizes de nanofibras podem ser projetadas de acordo com o objetivo de utilização. Algumas alternativas têm sido recentemente exploradas (Li *et al.*, 2002):

- propriedades mecânicas semelhantes aos estímulos ambientais da matriz extracelular (MEC) podem gerar sinais apropriados para o crescimento celular, diferenciação e subsequente formação do novo tecido;
- propriedades físico-químicas de superfície como topografia e incorporação de proteínas podem modificar o comportamento celular;
- o material utilizado para produzir as matrizes pode influenciar em propriedades físicas e biológicas como, por exemplo, o tempo de degradação do polímero no organismo.

Dentre essas estratégias, baseadas nas propriedades das matrizes, destaca-se o papel da topografia do biomaterial, a qual tem sido estudada de modo que possa favorecer a diferenciação em células de linhagem neural. Um exemplo da importância dessa característica, para o reparo de lesões nervosas, é a criação de matrizes com nanofibras alinhadas, as quais acredita-se, devem contribuir como guia para a migração celular e direcionamento da regeneração axonal, tanto no SNC (sistema nervoso central) quanto no SNP (sistema nervoso periférico). Yang e colaboradores (2005) foram os primeiros a produzir matrizes alinhadas com aplicação neural. Ainda, segundo Horne e colegas (2010), o alinhamento das nanofibras pode favorecer a comunicação entre as células e, portanto, melhorar as conexões neurais. A maioria desses estudos foca na avaliação da diferenciação

neural, proliferação e extensão dos neuritos de vários tipos celulares, variando o tipo de material e o diâmetro da fibra (Wang *et al.*, 2010; Merve *et al.*, 2012).

Portanto, a técnica de ES é uma das poucas capazes de produzir estruturas com características semelhantes à MEC, a qual é formada por proteínas tais como fibras de colágeno e elastina com um diâmetro entre 50 a 600 nm (Ye and Mahato, 2008). A MEC madura é responsável pela adesão celular, migração, proliferação e diferenciação. As “MECs artificiais”, usadas na engenharia de tecidos, tentam simular o papel exercido por essa estrutura nativa. Assim, as matrizes de nanofibras mimetizam a MEC formada naturalmente, a qual promove a distribuição celular e formação do novo tecido (Smith *et al.*, 2009). Dessa forma, a técnica de ES tem sido considerada a melhor alternativa para a produção de matrizes, ou *scaffolds*, para aplicações biológicas.

### ***1.5 Moléculas bioativas***

Diversos tipos de células vêm sendo testadas sobre as matrizes de nanofibras, tais como células neurais e mesenquimais, demonstrando o potencial de regenerar tecidos de diferentes origens (Dersch *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Esses moldes também podem permitir, utilizando diferentes tecnologias, associar a liberação controlada de moléculas bioativas, como FC que agem promovendo a proliferação e a diferenciação celular (Boudriot *et al.*, 2005). As moléculas bioativas desempenham um papel importante no sistema de comunicação entre as células e o microambiente. A liberação sustentada dessas moléculas, através de matrizes poliméricas aplicadas à regeneração do SN, vem sendo estudada recentemente (Xiaoqiang *et al.*, 2010; Madduri and Gander, 2012).

Diferentes metodologias tem sido exploradas para a obtenção de nanofibras contendo proteínas, enzimas, fármacos, entre outras substâncias. A incorporação de moléculas bioativas, através do uso de emulsões poliméricas associado à técnica de ES, tem demonstrado ser um método efetivo para essa abordagem (Chew *et al.*, 2005; Xiaoqiang *et al.*, 2010). As emulsões são compostas por duas fases distintas, sendo a fase oleosa representada pelo polímero dissolvido em um solvente orgânico e a fase aquosa na qual o agente bioativo é dissolvido. O sistema emulsionante (tensoativo) é adicionado de acordo com o seu EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) formando a emulsão. Com isso, através do uso da técnica de ES, além de mimetizar a escala de tamanho das estruturas do organismo (MEC), é possível encapsular ou incorporar moléculas bioativas nas nanofibras produzidas.



### ***1.6 NGF (Nerve Growth Factor - Fator de Crescimento Neural)***

Para modelos relacionados ao SN, uma das moléculas bioativas mais conhecidas é o Fator de Crescimento Neural (NGF, *Nerve Growth Factor*). O NGF é um dos membros da família das neurotrofinas, que inclui BDNF (*brain derived neurotrophic factor*, fator neurotrófico derivado do cérebro), NT-3 (*neurotrophin-3*, neurotrofina 3) e NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*, neurotrofina 4/5), sendo a primeira neurotrofina descoberta e a melhor caracterizada (Bothwell, 1995). As neurotrofinas atuam através da ligação em receptores celulares específicos provenientes da família do gene *trk*. Receptores *trk* ativados iniciam a sinalização intracelular induzindo a expressão do gene e mudanças na morfologia e na função do neurônio. O NGF exerce um papel central no desenvolvimento, manutenção e sobrevivência dos neurônios (Yuen *et al.*, 1996). Sua utilização pode facilitar a proliferação celular e a diferenciação neuronal, modulando o crescimento axonal, razão pela qual tem sido potencialmente associado a abordagens terapêuticas (Sofroniew, Howe e Mobley, 2001).

O NGF é uma molécula sinalizadora envolvida no desenvolvimento do organismo e na sua homeostase. Uma série de experimentos iniciados na década de 50 utilizando o sistema nervoso de aves em formação levou a descoberta dessa importante proteína. Dessa forma, seu papel crítico no crescimento e organização do sistema nervoso durante o período embrionário é bem estabelecido. Desde então, a ação do NGF foi associada a inúmeros tecidos durante o desenvolvimento, bem como na vida adulta. Outros trabalhos ainda apresentaram sua associação com o sistema imune, estresse, integridade das fibras nervosas e também com doenças neurodegenerativas (Cowan, 2001).

No contexto do desenvolvimento neural, o NGF é produzido pelos nervos em tecidos alvo, tais como a pele, o músculo, e o tecido vascular, estimulando e guiando o crescimento das fibras nervosas através desses tecidos. Os receptores são produzidos por fibras sensoriais, permitindo que as células recebam o sinal do NGF. Esses estão ativos ao longo do desenvolvimento e sua expressão diminui durante a vida adulta, exceto após lesões, quando os nervos precisam ser regenerados ou protegidos. Quando o receptor se liga ao NGF, diversas vias de sinalização podem ser iniciadas e determinar respostas celulares distintas. Essas vias estabelecem funções homeostáticas, de crescimento celular, ou ainda morte celular quando o NGF não está mais presente (Sofroniew, Howe and Mobley, 2001).

As funções de reparo no SN são mediadas pelo NGF, incluindo a reconstrução das fibras nervosas. Esse FC também desempenha um papel importante na proteção das fibras contra efeitos tóxicos ocasionados pelos processos de reparo em tecidos próximos e algumas doenças neurodegenerativas têm sido associadas à diminuição dos níveis de NGF. Estudos

clínicos bloqueando a ação do NGF resultaram em efeitos indesejados ao longo de vários tecidos, comprovando sua ação global e mostrando a necessidade de encontrar o alvo de liberação dessa molécula focando seu uso clínico (Frade e Barde, 1998).

Além da capacidade de manter a sobrevivência dos neurônios sensitivos, o NGF tem muitas outras ações, que vão desde alterações imediatas na membrana celular até o controle da função metabólica a longo prazo. A suplementação com NGF *in vivo* resulta em alterações marcantes no tamanho dos neurônios simpáticos e sensoriais, na ramificação axonal periférica e arborização dendrítica. Efeitos significativos sobre a produção de neurotransmissores, neuropeptídeos, e neurofilamentos também foram descritos (Yuen *et al.*, 1996). O NGF afeta o crescimento de neuritos em uma variedade de neurônios e tem potente ação quimiotática tanto *in vitro* como *in vivo*. A expressão de NGF por células efectoras pode ser importante para arborização terminal e o estabelecimento de conexões sinápticas funcionais. Experimentos demonstraram que após lesão do nervo periférico os níveis de mRNA<sup>NGF</sup> aumentam e permanecem elevados por vários dias (Sofroniew, Howe e Mobley, 2001).

Trata-se, portanto, de uma molécula estratégica por exercer papel fundamental no desenvolvimento e homeostase principalmente do SN durante a vida adulta. A possibilidade do NGF, associado às matrizes de nanofibras produzidas, gerar respostas celulares que melhorem o comportamento das CTMs, bem como estimulem sua diferenciação, é uma das principais abordagens do presente estudo.

### ***1.7 Diferenciação neural***

Diferentes protocolos de indução são utilizados com o intuito de promover uma diferenciação neural válida. No entanto, não há consenso sobre qual tratamento possa ser o mais eficaz para a diferenciação de CTMs em células de linhagem neural. A literatura é bastante vasta quanto aos meios utilizados e, em geral, as estratégias mais comuns são os meios de diferenciação baseados em compostos químicos ou em fatores de crescimento (Scuteri, 2011). Os compostos químicos mais comumente utilizados são BME ( $\beta$ -mercaptoetanol), BHA (hidroxianisol butilado), DMSO (dimetilsulfóxido), isometilbutilxantina, forskolina e ácido retinóico (Woodburry *et al.*, 2000; Kadar *et al.*, 2009; Soleimani *et al.*, 2010). Os estudos baseados em compostos químicos para a indução da diferenciação neural foram os pioneiros na tentativa de obter neurônios a partir de CTMs. Os dois primeiros estudos utilizando essa estratégia foram o de Woodburry e Deng (Woodburry *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2001).

Porém, outros autores atribuíram a rápida modificação morfológica das CTMs, bem como a expressão de marcadores neurais, à retração celular e alterações no citoesqueleto ocasionadas pela citotoxicidade gerada pelos compostos químicos utilizados no meio de indução neural, com o qual as células eram tratadas (Lu, Blesch and Tuszynski, 2004; Neuhuber *et al.*, 2004). Outros trabalhos reproduziram os protocolos de indução neural utilizados por Woodburry e Deng, constatando um alto índice de morte celular no protocolo de Woodburry. Além disso, as modificações apresentadas pelas células induzidas nos dois estudos testados eram transitórias, ou seja, o efeito causado pelo tratamento era reversível (Rismachi *et al.*, 2003; Neuhuber *et al.*, 2004). Análises eletrofisiológicas realizadas posteriormente, usando o mesmo protocolo de Woodburry, não identificaram propriedades excitatórias típicas de neurônios (Wenisch *et al.*, 2006; Barnabé *et al.*, 2009). Portanto, a maioria dos trabalhos utilizando os compostos químicos citados, até o momento, não foram capazes de demonstrar propriedades funcionais das células diferenciadas e colocam em dúvida seu uso com propósito clínico devido seu potencial tóxico.

Posteriormente aos estudos pioneiros sobre diferenciação neural e aos questionamentos acerca da sua validade e segurança, protocolos contendo FC passaram a ser mais comumente citados na literatura. Os FC mais utilizados nesses meios de indução são o EGF (*epidermal growth factor*, fator de crescimento epidermal), bFGF (*basic fibroblastic growth factor*, fator de crescimento fibroblástico básico), BDNF, NGF e NT-3. O EGF estimula o crescimento celular, a proliferação e a diferenciação ligando-se ao seu receptor

EGFR (Herbst, 2004). O bFGF foi o primeiro fator de crescimento utilizado em estudos relacionados à diferenciação neuronal de CTMs. Ele possui efeitos biológicos relacionados ao crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (Woodburry *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2008). O BDNF age sobre neurônios do SNC e SNP, ajudando na sobrevivência de neurônios existentes e estimulando o crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses. Já o NGF promove o suporte trófico para os neurônios, aos quais transportam a proteína retrogradamente para o corpo celular, contribuindo para o seu desenvolvimento e sobrevivência (Huang and Reichardt, 2001). A NT-3 possui capacidade de ativar dois dos receptores tirosina-quinase de neurotrofinas (TrkB e TrkC) e possui a função de auxiliar na sobrevivência e diferenciação de neurônios existentes, além de estimular o crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses (Maisonpierre *et al.*, 1990).

Os estudos utilizando os fatores de crescimento contribuíram para estabelecer a importância do microambiente na diferenciação neural (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000). Já em estudos posteriores foi possível constatar a influência sinérgica do substrato para a estimulação das CTMs a linhagem neural (Kim *et al.*, 2002). Os autores utilizaram fibronectina para cobrir a superfície onde as células seriam cultivadas com meio contendo FC e verificaram um aumento da diferenciação neural. Isso pode ser explicado pelo papel essencial das proteínas da MEC durante o processo de diferenciação celular. Uma grande vantagem do uso desses protocolos é que os FC, quando utilizados na concentração adequada, normalmente não apresentam potencial tóxico, permitindo que as células estejam viáveis para ensaios de avaliação eletrofisiológica (Scuteri, 2011).

Portmann-Lanz e colegas testaram três protocolos diferentes para a diferenciação de CTMs provenientes de tecidos placentários humanos em neurônios (Portmann-Lanz *et al.*, 2010). Chua e colegas submeteram as CTMs de sangue de cordão umbilical humano à indução neural (Chua *et al.*, 2009). O grupo de Nourbakhsh testou seu protocolo de diferenciação neuronal em CTMs provenientes de dentes decíduos esfoliados humanos (Nourbakhsh *et al.*, 2011). Todos os autores obtiveram sucesso em critérios morfológicos e na expressão de proteínas neurais tais como nestina, olig 2 (*Oligodendrocyte transcription factor 2*, fator 2 de transcrição de oligodendrócito), Gal-C (*Galactocerebroside*, galactocerebroside),  $\beta$ -III tubulina, NeuN (*Neuronal Nuclei*), MAP (*Microtubule-associated protein*, proteína associada à microtúbulo), NF-M (*Neurofilament medium*, neurofilamento de cadeia média), PSA-NCAM (*Polysialylated-neural cell adhesion molecule*, molécula de adesão celular neural polisialilada), TH (*Tyrosine hydroxylase*, tirosina hidroxilase) e GFAP. Em 2008, Arthur e colaboradores submeteram as DPSC à indução neural baseada em fatores

de crescimento e ácido retinóico (AR), constatando o aumento da expressão dos marcadores NF-M, NF-H (*Neurofilament high*, neurofilamento de cadeia pesada) e  $\beta$ -III tubulina. A avaliação funcional das células diferenciadas através de eletrofisiologia mostrou a presença de canais de sódio dependentes de voltagem e os ensaios *in vivo* foram capazes de mostrar a integração das células às redes neurais (Arthur *et al.*, 2008).

Os trabalhos que avaliam a diferenciação de CTMs sobre matrizes de nanofibras produzidas por ES, foco do presente trabalho, são ainda menos numerosos. Em 2009, Molamma e colegas induziram a diferenciação neural *in vitro* de CTMs de MO sobre matrizes de nanofibras de poli(L-ácido láctico)-co-poli-(3-caprolactona)/colágeno. O meio indutor continha compostos químicos e FC. Os autores observaram morfologia neuronal com prolongamentos multipolares e expressão de proteínas neuronais (NF-200 e nestina) avaliadas por imunocitoquímica (Molamma *et al.*, 2009). Çapkin e colegas compararam a neurodiferenciação entre CTMs de MO e ADSCs (CTMs adiposo derivadas, do inglês *adipose-derived mesenchymal stem cells*) sobre matrizes de PCL/PCL-colágeno, alinhadas e randomizadas. Para ambos os tipos celulares, os autores observaram maior expressão de marcadores para oligodendrócitos do que para neurônios. A intensidade da marcação de O4+ para as CTMs da medula óssea diferenciadas nas matrizes alinhadas (PCL-A) foi maior quando comparada aos outros grupos (Çapkin *et al.*, 2012). Já no estudo de Cho e colegas, a estratégia de ligar quimicamente um fator neurotrófico sobre as matrizes de nanofibras para estimular a diferenciação neural foi utilizada. Os autores testaram o efeito do NGF ligado à matriz, além do meio de indução contendo o mesmo fator, sobre o comportamento das células, aliado ao uso das matrizes alinhadas e randomizadas. A avaliação da expressão gênica constatou o aumento significativo da expressão para os genes neurais da nestina,  $\beta$ -III tubulina e MAP2, tanto em relação à presença NGF quanto ao alinhamento das matrizes. Ainda verificaram que o grau de alinhamento celular mostrou ser influenciado positivamente e de maneira significativa pelo alinhamento das matrizes de nanofibras (Cho *et al.*, 2010).

Portanto, o uso das matrizes de nanofibras para a regeneração nervosa representa uma alternativa que merece ser explorada por permitir aliar diferentes características que em conjunto podem estimular a diferenciação das CTMs e assim contribuir para o processo regenerativo de diferentes lesões do SN.

### ***1.8 Perspectivas clínicas dos dispositivos produzidos***

Nos Estados Unidos, 145.386 mil novos casos de pacientes atingidos por lesão raquimedular foram registrados pelo NSCISC (*National Spinal Cord Injury Statistical Center*) entre os anos de 2006 e 2011. No Brasil, os dados acerca dos pacientes acometidos por esse tipo de lesão são imprecisos. Estudos epidemiológicos realizados no país mostram como principais causas da lesão quedas e acidentes automobilísticos, sendo maior a prevalência em homens entre 20 e 40 anos. O trauma com lesão irreversível da medula leva à perda abrupta da rotina normal do indivíduo acometido, gerando sérias consequências ao paciente, à família e à sociedade (Campos *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2011). O dano neurológico inicial causado pela lesão leva a uma série de respostas celulares e bioquímicas ocasionando uma lesão secundária que inibe a regeneração nervosa causando a morte celular (Haugg and Oudega, 2006). Dentro da área da ET neural, as estratégias para amenizar esse processo são o reestabelecimento da função neuronal através do crescimento dos neuritos no sítio da lesão e direcionar o alongamento e a reinervação para seus alvos adequados permitindo a recuperação funcional (Thuret *et al.*, 2006; Del Bel, Silva and Miladinic, 2009). O foco também deve ser a promoção da sobrevivência neuronal e, ao mesmo tempo, a redução da resposta inflamatória para prevenir a formação da cicatriz glial, que impede o processo regenerativo (Willerth and Sakiyama-Elbert, 2007).

Em estudo prévio, realizado pelo grupo de pesquisa no qual o autor do presente trabalho está inserido, o uso de células mononucleares do sangue de cordão umbilical foi avaliado no tratamento da lesão raquimedular provocada por contusão em ratos wistar. Os resultados mostraram uma melhoria no processo de recuperação funcional após a lesão quando os animais foram tratados durante a fase aguda de lesão (1 h e 9 dias após a lesão) (Rodrigues *et al.*, 2012). O uso de CTMs do tecido de cordão umbilical humano para o tratamento do mesmo tipo de lesão também foi avaliado em um segundo estudo. Similar ao estudo anterior, os melhores resultados foram observados quando as CTMs foram aplicadas diretamente no local da lesão após 1h (Rodrigues *et al.*, 2011). Em ambos os casos, as CTMs parecem contribuir para a recuperação funcional através de neuroproteção. Esses resultados motivam o desenvolvimento de estratégias para o tratamento da lesão raquimedular mais tardia, em fase crônica, pois o uso dos dispositivos produzidos facilitará a permanência das CTMs no local da lesão. A hipótese considera que as CTMs serão estimuladas localmente por diversos mecanismos gerados pela interação com a MEC artificial e o microambiente, contribuindo para reparar o tecido lesado.

Outro tipo de lesão, a lesão nervosa periférica afeta aproximadamente 2,8% de pacientes acometidos por diferentes tipos de traumas nos Estados Unidos (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007). Existem vários tipos de lesão nervosa periférica que variam de acordo com a sua etiologia podendo estar associadas a traumas ou a patologias relacionadas, como o Diabetes Mellitus (Guimarães e Silveira, 2008). No tipo de lesão traumática mais grave do nervo periférico, a transecção completa da fibra nervosa, ocorre atividade aumentada de proteases no sítio da lesão levando a uma série de eventos degenerativos (Siqueira, 2007). Uma alternativa existente para esse tipo de lesão é o transplante autólogo, porém esse possui a grande desvantagem de levar a perda de função do sítio doador. Além disso, a recuperação funcional nem sempre é garantida com esta abordagem. A estratégia da engenharia de tecidos neural é o desenvolvimento de uma estrutura que sirva de “conduto” ou conduto nervoso permitindo o reestabelecimento das conexões perdidas, assim evitando a morbidade do sítio doador bem como a necessidade de duas incisões cirúrgicas (Schmidt e Leach, 2003; Orive *et al.*, 2009).

Nesse contexto, o uso de matrizes ou suportes celulares que facilitem o crescimento das fibras nervosas após a lesão através de estímulos adequados parece muito apropriado. As matrizes podem direcionar o crescimento neuronal e estimular a diferenciação. Além disso, esses dispositivos podem promover neuroproteção e minimizar processos inflamatórios, prevenindo a morte por lesão secundária. As células aplicadas no local da lesão sobre as matrizes de nanofibras poderão ainda substituir neurônios lesados e prover fatores neurotróficos adequados para a regeneração tecidual, podendo esses fatores de crescimento estarem associados à própria matriz produzida. Todos esses mecanismos podem ajudar no restabelecimento da estrutura neural original (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2007).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver matrizes com nanofibras alinhadas e matrizes com nanofibras randomizadas com e sem o NGF incorporado e avaliar a diferenciação neural, bem como o comportamento celular das CTMs cultivadas sobre estes dispositivos.

### 2.2 Objetivos Específicos

a) Padronizar a produção de matrizes de nanofibras pela técnica *electrospinning* de emulsão (fibras alinhadas e randomizadas) a partir do polímero PLGA com e sem o NGF incorporado.

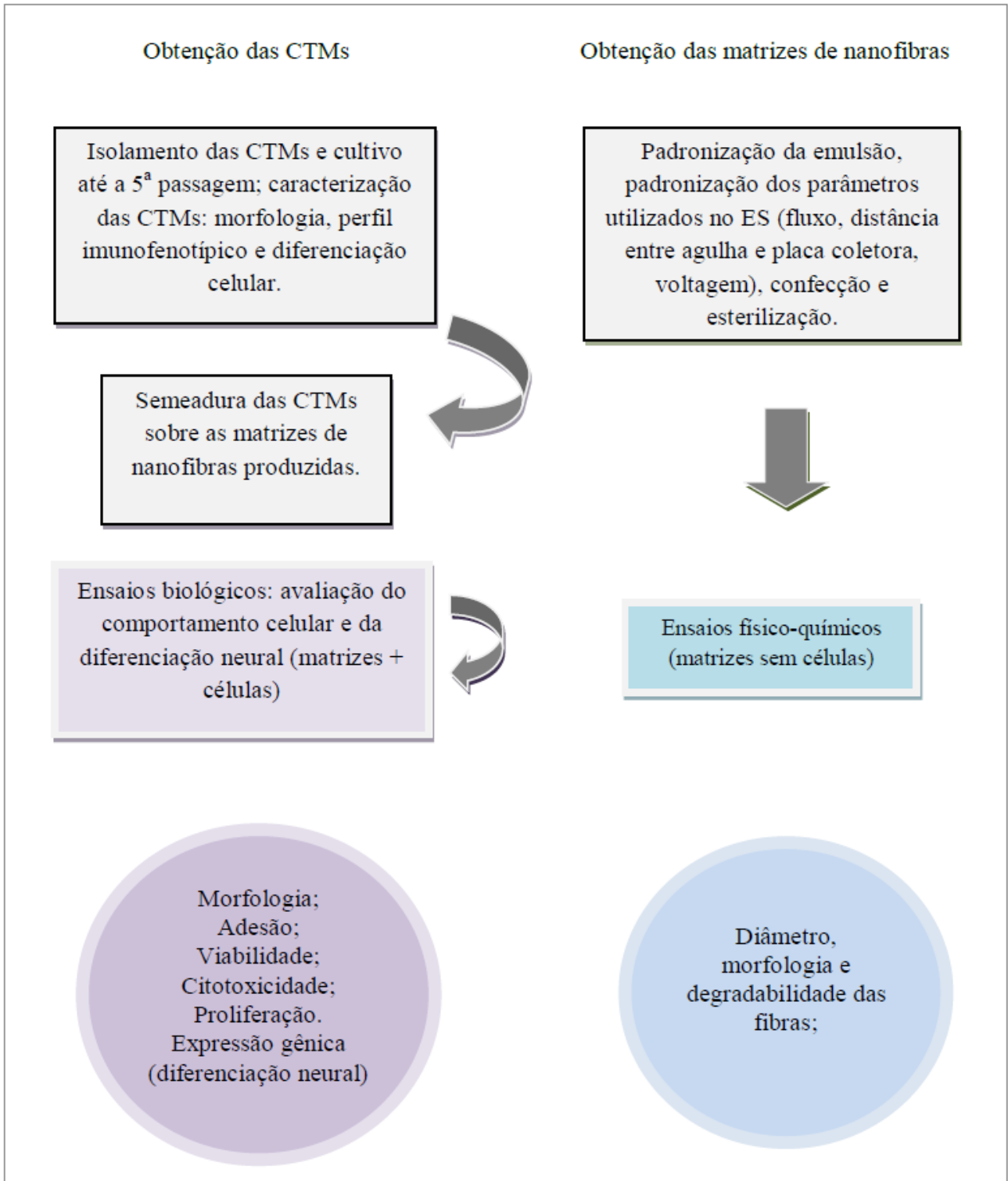
b) Caracterizar as propriedades físico-químicas das matrizes de nanofibras produzidas.

c) Isolar e caracterizar as células da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos. Posteriormente cultivá-las sobre as matrizes de nanofibras produzidas na primeira etapa e avaliar diferentes aspectos biológicos das CTMs obtidas.

d) Avaliar os critérios morfológicos de diferenciação neural das CTMs cultivadas sobre todos os grupos de matrizes produzidos e analisar a expressão dos genes neurais através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo Real (*real time PCR*).

O resumo dos objetivos do trabalho está representado na figura 2.





**Figura 2** - Esquema relacionando os objetivos e a metodologia desenvolvida durante o trabalho.

### **3. Artigo Científico**

O artigo apresentado a seguir será submetido ao periódico “*The International Journal of Developmental Biology*”

## **Neural differentiation of mesenchymal stem cells on scaffolds with nerve growth factor incorporated for tissue engineering applications**

Kerlin Quintiliano<sup>1,2</sup> ([kerlinquinti@gmail.com](mailto:kerlinquinti@gmail.com)); Thayane Crestani<sup>1,2</sup> ([thayc@gmail.com](mailto:thayc@gmail.com)); Davi Silveira<sup>1</sup> ([davi.silveira@hotmail.com](mailto:davi.silveira@hotmail.com)); Virginia Etges Helfer<sup>1</sup> ([Virginia.etges@ufrgs.br](mailto:Virginia.etges@ufrgs.br)); Annelise Rosa<sup>1,3</sup> ([annerr17@yahoo.com.br](mailto:annerr17@yahoo.com.br)); Eduardo Balbueno<sup>1</sup> ([eduardo.balbueno@ufrgs.br](mailto:eduardo.balbueno@ufrgs.br)); Daniela Steffens<sup>1,3</sup> ([dani\\_ste@hotmail.com](mailto:dani_ste@hotmail.com)); Geraldo Pereira Jotz<sup>2,4</sup> ([geraldo.jotz@terra.com.br](mailto:geraldo.jotz@terra.com.br)); Diogo André Pilger<sup>1</sup> ([dapilger@gmail.com](mailto:dapilger@gmail.com)); Patricia Pranke<sup>1,3,5</sup> ([patriciapranke@ufrgs.br](mailto:patriciapranke@ufrgs.br))

<sup>1</sup> Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, <sup>2</sup> Post-graduate Program in Neuroscience; <sup>3</sup> Post-graduate Program in Material Science, <sup>4</sup> Department of Morphological Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul; <sup>5</sup> Stem Cell Research Institute. Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence should be addressed to: Patricia Pranke  
Hematology and Stem Cell Laboratory  
Federal University of Rio Grande do Sul  
Faculty of Pharmacy  
Av Ipiranga 2752, Porto Alegre, Brazil  
Zip code: 90610-000  
Email address: [patriciapranke@ufrgs.br](mailto:patriciapranke@ufrgs.br)

## ABSTRACT

The use of mesenchymal stem cells (MSCs) in regenerative medicine, particularly when associated with the nervous system, requires alternatives with respect to cell application methods. Scaffolds produced by emulsion electrospinning act as supports for cell proliferation and differentiation, providing an alternative to reconstitute the damaged tissue. The process of neural tissue regeneration can be improved through the controlled release of neurotrophic factors such as NGF (Nerve Growth Factor), which plays a central role in neuron survival. Furthermore, surface characteristics of nanofibers, such as alignment, can stimulate neural differentiation. The main objective of this study was to develop aligned and random nanofiber scaffolds with and without NGF incorporated. The physico-chemical analyzes performed were morphology, fiber diameter and degradability. The biological parameters evaluated were cell morphology, adhesion, proliferation and viability, and cytotoxicity. The neural differentiation was quantified by measuring gene expression for the neural genes nestin,  $\beta$ -III tubulin and neuron-specific enolase. The scaffolds produced demonstrated a satisfactory environment for MSC growth, nontoxic, mimicking the ECM physical structure. MSCs cultured on scaffolds were able to adhere and proliferate, with better adhesion performance on aligned nanofiber scaffolds with NGF incorporated. The evaluation of neural differentiation of the MSCs indicated that all groups of scaffolds were able to upregulate neural genes expression. These findings show the potential influence of the chemical and topographical cues generated by these substrates. These features provided by the scaffolds permit proper MSC response to microenvironment, leading to neural genes expression, which could improve tissue regeneration when applied to nerve lesions.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, nerve growth factor, neural differentiation, tissue regeneration.

## ***Introduction***

One important type of adult stem cells are mesenchymal stem cells (MSCs), present in a great quantity of adult tissue. Some of the most studied tissues, which host MSCs, are bone marrow, adipose tissue, dental pulp and umbilical cord (Gronthos et al., 2000; Secco et al., 2008; Mosna et al., 2010). MSCs are considered by many researchers as pluripotent stem cells and can differentiate into cell types including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes (Pittenger et al., 1999), as well as neural precursors, neurons and glial cells as described by many authors (Kopen et al., 1996; Cho et al., 2005).

Among the non-invasive sources to obtain the MSCs, human deciduous teeth pulp is interestingly appropriate, since it is usually discarded after the natural process of tooth replacement, called exfoliation (Soares et al., 2007). Many researchers have succeeded in isolating highly proliferative MSCs derived from dental pulp, called dental pulp stem cells (DPSCs) (Rodriguez-Lozano et al., 2012). MSCs from human deciduous teeth pulp have a higher proliferation rate and ability to form colonies, compared to MSCs from bone marrow. Furthermore, they are able to express markers of neural precursors and glial cells, nestin and fibrillary acidic protein, respectively (Miura et al., 2003). Such cells have great potential for neural differentiation, a fact related to their neural crest origin, and they demonstrate neuroprotective characteristics when applied to neurological injuries (Wang et al., 2010). Therefore, the use of stem cells from human deciduous or permanent teeth pulp represents a promising alternative in relation to the treatment of trauma to the nervous system due to their inherent potential for neuronal differentiation (Govindasamy et al, 2010).

The use of MSCs for regeneration of neural tissue, such as spinal cord, retina, optic nerve and peripheral nerve has been recently reported (Kemp et al., 2008; Sahni et al., 2010; Dahlmann-Noor et al., 2010). However, when related to the nervous system, the use of these cells requires further alternatives mainly related to its application route. Neural tissue engineering fits this context in the search for alternatives to associate MSCs with biomaterials. These devices act as supports for cells, which remain longer in the site of application. Therefore, the strategy of neural tissue engineering is to facilitate nerve regeneration by combining an appropriate cell type with a specific biomaterial (Lee and Arinzeh, 2011).

In this sense, the use of scaffolds acting as support which can facilitate cell growth of nerve fibers after injury, through appropriate stimuli, seems very promising. The scaffolds can drive growth and stimulate neuronal differentiation. Additionally, these devices may promote neuroprotection and possibly minimize inflammation, therefore preventing secondary injury

death. The cells applied to the injury site on the nanofiber scaffolds may also replace damaged neurons and provide neurotrophic factors suitable for tissue regeneration. These growth factors may be released by MSCs or associated with the scaffolds produced. Besides this, the topographical features of scaffolds such as alignment, can direct MSCs to a neural fate. All these mechanisms may help in restoring the original neural structure (Gu et al, 2011).

This cellular support may be comprised of polymer matrices composed of nanofibers produced by the electrospinning technique, featuring a device where the stem cells can be grown, allowing for the development of the new tissue. The fibers produced by electrospinning can reach the nanometer scale, presenting a large surface area, facilitating cell adhesion and proliferation and mimicking structures necessary for cell survival similar to those present in the ECM (Martins et al., 2007). Thus, it has been considered the best alternative for the production of scaffolds for biological applications.

To improve cell behavior on scaffolds some alternatives can be used, such as bioactive molecules, which play an important role in the communication system between the cells and the microenvironment. The sustained release of these molecules through polymeric matrices applied to the regeneration of the nervous system has been studied recently (Xiaoqiang et al. 2010). As a model related to the nervous system, one of the best known bioactive molecules is the nerve growth factor (NGF). NGF is a member of the neurotrophins family, which includes brain-derived neurotrophic factor (BDNF), NT-3 and NT-4/5. It represents the first and best characterized neurotrophin yet discovered. NGF plays a central role in the development, maintenance and survival of neurons. Its use may facilitate cell proliferation and neuronal differentiation by modulating axonal growth, which is why it has been associated with potentially therapeutic approaches (Sofroniew, Howe and Mobley, 2001).

Most of the studies about MSC neural differentiation are carried out on two-dimensional surfaces (Arthur et al., 2008; Nourbakhsh et al., 2011). Just a few works have investigated MSC neural differentiation on nanofiber scaffolds produced by emulsion electrospinning. Due to their physicochemical properties, these devices are better able to mimic the three-dimensional cellular environment provided by the ECM (Larsen et al., 2006). The interaction between MSCs and extracellular microenvironment plays an important role in controlling differentiation via chemical, electrical and physical signals. MSCs can sense different stimuli on scaffold surfaces (chemical and topographical cues) and respond with appropriate signaling (Ilie et al., 2012).

The object of this work has been to develop aligned and non-aligned scaffolds with and without NGF incorporated and to test MSC behavior and neural differentiation on these

devices. The use of growth factors associated with tissue regeneration can be considered a recent approach, and the hypothesis is that the incorporation of NGF into aligned nanofiber scaffolds can best stimulate MSC differentiation, improving its application and accelerating the formation of new tissue.

## **Results**

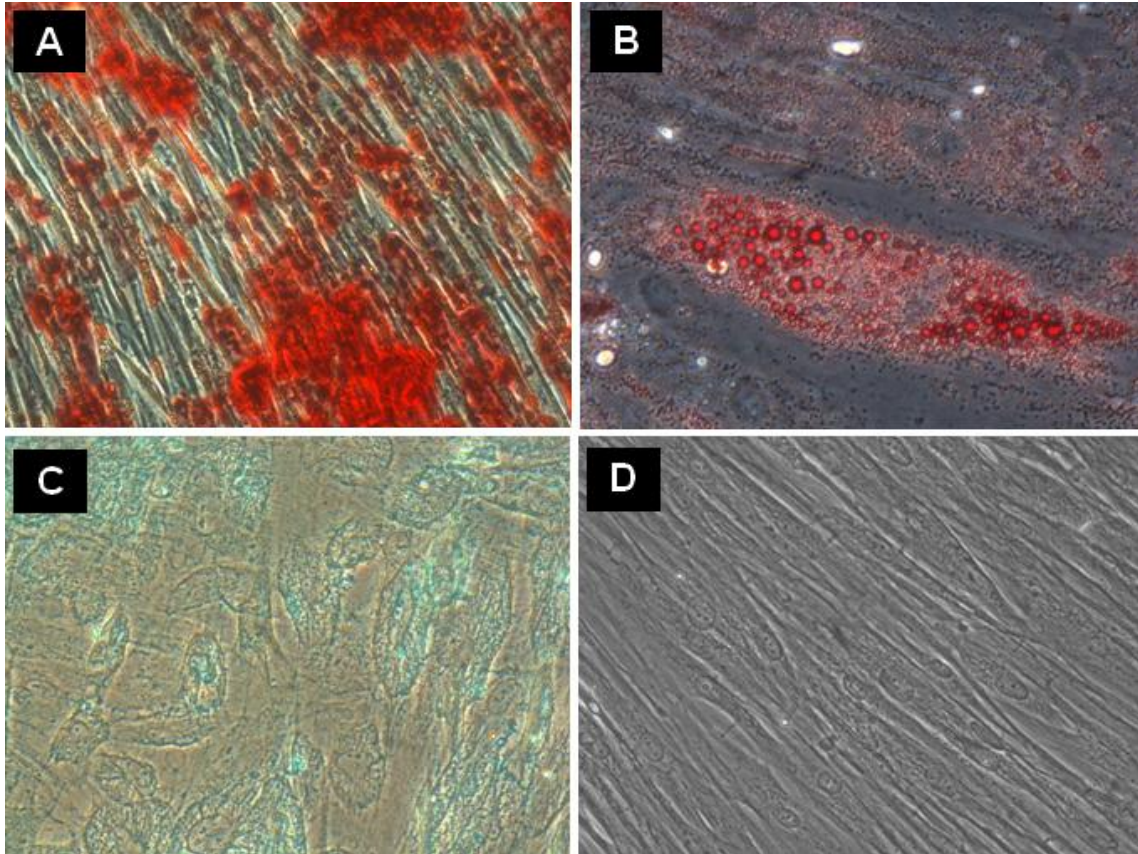
### **DPSCs from human deciduous teeth characterization**

The MSCs from human deciduous teeth were isolated, cultured and characterized successfully. The cells showed typical MSC morphology, characteristic of plastic adherence and positivity over 92% for the surface markers CD29, CD73, CD90 and less than 3% CD34, CD45 FITC, CD184 PE, HLA-DR FITC and STRO-1. Table 1 shows the percentage expression of each marker for the three samples.

**Table 1** - Immunophenotypic characteristics of DPSCs from human exfoliated deciduous teeth analyzed by flow cytometry. Expression in percentage for each marker (n=3). Results below 0.1% were considered 0.0.

Surface marker	Expression (%)			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average
CD29	95.5	99.0	100.0	98.2
CD73	99.0	99.0	99.8	99.3
CD90	98.4	99.7	99.6	99.2
CD44	92.1	85.5	98.9	92.2
STRO-1	1.0	0.5	0.9	0.8
CD14	5.3	0.8	0.0	3.0
CD34	0.0	0.4	0.0	0.2
CD45	0.1	0.4	0.0	0.2
CD184	0.0	0.0	0.0	0.0
HLA-DR	0.4	0.8	0.1	0.4

All samples were able to differentiate into the three mesodermal cell lineages analyzed (osteogenic, adipogenic and chondrogenic). Photomicrographs of a representative sample of the DPSCs from human exfoliated deciduous teeth differentiated cultures are shown in figure 1.

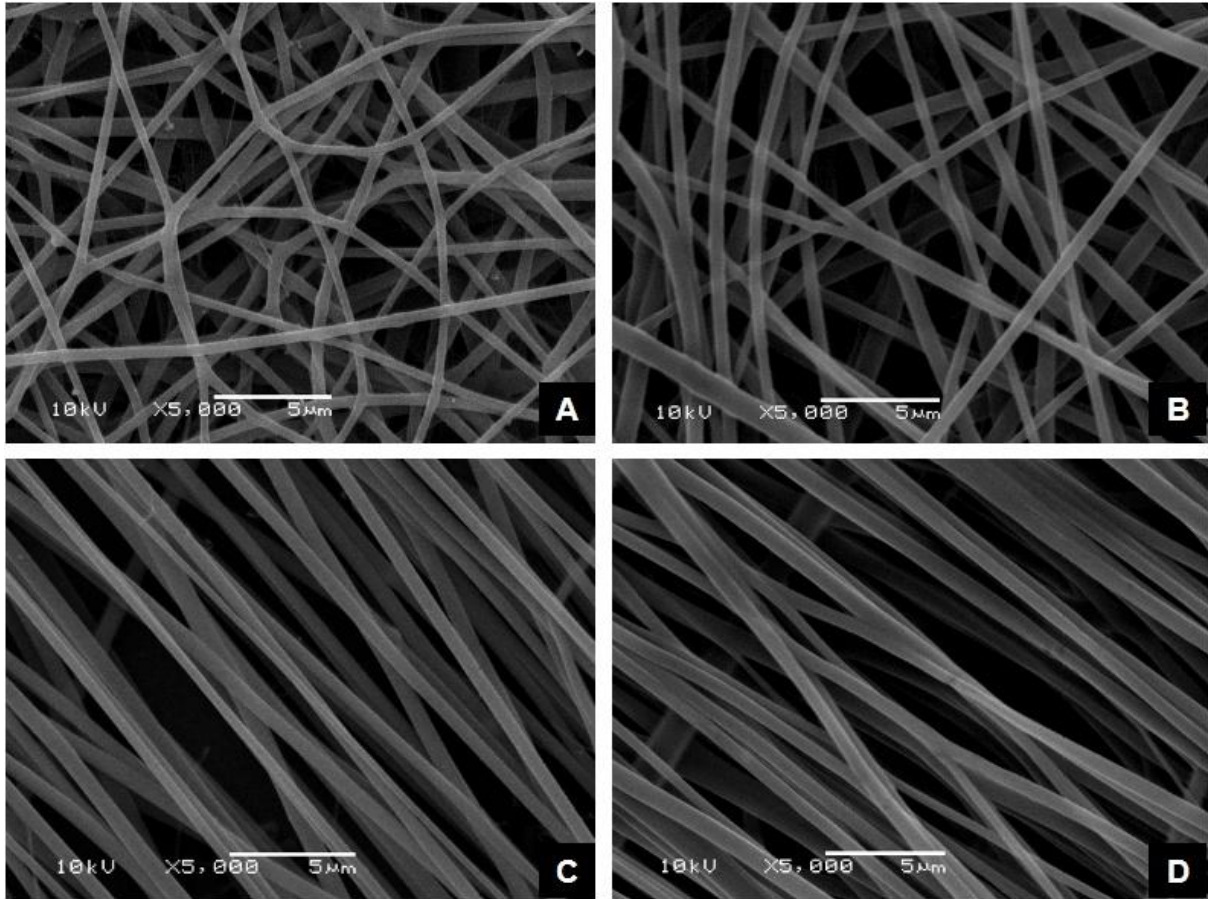


**Fig. 1. MSC differentiation potential into the three mesodermal lineages.** Differentiation of MSCs in the following lineages (A) osteogenic, (B) adipogenic, (C) chondrogenic stained with Alizarin Red, Oil Red and Alcian Blue. The cells cultured in MSC medium used as control (D). 400x magnification (figures B, C and D) and 200x magnification (figure A), n=3.

### Nanofiber Morphology and Diameter

SEM analysis showed that all scaffolds presented smooth well-formed fibers distributed aligned or randomly, with interconnected pores. Beading formation was not observed in any samples (figure 2). The average diameter  $\pm$  standard deviation of the nanofibers was  $610 \pm 174$  nm for RC scaffolds,  $585 \pm 109$  nm for RN scaffolds,  $548 \pm 78$  nm for AC scaffolds and  $543 \pm 128$  nm for AN scaffolds. The average fiber diameter in all the groups was not statistically different ( $P > 0.05$ , One-way ANOVA).

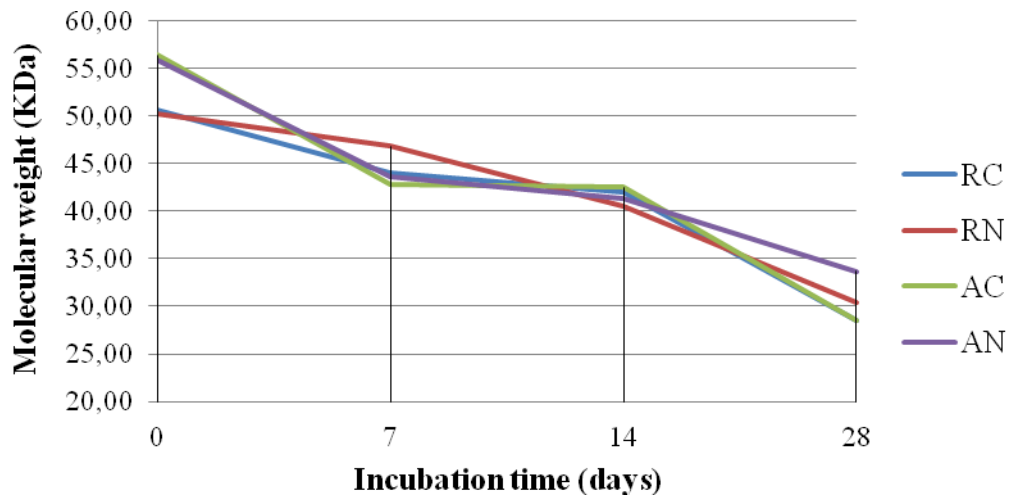




**Fig. 2. Nanofiber morphology.** SEM analysis showed smooth fibers with no beads for all the groups. It is possible to observe nanofibers arranged randomly: (A) RC and (B) RN; or aligned: (C) AC and (D) AN (5.000 x magnification, n=3).

### Scaffold Degradability

The degradation rates after 28 days of analysis were 43%, 39%, 43% and 39% for RC, RN, AC and AN groups, respectively. Analyzing the graph in figure 3, it is observed that the degradation process started before the 7<sup>th</sup> day for all groups. At this period, molecular chain breaking started, leading to a decrease in molecular weight. Although not significant, molecular weight loss percentual was more evident in the first 7 days for aligned nanofiber scaffolds when compared to random nanofiber scaffolds ( $12\pm 7\%$ ,  $6\pm 9\%$ ,  $24\pm 7\%$  and  $21\pm 12\%$  for RC, RN, AC and AN groups). After 14 days, the degradation rate was  $17\pm 6\%$ ,  $19\pm 6\%$ ,  $28\pm 13\%$ ,  $25\pm 10\%$  for the same groups.

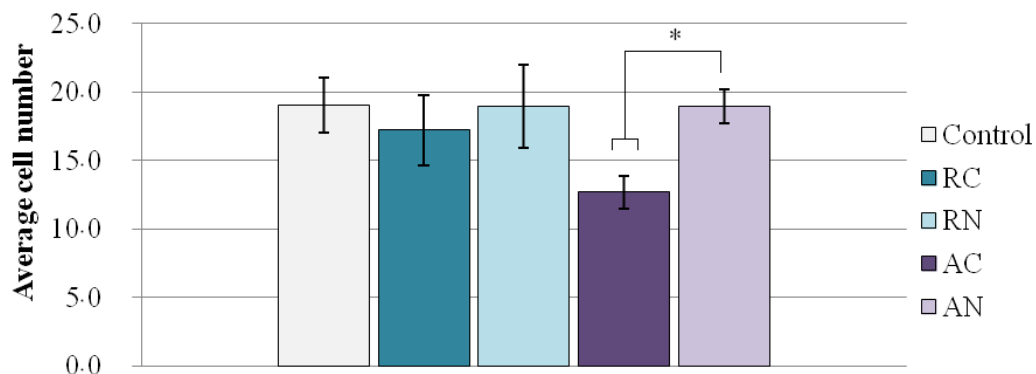


**Fig. 3. Scaffold degradability.** Molecular weight loss through nanofiber scaffolds was evaluated for 28 days by GPC analysis, n=3.

### Cell adhesion

Firstly, cell adhesion was assessed according to scaffold topography (random or aligned) and the presence or absence of NGF (One-way ANOVA). All tests were compared to control (MSCs cultured on wells). Independent analysis considering nanofiber alignment of scaffolds (RC, AC and control or RN, AN and control), showed MSCs higher tendency to adhere on RC than on AC. MSC adhesion on control, RN and AN was very similar.

The presence or absence of NGF was evaluated independently comparing the control, AC and AN and the control, RC and RN. MSC adhesion on AN was more effective in comparison to AC ( $P=0.028$ , One-way ANOVA). AN adhesion pattern was equal to the control ( $P>0.05$ ). Independent analysis for random nanofiber scaffolds (RC and RN) showed a similar adhesion pattern to the control ( $P>0.05$ ). When all groups were assessed together (Two-way ANOVA), these differences could not be detected. Figure 4 shows MSC adhesion for all groups.

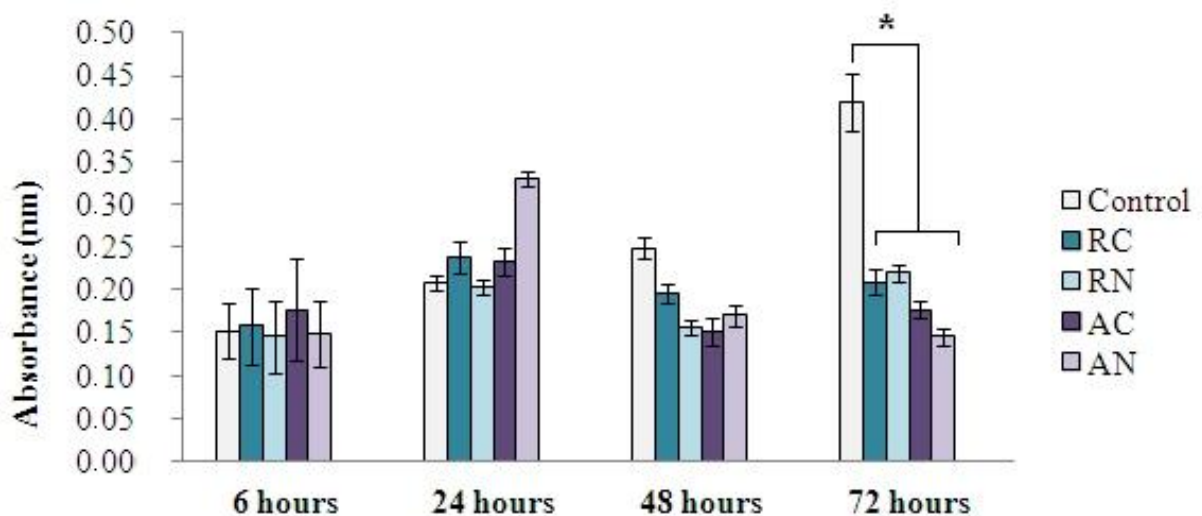


**Fig. 4. Cell adhesion assay.** The bars represent the average cell number on the control (MSCs cultured directly on wells), RC (random nanofiber scaffolds), RN (random nanofiber scaffolds

with NGF), AC (aligned nanofiber scaffolds), and AN (aligned nanofiber scaffolds with NGF). The average cell number difference between AN and AC was significant (\* $P < 0.05$  One-way ANOVA,  $n = 6$ ).

### Cell viability

MTT is reduced to formazan in viable cells, thus the level of reducing MTT into formazan can reflect the level of cellular metabolism and viability. At the first point of evaluation (6 hours), MSC average absorbance on scaffold groups (RC, RN, AC and AN) and control was very similar ( $P > 0.05$ ). After 24 hours, all groups showed a trend of increased cellular metabolism, although not statistically detected. Within 48 hours a slight decrease in absorbance was observed for scaffolds groups. After 72 hours, the average absorbance on scaffold groups remained the same in relation to 48 hours and different from control group ( $P < 0.05$ ). Figure 5 shows the time course of formazan accumulation in each group after 6, 24, 48 and 72 hours of MSC culture.

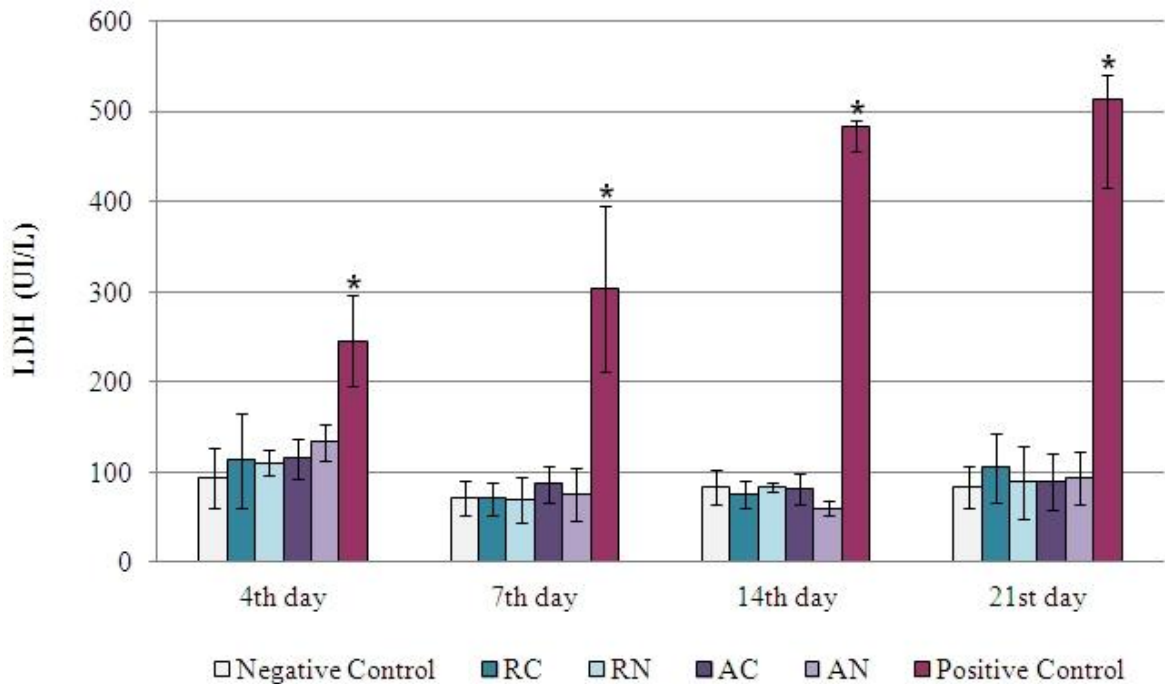


**Fig. 5. The MTT assay.** After 6, 24, 48 and 72 hours of culture on scaffold groups (RC, RN, AC, AN) and on control group (MSCs cultured on wells) MSCs were assessed for cell viability. Absorbance value corresponds to metabolically active cells (viable cells). At 72h, average absorbance values on scaffolds were lower than on the control ( $P < 0.05$ , Repeated measures test,  $n = 3$ ).

### Cytotoxicity

LDH concentrations measured for 21 days of cell culture are presented in figure 6. LDH dosages for all scaffold groups were similar to the negative control throughout all periods evaluated (4, 7, 14 and 21 days) ( $P > 0.05$ ). Furthermore, all the matrices showed LDH dosages much lower than the positive control (MSCs treated with TritonX-100 for 10

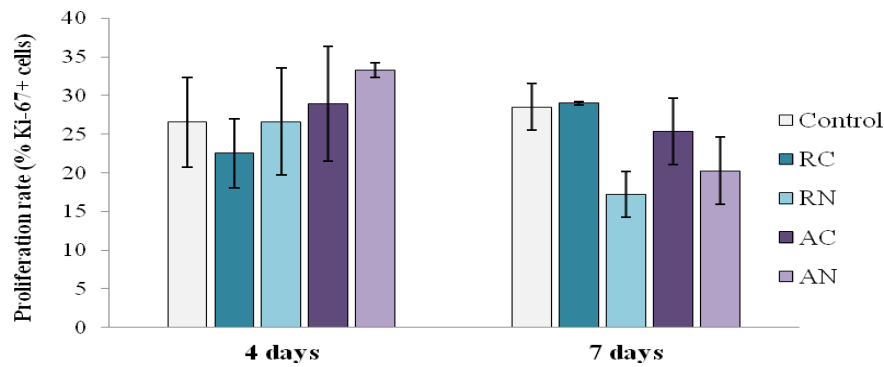
minutes) ( $P < 0.05$ ), which represents the maximum release of LDH, representing total cell death. Additionally, the positive control group showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) in LDH dosage during the evaluated period.



**Fig. 6. LDH dosage of MSC culture supernatant.** The cells were cultured on scaffolds (RC, RN, AC, AN) and directly on wells (positive and negative controls). Average LDH dosages for positive control were statistically higher than all groups in all evaluated periods ( $*P < 0.05$ , Repeated measures test,  $n=4$ ).

### Proliferation

MSCs proliferation rate between scaffold groups and control group were similar at both points evaluated (4 and 7 days). Although a decrease in MSC proliferation rate was observed on the seventh day for RN and AN groups, it was not significant ( $P > 0.05$ ), as showed in figure 7.

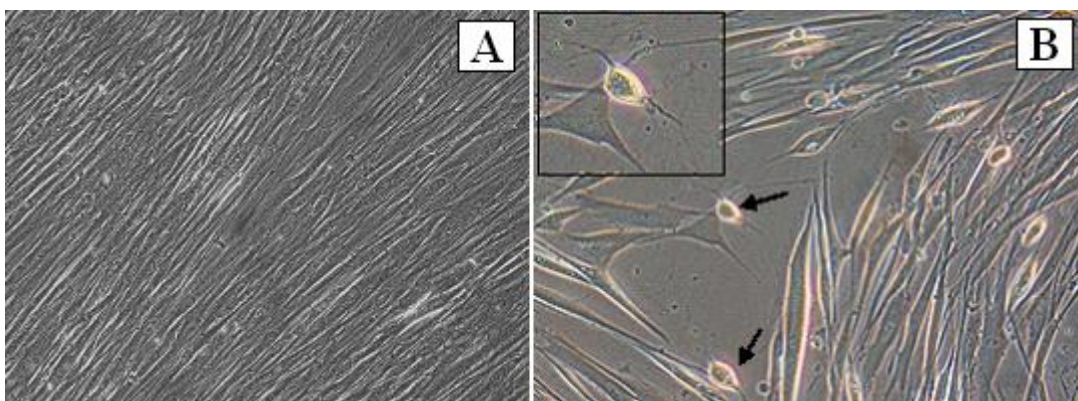


**Fig. 7. MSCs proliferation rate on scaffolds and control group.** MSCs were evaluated on 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days of cell culture. Proliferation rate differences between groups are not significant. (Repeated measures test, n=3).

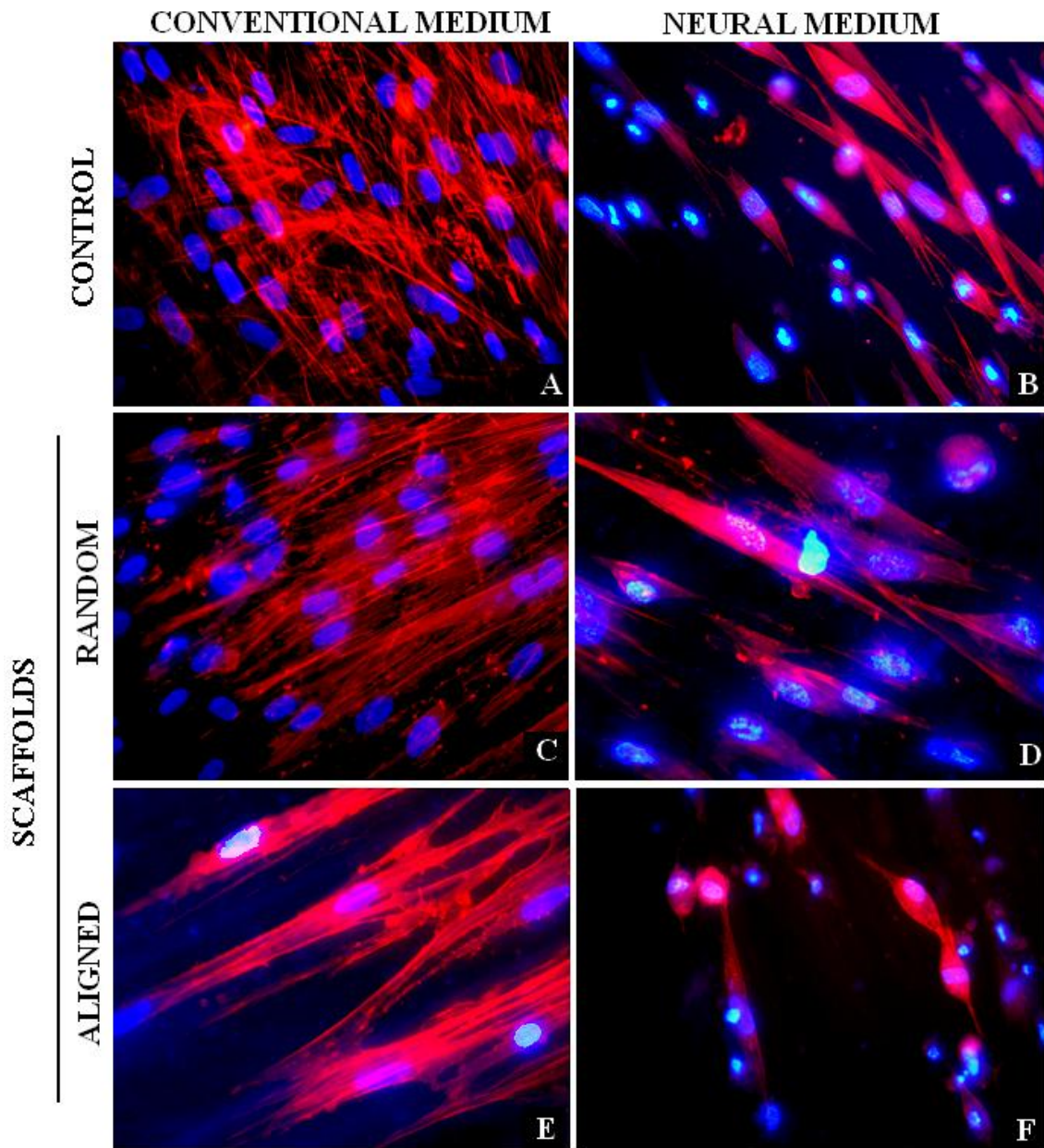
## Neural differentiation

### Cell Morphology

During the induction procedure (MSCs treated for differentiation during 21 days with neural induction medium), the cytoplasm in the flat cells initially retracted towards the nucleus and formed a contracted multipolar cell body which left membranous processes much like peripheral extensions. Over the subsequent days, most cells gradually lost their mesenchymal appearance and obtained a more neural appearance (highlighted in figure 8B). MSCs under neural induction on scaffolds were evaluated through a fluorescence microscope as shown in figure 9. After induction, a reduction in cell numbers was observed for all groups as observed in figures 8B, 9B, 9D and 9F. MSCs cultured on aligned scaffolds under conventional medium show a clear cell elongation following nanofibers alignment (figure 9E).



**Fig. 8. Phase-contrast microscopy of MSCs on tissue culture plates.** (A) MSCs cultured under conventional medium during 21 days, control group. (B) Neural-like morphology of MSCs after 21 days of neural induction (200x magnification).



**Fig. 9. MSCs morphology after 21 days of culture.** MSCs cultivated on tissue plates under conventional medium and under neural induction medium (**A, B**). Representative figure of MSCs on scaffold groups with random and aligned nanofibers cultivated with conventional medium (**C, E**) and under neural induction (**D, F**). DAPI + Phalloidin staining under fluorescence microscopy, 100x magnification.

#### Gene expression

After 21 days of neural induction, according to the protocol adapted from Arthur and colleagues (2008), the MSCs induced on tissue culture plates (TCPs) showed increased expression of NSE gene ( $P < 0.01$ ), while nestin and  $\beta$ -III tubulin gene expression was unchanged as demonstrated by the comparison of control and differentiated control groups.

The MSC behavior cultured on nanofiber matrices was analyzed separately considering prior induction.

First, gene expression evaluation of MSCs cultured on scaffolds with conventional medium (not inductive) showed a different pattern in relation to its control (MSCs cultured on TCPs with conventional medium). For the control group, MSCs expressed all evaluated genes similarly. When MSCs were cultured under these same conditions on all scaffold groups, the following results were observed comparing to the control group:

**Nestin:** MSCs cultured on different scaffold groups showed a similar upregulated gene expression (1.6 fold).

**$\beta$ -III tubulin:** the gene was downregulated in all scaffold groups ( $1.64 \pm 0.28$  fold), except for RC, which remained unchanged.

**NSE:** gene expression was upregulated ( $1.45 \pm 0.15$  fold) in aligned scaffolds. For other groups, it was unchanged.

When the MSC differentiation on scaffolds treated with neural induction medium was assessed and compared to MSCs on TCPs under the same induction protocol the results below regarding the control as the differentiated control group were as follows:

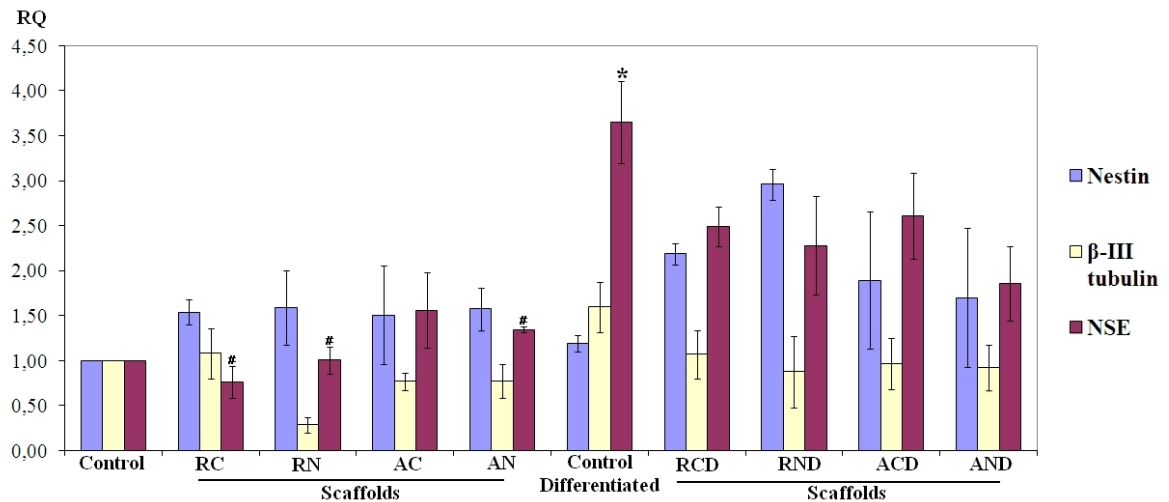
**Nestin:** the nestin expression on the MSCs was upregulated in all groups ( $1.82 \pm 0.46$  fold). This upregulation was most evident in RN scaffolds (2.47 fold).

**B-III tubulin:** the B-III tubulin expression on the MSCs was downregulated in all groups ( $1.67 \pm 0.15$  fold).

**NSE:** the NSE expression on the MSCs was downregulated in all groups ( $1.61 \pm 0.25$  fold). This downregulation was similar in RC, RN and AC scaffolds and even more pronounced in AN scaffolds (1.92 x).

By comparing gene expression for each group prior and after induction protocol for all scaffold groups, the expression of nestin and NSE on the MSCs increased after neural induction treatment. This increase was less evident in AN scaffolds. For  $\beta$ -III tubulin, gene expression increased or did not change.

It is noted that for all analyzes of gene expression previously mentioned, the only significant increase was the NSE gene expression for control and differentiated control groups (MSCs on TCPs prior versus after neural induction). Although increases or decreases were observed for the other groups in relation to their respective control, they did not show significant differences.



**Fig. 10. MSC gene expression on scaffolds and control groups.** Real time-polymerase chain reaction analysis of total RNA isolated from four independent samples exposed to neural and control medium conditions on TCPs and scaffold groups, expressed as average RQ value. MSCs cultured on scaffold groups with conventional medium: RC, RN, AC, AN. MSCs cultured on scaffold groups under neural induction medium: RCD, RND, ACD, AND. MSCs on TCPs under conventional medium (control) and induction medium (differentiated control) were used as controls. The evaluated genes were Nestin, NSE and  $\beta$ -III tubulin. Samples were normalized to control gene *GAPDH*. NSE gene expression was significantly upregulated after neural induction in differentiated control in comparison to the control group (\* $P < 0.05$ ), RC, RN and AN (# $P < 0.05$ ), Two-way ANOVA,  $n = 4$ .

### Discussion

#### *Isolation, culture and characterization of mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth pulp*

In this study, MSCs were isolated from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. This source of MSCs has become quite feasible because it is not invasive and the material is usually discarded after the natural process of exfoliation. The protocol described by Bernardi and colleagues (2011), used to obtain the MSCs, was reproduced successfully. MSCs were isolated and characterized in accordance with the criteria established by International Society for Cell Therapy, presenting plastic adherence and characteristic immunophenotypic profile, shown by high expression of mesenchymal markers and low or absent expression for hematopoietic lineage markers. All MSC samples analyzed by flow cytometry differentiated into the three mesodermal lineages, showing pluripotency characteristics. Therefore, the cells studied in this work under the experimental conditions used, met the criteria to be considered as mesenchymal stem cells.



### *Nanofiber production and characterization*

Many factors inherent for ES technique have been established, such as polymer solution concentration, flow rate, applied voltage, needle diameter, distance between the needle and the collector plate, and others. For aligned nanofiber production, the cylinder rotational speed was varied to obtain maximum orientation, maintaining the same parameters mentioned above. The effective alignment of the fibers was observed at 2.500 rpm. The control of environmental factors such as humidity and temperature were also essential for obtaining fibers with homogeneous characteristics. It was then possible to observe fiber formation for aligned and random groups, confirmed by SEM analysis. Fiber diameter results showed fibers produced in nanometric scale (nanofibers) for all scaffold groups.

The homogeneity of the average diameter between scaffold groups was observed and represents an important factor to evaluate cell behavior. Some studies report the influence of fiber diameter in adhesion, migration, cell differentiation and activation of cells associated with the inflammatory process (Christopherson et al., 2009; Wang et al. 2010; Saino et al, 2011). Furthermore, the average diameter achieved by nanofibers produced in this study was  $567 \pm 121$  nm, which is similar to fiber diameters presented by the ECM (100-600 nm). This similarity with the ECM nanofibers allows adaptation, organization and maintenance of cellular functionality (Ye and Mahato, 2008). Therefore, the scaffolds produced have characteristics very similar to each other and are able to mimic the physical structure of the ECM.

### *Scaffold Degradability*

Recently, the devices produced by TE techniques for NS lesion repair, consider the following criteria regarding the degradation profile: to remain intact until axons can fill the empty space left after injury and then degrade gradually with minimal reaction and swelling. High degradation rates could leave regenerating axons vulnerable. Low degradation rates can lead to nerve compression and/or immune reactions (Gu et al. 2011). In this study, the average degradation rate observed for all scaffold groups after 28 days of incubation was similar, about 41%. This high degradation rate could have been favored by aqueous phase adding to the polymer solution, increasing the polymer hydrophilicity. Importantly, the *in vivo* degradation rate tends to increase due to other factors provided by the microenvironment (Wu and Ding, 2004).

The observed results should match their possible clinical applications. In peripheral nerve injuries, proliferation of Schwann cells in the distal stump occurs 3 days after axonal

damage caused by injury. This proliferation is associated with the production of certain substances that can recruit growing axons (Siqueira, 2007). In spinal cord injuries, after the initial trauma, the spinal cord undergoes pathological changes over time. Within minutes of hemorrhage, loss of microcirculation and vasospasm result in a concentric expanding lesion which lasts throughout the acute phase - approximately 3 days (Hagg and Oudega, 2006).

Therefore, the two matching examples for scaffold application *in vivo* exhibit characteristics that immediately require both trophic and physical support, maintaining scaffold activity for a few days. The trophic support will probably be provided by the presence of the growth factor in the scaffold (NGF) which will be released during the degradation process, assisting cell survival and axonal maturation.

### *Cell adhesion*

To proliferate, migrate and differentiate, the MSCs must first adhere to their substrate. Therefore, the adhesion is the first step in the development of a new tissue. Several key proteins in cell adhesion process show significant adsorption to nanofiber scaffolds. After adsorption, these molecules interact with the MSCs via integrin receptors. In the present study, MSCs were capable of adhering to the substrates produced independent of their characteristics. The best MSC adhesion on aligned scaffolds containing NGF when compared to their respective controls ( $P = 0.028$ ) could be related to increased bioactivity and hydrophilicity caused by the growth factor presence. There are several mechanisms by which integrins and growth factors cooperate to control cell behavior. Staniszevska and colleagues (2008) reported specific binding of an integrin subtype ( $\alpha 9\beta 1$ ) to NGF and other neurotrophins. The interaction of this integrin with its ligand (NGF) induced activation of a protein involved in focal adhesion, which in turn stimulated cell scattering (Staniszevska et al., 2008). Thus, in aligned scaffolds with NGF, it is clear that somehow the presence of growth factor improved the MSC interaction with the substrates produced.

Although there was no significant difference, aligned scaffolds compared to random scaffolds showed a lower tendency to cell adhesion (independent comparison between RC, AC and control groups). In a study evaluating the cellular behavior of monocytes, Cao and colleagues (2009) observed higher cell adhesion on random nanofiber scaffolds in relation to aligned nanofiber scaffolds. The justification for such behavior was the large gap observed between the aligned fibers, which decreased nanofiber surface area, hindering initial cell adhesion (Cao et al, 2009). Therefore, the high contact surface of scaffolds promotes the

appropriate environment for MSCs, comparable to tissue culture plates, which is considered a great surface for the cultivation and expansion of these cells.

#### *MSC viability*

An important step for the development of scaffolds for TE is to evaluate their biocompatibility. The MTT colorimetric assay is a widely used method to evaluate MSC viability cultured on these structures. The assay is based on absorbency generated by formazan dissolved crystals (formed in live cells), and it is proportional to the number of viable cells. In this study, the MSCs cultured on nanofiber scaffolds showed similar viability throughout the evaluated period. The MSCs grown on scaffolds showed lower absorbance when compared to the control in the last time period (72 hours), possibly indicating cell number increase only for control group in relation to 48 hours. It was not possible to observe a clear trend of increased absorbance in scaffold groups over the time (effect evident only in the control group).

Qi and co-workers (2011) showed that during the MTT assay, a portion of the dissolved formazan is absorbed by the nanofibers, leading to a false negative result for cell viability. During the 3 days of analysis, the dye percentage absorbed by nanofibers resulted in a variation of 35.6-50.2% from the real value of cell viability. Further, the viability assessment by MTT did not relate to the cell morphology analysis by SEM. The author suggests a correction method based on the quantification of the MTT formazan dye sorption. Thus, in this work, in very similar conditions to the experimental study mentioned above, there may be an increased number of metabolically active cells present in the scaffolds, but these were not efficiently detected by MTT assay. It is important to consider this hypothesis, as the results of cell viability were not consistent with the satisfactory results obtained for MSC adhesion on scaffolds, which were very similar to the control. Other tests for cell viability evaluation have the same principle, such as MTS, and would also result in low detection efficiency.

#### *Cell proliferation*

MSC proliferation rate assessed by Ki-67 positive cells was very similar between groups at the first point of analysis. At the second point, a trend decrease in proliferation rate was observed for the scaffold groups containing growth factors. Although not significant for the sample studied, this behavior would indicate a certain commitment to cell differentiation, whereas NGF present in the nanofibers can influence neuronal differentiation (Cho et al.,

2010). This behavior is already expected for cells that are committed to differentiation rather than their proliferation rate (Arthur et al., 2008).

Therefore it is suggested that the scaffolds produced promote an appropriate cellular environment in which the MSCs are able to maintain their proliferation rate similar to that observed for tissue culture plates, considered the gold standard for cellular behavior evaluation.

### *Cytotoxicity*

The scaffold cytotoxicity was assessed by measurement of LDH enzyme. Increased concentration of LDH is proportional to increased cell death (Steffens et al., 2012). The devices produced were adequate for cell culture, since they showed LDH levels very similar to negative control. Therefore, by the results shown, it can be suggested that the scaffolds produced have nontoxic features, not causing cell damage that could trigger the activation of mechanisms related to MSC death.

### *Neural differentiation*

In this study, the MSCs derived from human exfoliated deciduous teeth underwent neural differentiation using the protocol adapted from Arthur and colleagues (2008). After induction, the presence of cells with neuronal appearance, reduction in cell numbers (visually) and increased expression for neuronal markers, indicated that the neural differentiation of MSCs was carried out successfully. Arthur and colleagues (2008) evaluated the neural differentiation of DPSCs on TCPs and observed a significant increase in gene expression for mature neurons markers (NF-M and H). The expression of early neural and immature neuron markers (nestin and  $\beta$ -tubulin III) was similar after induction compared to untreated DPSCs. In this study, MSCs from another source, the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth, were capable of responding in a similar manner to neural induction as suggested by morphology and increased NSE gene expression (present in mature neurons) and maintenance of nestin and  $\beta$ -tubulin III expression.

Studies carried out to assess MSC differentiation on scaffolds with nanofibers produced by emulsion ES into neural lineages are not frequent. Thus, comparison of results obtained from similar studies becomes quite limited. Capkin and colleagues (2012) also evaluated MSC neural differentiation on aligned and randomized nanofiber scaffolds. MSCs were treated for 14 days and induction medium was basically composed of growth factors (EGF and bFGF). The neural differentiation potential of two distinct types of MSCs (BM and

ADSCs) was assessed and BM MSCs showed the best results. They showed an increase for oligodendrocytes (O4) immunofluorescence staining on aligned nanofiber scaffolds. Despite the differences, the study was also able to show the MSC ability to differentiate into neural precursor cells on different types of nanofiber scaffolds (Capkin et al., 2012). The MSC neural differentiation on TCPs, which normally is considered standard to show cellular behavior, was not investigated by Capkin and colleagues. This fact prevents the evaluation of the differences of the MSC cultures on the scaffolds when the cells are exposed to the signals provided by the structural features of the scaffolds.

However, it is important to note that the two-dimensional culture on TCPs, although normally showing more homogeneous and better controlled results, is not an ideal control since it does not have several characteristics inherent to the produced three-dimensional devices, which mimics in some aspects the natural ECM (Larsen et al., 2006; Jiang et al., 2011). In this study, we observed that MSCs cultured on nanofiber scaffolds can change the analyzed genes expression in comparison to TCPs. Although these differences are not significant for the sample studied, it is possible that the interaction between MSCs and nanofiber scaffolds can increase or decrease the expression of the neuronal genes analyzed as a result of physical and chemical signals present in these three-dimensional devices (Ilie et al., 2012).

MSCs cultured on the scaffolds showed a similar up-regulation for nestin gene expression. Nestin is an intermediate filament protein expressed in dividing cells during the initial phases of the development of the CNS and PNS and other tissues. During the process of differentiation, the expression of nestin tends to decrease followed by replacement of more specific intermediate filaments (Michalczyk and Ziman, 2005). Therefore, enhanced nestin expression can indicate a greater number of neural precursors, still in an earlier stage of differentiation. This effect is even more evident when the MSCs undergo differentiation through specific neural medium, especially in RN scaffolds. It seems that the growth factor plays a synergistic effect with differentiation medium particularly related to nestin gene expression. Although the cells show a more immature development stage, increase in this gene expression indicates response to neurotrophic induction stimuli which subsequently may be converted to the increased expression of early and mature neuronal markers such as  $\beta$ -III tubulin and NSE (Abrous et al. 2005).

For aligned scaffolds not treated with induction medium, the MSCs showed up-regulation in NSE gene expression which is normally present in mature neuronal cells. This increase may be related to the stimulus provided by the surface alignment of nanofibers. Some

studies investigate the role of topographical cues and their role in MSC differentiation into neural lineages (Jiang et al., 2011; Capkin et al., 2012). It is known that substrate characteristics can lead to cellular responses detected by cytoskeleton changes which trigger cell signaling that can generate different MSC behaviors, such as differentiation (Zhang and Kohn, 2012). Thus a part of the MSCs cultured on the aligned scaffolds in this study might possibly be initiating the process of neural differentiation.

The increased MSC expression for NSE and nestin in all scaffold groups under induction medium, possibly indicates different stages of differentiation. A subpopulation of MSCs could be expressing genes for neural precursors and another subpopulation for mature neuronal cells, or the same subpopulation could be coexpressing these genes in different ratios according to their maturation stage.

The MSCs from human exfoliated deciduous teeth cultured on TCPs showed a differentiation pattern consistent with a population of neuronal cells at advanced stage of maturation. This pattern is presented by NSE upregulated gene expression in relation to control (3.65 x), unchanged for nestin gene (1.20 x) and slightly upregulated for  $\beta$ -tubulin III gene (1.60 x). When MSCs were induced on scaffolds, they did not show this same behavior. However, the signaling pathways generated by MSC receptors on more complex surfaces (scaffolds) are different from those on two-dimensional surfaces (TCPs), influencing cell behavior and differentiation. TCPs do not mimic natural ECM in many aspects (Larsen et al. 2006). Thus, we can infer that the different groups of scaffolds produced are able to promote a microenvironment suitable for MSC differentiation into neural lineage cells. Even though these results are consistent with those previously reported in the literature, it is possible that a larger sample size or even a greater induction time can detect these differences more clearly.

Even though there is indication by morphology and expression of neuronal genes that at least a proportion of the MSC population responds to differentiation, we must consider that these criteria cannot be used alone to define the fate of the MSCs as a neural cell. As the results show a greater propensity of induced MSCs to neuron precursors, more criteria should be evaluated to consolidate data, such as assessing glial lineage gene expression and evaluating functionality of these differentiated cells through electrophysiological assays. These criteria are important to determine the effectiveness and safety of the protocols tested, since most of the studies do not present a complete evaluation in relation to the functionality of these cells, vital for its future clinical application (Reh, 2002).

Therefore, additional studies and the association of various methods to differentiate MSCs into neural lineage are necessary to effectively generate a functional cell, fulfilling the

criteria, for example, of a functional neuron. Moreover, we believe that the development of devices which permit association of different stimuli (physical and/or chemical) that contribute to the differentiation process, or which can simply mimic the microenvironment provided by ECM, is an interesting alternative. Thus, the stimuli provided by the artificial ECM, combined to the environment where the MSCs are located in the body, may be sufficient to determine its fate, strongly contributing to the regenerative process.

### *Conclusion*

In the present study, scaffolds of aligned and random nanofibers, with and without NGF incorporated, were successfully produced and characterized according to their morphology, orientation and physicochemical properties. MSCs from human exfoliated deciduous teeth were characterized and cultured on all scaffold groups produced and interacted successfully with their artificial matrix according to the biological parameters evaluated.

MSCs cultured on scaffolds were viable throughout the period evaluated, and the scaffolds did not cause cytotoxicity during cultivation for 21 days. MSCs undergoing neural differentiation cultured on all scaffold groups presented different morphology than controls and showed a decrease in cell numbers. It was possible to observe oriented MSC organization on aligned nanofiber scaffold groups, both under neural induction and their respective controls. Through gene expression evaluation it was observed that MSCs responded to neural induction on all groups of scaffolds produced. The influence of NGF presence in scaffolds was noted for RN group under neural induction through upregulation of nestin gene. On the other hand, alignment influence was demonstrated by upregulation of NSE gene on scaffolds with aligned nanofibers under conventional culture conditions.

The results demonstrate that the association between MSCs and scaffolds produced by emulsion ES is feasible and can provide benefits related to the behavior of MSCs. When the scaffolds are associated with chemical and topographical cues, they can still optimize cellular response in relation to tissue damage by promoting the regeneration process. Thus the union of these components (MSCs and scaffolds) is a strategy to promote a friendly environment that tries to mimic the native structure of the ECM to the maximum in both its physical and chemical aspects. Thus, the main limitations that relate to tissue repair can be controlled more effectively compared to the isolated use of the MSCs.

Furthermore, even if the MSCs applied alone at the lesion site can act releasing FC, a very large number of cells is required to release a small amount of growth factor. This fact can be limiting for cell therapy. Therefore, the amount of growth factor released in 24 hours through the scaffolds produced does not need to exceed 100 pg to become more efficient than the action of  $10^6$  cells (Parekkadan and Milwid, 2010). This shows the great advantage to associate MSCs and scaffolds through TE.

This data suggests that the association between MSCs and scaffolds is an appropriate candidate for further evaluation as neural tissue engineering strategies, using animal models, which could open an innovative approach for the treatment of nervous system lesions.

## ***Materials and Methods***

### **Isolation of stem cells and cell culture**

The mesenchymal stem cells were isolated from human exfoliated deciduous teeth pulp. The samples of deciduous teeth were obtained in partnership with the Post-Graduate Program of Odontopediatrics from the Federal University of Rio Grande do Sul. Fresh dental pulp was harvested from deciduous teeth in resorption of six donors (n=6). Patients' guardians signed a consent form approved by the ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul under number n° 19273. Immediately after collection the teeth were immersed in 1mL MSC culture medium, consisting of DMEM/Hepes (Sigma-Aldrich), 10% Bovine fetal serum (Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 0.45µg/mL gentamicin. The dental pulp was carefully separated from the tooth tissue in a laminar flow and digested in a 0.2% solution of collagenase type I (Invitrogen) as described by Bernardi and colleagues (2010). The cells from one tooth were seeded onto one well of a 12 well plate. The medium was replaced after 24 hours in order to isolate adherent cells and thereafter it was refreshed once every 3 days to allow further growth; the cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> until they reached 90% confluence. After reaching confluence, the cells were detached with trypsin-EDTA 0.5% solution (Sigma-Aldrich), and re-seeded at a density of 3.000 cells/cm<sup>2</sup> until they reached the 3<sup>rd</sup> passage, when they were cryopreserved for further use in the experiments. For this, MSCs were detached with trypsin-EDTA 0.5% solution (Sigma-Aldrich), centrifuged and resuspended in cryopreservation medium (90% FBS and 10% DMSO) at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. MSCs were maintained under -20C° for 1h and then under -80C° for 24h. The MSCs were then stored in nitrogen prior to their use in the experiments. At the moment of their use, the MSCs were



thawed and expanded until they reached the 5<sup>th</sup> passage for use in the experiments described below.

### **DPSCs from human exfoliated deciduous teeth characterization**

#### **Immunophenotypic profile**

The immunophenotypic profile of DPSCs from human deciduous teeth was performed immediately after cell dissociation with Trypsin/EDTA and posterior incubation with specific monoclonal antibodies. The cells were counted, resuspended in PBS buffer at  $10^6$  cells/mL and incubated with the following human antibodies: anti-CD14, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD146, anti-CD184, anti-Stro-1 and anti-HLA-DR (Becton Dickinson, San Diego, CA). The antibodies were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE). After 30 minutes incubation in the dark, the cells were washed with PBS 1x to remove unbound antibody excess. Appropriate isotype controls were used and exclusion of dead cells was performed by incubation with 7-Aminoactinomycin D (7AAD). The analyses were performed on flow cytometer FACS Aria III (Becton Dickinson) and analyzed by FACSDiva software, version 6.0. The graphs were generated in the WinMDI, version 2.8.

#### **Cell differentiation in vitro**

The cells were evaluated at the 5<sup>th</sup> passage of cell culture for their capacity to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes through induction medium, previously described by Bernardi and colleagues (2010).

#### **Adipogenic differentiation**

The cells were cultured for 2 weeks in IMDM medium containing 20% human plasma, dexamethasone ( $10^{-7}$ M), insulin ( $2.5\mu\text{g/mL}$ ), indomethacin ( $5\mu\text{M}$ ), rosiglitazone ( $5\mu\text{M}$ ) and sodium heparin (10 units/mL). The deposits of lipid droplets were observed under an optical microscope after Oil Red O staining.

#### **Chondrogenic Differentiation**

For chondrogenic differentiation, the cells were cultured in differentiation medium for 30 days. The inducing medium consisted of DMEM supplemented with 15 mM Hepes,  $6.25\mu\text{g/mL}$  insulin,  $10\text{ng/mL}$  TGF- $\beta$  1 and  $50\text{nM}$  solution of ascorbic acid 2-phosphate (ASAP). The chondrogenesis was made apparent by Alcian Blue staining.

#### **Osteogenic differentiation**

The DPSCs from human deciduous teeth were cultured for 3-4 weeks in a supplemented medium containing fetal bovine serum (10%), dexamethasone ( $10^{-8}$ M), ascorbic acid 2-phosphate ( $5\mu\text{g/mL}$ ) and  $\beta$ -glycerophosphate (10mM). The deposition of mineralized matrix was observed by Alizarin Red S staining.

### **Nanofiber production**

The nanofiber production comprised of an organic phase consisting of PLGA - poly(lactic-co-glycolic acid) 15% (w/w), 0.2% Span-80 and 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma-Aldrich) and an aqueous phase consisting of 0.1% of BSA 5% in PBS. To the scaffolds containing NGF incorporated, the growth factor (GF) was added in the aqueous phase at a final concentration of  $1\mu\text{g/mL}$ . BSA was used in order to stabilize the GF when in contact with the organic solvent. PLGA/BSA scaffolds were produced in the same way as described above except for the presence of NGF and were used as scaffold control. These polymer solutions were placed between electrodes, which were connected to a high voltage. The voltage applied for nanofiber production was 24kV, (22kV and 2kV corresponding to positive and negative electrode, respectively). A 15 cm distance from the collector plate, 0.80mm needle inner diameter and flow rate of 0.002mm/second were used. To produce the aligned nanofibers a rotating cylinder of 20cm diameter at 2.500 rpm was used. The scaffolds were fixed in round 15 mm diameter glass coverslips using PLGA polymer solution dissolved in HFIP 15% (w/w). The variables temperature and humidity, respectively, were constantly monitored throughout the procedure ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $30\pm 5\%$ ). Subsequently, the scaffolds were placed in culture plates of 24 wells for sterilization through ultraviolet light for 1.5 hours in a vertical laminar flow hood (30 minutes for each side and 30 minutes when placed on the culture plates).

Following this, four different types of scaffolds were produced by emulsion E-S technique and named as follows: randomized nanofiber scaffolds control (RC), randomized nanofiber scaffolds with NGF (RN), aligned nanofiber scaffolds control (AC) and aligned nanofiber scaffolds with NGF (AN). Cells cultured directly on wells of culture plates were called control.

## Physicochemical properties of nanofiber scaffolds

### **Nanofiber Morphology**

The assessment of nanofiber morphology was performed by Scanning Electron Microscopy (SEM) model JEOL - JSM 6060. The images were obtained using accelerating voltage of 10kV and a magnification range of 1.000-20.000x after sample metallization with a thin layer of gold.

### **Nanofiber diameter**

The average fiber diameter was determined by SEM through the measurement of 30 fibers for each image using the ImageJ software 1.38x. For each group, three scaffolds produced on different days were evaluated. Three different fields for each scaffold were selected to obtain the images.

### **Degradability**

The degradability test was conducted simulating physiological conditions at 37°C in 1x PBS, pH 7.4. Approximately 30 mg of scaffolds from each group were submerged in 10 mL PBS buffer at 120 rpm, at 37°C. The degradability was evaluated at different times: 0 (scaffolds not subjected to degradability), 7, 14 and 28 days. The molecular weights of the degradation products were determined by gel permeation chromatography (GPC) on a chromatograph GPCmax VE2001 (Viscotek) equipped with triple detector (refractive index, viscosity and light scattering). After each point, the samples were kept in an incubator for 24h to allow water excess evaporation, and then 10 mg of each sample were dissolved in 4 mL THF, filtered through PVDF filter with pore diameter of 0.45µm and analyzed at 45°C, eluent THF and flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>.

### Biological analysis

Besides the scaffold groups an additional group was used for the following assays: cells cultured directly on wells, used as control group. Tests for every primary culture of DPSCs from human exfoliated deciduous teeth were performed in triplicate. The cells cultured with DMEM 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin were maintained in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> during the following experiments.

### **Cell adhesion**

Cell adhesion on the scaffolds was performed through DAPI staining (4',6-diamidino-2-phenylindole), a cell nuclear marker. The DPSCs, from human exfoliated deciduous teeth, were seeded at a density of 30.000 cells for each scaffold (RC, RN, AC and AN) and control group (n=6). After 6 hours incubation, the cells on the scaffolds and wells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 5µg/mL of DAPI in PBS for 1 minute. Several washes with PBS 1x were then performed to remove excess dye. Analyses were performed using an inverted microscope (Olympus SV1000) and images were acquired from nine random points of the scaffolds with 400x magnification. DAPI counterstaining was used to calculate the average cell number for each scaffold.

### **Cell viability**

Cell viability on the scaffolds was assessed by the colorimetric assay MTT (Sigma-Aldrich ®) 6h, 24h, 48h and 72h after seeding a total of 45.000 cells per well or scaffold (n=3). The medium was changed every three days. After each specific point the cells were incubated with 0.25 µg/mL MTT for 2h. 400 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) was then added per well to dissolve the crystals formed. Absorbance was measured at 560 nm and 630 nm. The results were calculated by the absorbance label subtraction (560 nm - 630 nm) and expressed as the average absorbance for each group. The absorbance measure was performed with the equipment Wallac EnVision (Perkin Elmer).

### **Cytotoxicity**

Cytotoxicity was assessed by measurement of enzyme lactate dehydrogenase (LDH), which is found in almost all organs and tissues of the body. Its activity is due to the catalytic action, in which there is the conversion of pyruvate to lactate. It is an intracellular enzyme and its presence in the extracellular environment may be indicative of cell damage. Increasing the concentration of this enzyme is proportional to the increase in cell death. The test (Labtest kit) was performed to the following points: 4, 7, 14 and 21 days of cell culture (n=4). As negative control, cells cultured directly on the wells were used and as positive control, cells cultured directly on the wells, treated with Triton X-100 (Sigma-Aldrich ), 1% (v/v) for 10 minutes. Triton X-100 causes cell death permitting the maximal LDH release. Absorbance measure was performed in the equipment Wallac EnVision (Perkin Elmer).

### **Cell proliferation**

Cell proliferation was assessed on the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day after cell seeding (30.000 cells per scaffold/well) by immunofluorescence with the antibody Ki-67, a marker for the antigen KI-67, which is a nuclear protein that is associated with cellular proliferation, and which appears in all phases of the cell cycle (n=3). Five random fields of each scaffold were used to evaluate cell proliferation. The experiments were performed in triplicate. The total number of cells in each field was counted through DAPI counterstaining. The average number of Ki-67 positive cells over the total number of cells represents the proliferation rate for each group (% Ki-67 positive cells). The calculation of the proliferation rate is shown below:

$$\text{Proliferation rate (\% Ki-67 positive cells)} = (\text{Average Ki67}^+ \text{ cells} / \text{Average DAPI stained cells}) \times 100$$

### **Neural differentiation on scaffolds**

Based on the protocol described by Arthur and colleagues (2008), the cells were treated for three weeks in order for them to differentiate into neural cells (n=4). Twenty-four hours prior to cell seeding, the scaffolds and wells were coated with geltrex® (Invitrogen) diluted in DMEM-F12 (Sigma-Aldrich). The scaffolds and wells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and then DMEM-F12 before the cells were added. The cells were re-seeded at a density of 22.500 cells/cm<sup>2</sup> on scaffold groups (RC, RN, AC, AN) and 5.000 cells/cm<sup>2</sup> on cells cultured directly on wells (control group). After 24-48 hours, differentiation was begun. At the first week of induction, the cells were treated with Neurobasal A (Invitrogen) medium supplemented with Glutamax (Invitrogen), 1x B27 (Invitrogen), EGF- epidermal growth factor (20ng/ml), bFGF- basic fibroblast growth factor (40 ng/ml) and penicillin/streptomycin 1%. In the second week, the cells were treated with DMEM-F12 medium supplemented with ITS 1x (Sigma-Aldrich), bFGF (40 ng/ml) and penicillin/streptomycin 1%. All-trans retinoic acid (0.5 μM) added to the second week medium characterized the medium used in the third week of treatment. As negative controls, MSCs on all groups of scaffolds and cells directly on the wells (control), were cultured with DMEM 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin during the same period. The cells on the scaffolds/wells were lysed with TRIZol (Invitrogen) and stored at -80 °C for RNA isolation and real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis for neural genes.

### **Cell morphology**

The morphology of MSCs on the scaffolds was observed by fluorescence microscopy (Nikon Inverted microscope Eclipse - Ti series). The cells were plated at a density of 45.000 cells per scaffold or directly on the wells for control. After twenty-one days of culture with DMEM and neural induction medium (two independent groups), the scaffolds were washed with PBS 1x, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes and then subsequently permeabilized with Triton X-100 0.1% for 10 minutes. Staining was then performed with 50mg/mL rhodamine conjugated phalloidin for 40 minutes to identify cytoskeleton actin filaments. After phalloidin staining, the samples were washed with 1x PBS and stained with 0.5 mg/mL DAPI for 1 minute. Through fluorescence microscopy, photomicrographs of representative images from the different samples were obtained at 100x magnification. In addition, control group was evaluated through phase-contrast microscopy after 21 days of neural induction.

### **RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR analysis**

The total RNA from the test and control groups was extracted using the TRIzol Reagent (Sigma). RNA samples (n=4) were quantified by spectrophotometer (Nanodrop). The cDNA was synthesized using the M-MLV Reverse transcriptase kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. PCR was performed as described by the manufacturer using the Platinum Sybr kit (Invitrogen). The final reaction contained 17  $\mu$ L SYBR green/enzyme reaction mix, 2 $\mu$ L primer mix and 1 $\mu$ L cDNA, in a total volume of 20 $\mu$ L. PCR conditions were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Melting curve analysis was applied to all reactions to ensure homogeneity of the amplified product. The product size for each primer set was confirmed by gel-electrophoresis. GAPDH was used to normalize the transcript levels of target genes. All results were repeated in three independent experiments and performed in duplicate each time. The primers of each gene are described in Table 2.

**Table 2** – Primer sequences and their respective expressing cells.

<b>Primer</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Expressing cells</b>
<b>Nestin</b>	CTCTGACCTGTCAGAAGAAT	CCCACTTTCTTCCTCATCTG	Neural progenitor
<b>β-III tubulin</b>	AGATGTACGAAGACGACGAGGAG	GTATCCCCGAAAATATAAACACAAA	Immature neuron
<b>NSE<sup>1</sup></b>	TTATTGGCATGGATGTTGCTGC	CCCGTCAATACGTTTTGGG	Mature neuron
<b>GAPDH<sup>2</sup></b>	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCCAAC	AGGGTCTCTCTCTCTCTTG	Housekeeping gene

<sup>1</sup>NSE : Neuron Especific Enolase;

<sup>2</sup>GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

### Statistical analysis

The results were presented as means and standard deviations. Cell viability and proliferation, cytotoxicity, and degradation of scaffolds were assessed by ANOVA for repeated measures with two classification criteria: nanofiber orientation and group (considering NGF presence). Fiber diameter was evaluated by One-way ANOVA and analyses of cell adhesion were assessed by ANOVA (One and Two-Way). Gene expression analyses were conducted using Two-way ANOVA. The Bonferroni test was used as post-hoc for all the analyses. A 5% significance level was used for decision criteria. The results were generated by SPSS 20 version.

### Acknowledgements

The authors would also like to acknowledge the support of the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and Stem Cell Research Institute.

### References

ABROUS D N, KOEHL M, LE MOAL M (2005). Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. *Physiol Rev* 85: 523–569.

ARTHUR A, RUCHKOV G, SHI S, KOBLAR S A, GRONTHOS S (2008). Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells* 26:1787–1795.

BERNARDI L, LUISI S B, FERNANDES R, PIRES T D, VALENTIM L, FOSSATI A C M, PRANKE P (2011). Stem cells from the pulp of human deciduous teeth isolation related to the physiological process of resorption. *J Endod* 37, 973-979.

CAO H, MCHUGH K, CHEW S Y, ANDERSON J M (2010). The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the *in vivo* and *in vitro* foreign body reaction. *J Biomed Mater Res A* 93(3):1151-9.

ÇAPKIN M, ÇAKMAK S, KURT F Ö, GÜMÜSDERELIOĞLU M, SEN B H, TÜRK B T, DELILOĞLU-GLÜRHAN S I (2012). Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs. *Biomed. Mater.* 045013 14pp. doi: 10.1088/1748-6041/7/4/045013.

CHO KJ, TRZASKA KA, GRECO SJ, MCARDLE J, WANG FS, YE JH, RAMESHWAR P (2005). Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells* 23: 383–391.

CHRISTOPHERSON G T, SONG H, MAO H-Q (2009). The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials* 30: 556-64.

DAHLMANN-NOOR A, VIJAY S, JAYARAM H, LIMB A, KHAW P T (2010). Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve. *Can J Ophthalmol* 45(4) 333-41.

GOVINDASAMY V, ABDULLAH A N, RONALD V S, MUSA S, AZIZ Z A, ZAIN R B, TOTEY S, BHONDE R R, KASIM N H A (2010). Inherent Differential Propensity of Dental Pulp Stem Cells Derived from Human Deciduous and Permanent Teeth. *J Endod* 36: 1504–1515.

GRONTHOS S, BRAHIM J, LI W, FISHER LW, CHERMAN N, BOYDE A, DENBESTEN P, ROBEY PG, SHI S (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 81(8): 531-5.

GU X, DING F, YANG Y, LIU J (2011). Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Progress in Neurobiology* 93: 204-30.

HAGG T, OUDEGA M (2006). Degenerative and Spontaneous Regenerative Processes after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 23: 264-280.



ILIE I, ILIE R, MOCAN T, BARTOS D, MOCAN L (2012). Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface. *International Journal of Nanomedicine* 7: 2211–2225.

KEMP S W, WALSH S K, MIDHA R (2008). Growth factor and stem cell enhanced conduits in peripheral nerve regeneration and repair. *Neurol Res* 30(10): 1030-8.

KOPEN G C, PROCKOP D J, PHINNEY D G (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci* 96: 10711–10716.

LARSEN M, ARTYM V V, GREEN J A, YAMADA K M (2006). The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 18:463–471.

LEE Y-S, ARINZEH T L (2011). Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering. *Polymers* 3(1), 413-426.

MARTINS A, ARAÚJO J V, REIS R L, NEVES N M (2007). Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine* 2(6): 929-42.

MICHALCZYK K, ZIMAN M (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization. *Histol Histopathol* 20: 665-671.

MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISCHER L W, ROBEY P G, SHI S (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci* (10):5807-12.

MOSNA F, SENSEBÉ L, KRAMPERA M (2010). Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev* 19(10):1449-70.

NOURBAKSH N, SOLEIMANI M, TAGHUPOUR Z, KARBALAIE K, MOUSAVI S B, TALEBI A, NADALI F, TANHAEI S, KIYANI G A, NEMATOLLAHI M, RABIEI F, MARDANI M, BAHRAMIYANI H, TORABINEJAD M, NASR-ESFAHANI M H, BAHARAVAND H (2011). Induced *in vitro* of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int J Dev Bio.* 55: 189-95.

PAREKKADAN B, MILWID J M (2010). Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 12:87-117.

PITTINGER M F, MACKAY A M, BECK S C, JAISWAL R K, DOUGLAS R, MOSCA J D, MOORMAN M A, SIMONETTI D W, CRAIG S, MARSHAK D R (2009). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

QI R, SHEN M, CAO X, GUO R, TIAN X, YUD J, SHI X (2011). Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials. *Analyst* 136: 2897.

REH T (2002). Neural stem cells: form and function. *Nature Neuroscience* 5:392-394.

RODRIGUEZ-LOZANO F J, INSAUSTI C L, INIESTA F, BLANGUER M, RAMIREZ M D, MESEGUER L, MESEGUER-HENAREJOS A B, MARIN N, MARTÍNEZ S, MORALEDA J M (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17 1062-7.

SAHNI V, KESSLER J A (2010). Stem cell therapies for spinal cord injury. *Nat Rev Neurol* 6(7): 363-72.

SAINO E, FOCARETE M L, GUALANDI C, EMANUELE E, CORNAGLIA A I, IMBRIANI M, VISAI L (2011). Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *Biomacromolecules* 9: 1900-11.

SECCO M, ZUCCONI E, VIEIRA N M, FOGAÇA L L Q, CERQUEIRA A, CARVALHO M D F, JAZEDJE T, OKAMOTO O K, MUOTRI A R, ZATZ M (2008). Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem cells* 26: 146-150.

SIQUEIRA R (2007). Lesões nervosas periféricas: uma revisão. *Rev Neurocienc* 15(3): 226-233.

SOARES A P, KNOP H L A, JESUS A A, ARAÚJO T M R (2007). Células-tronco em Odontologia. *Dental Press Ortodon Ortop Facial* 12: 33-40.

SOFRONIEW M V, HOWE C L, MOBLEY W C (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217-281.

STANISZEWSKA I, SARIYER I K, LECHT S, BROWN M C, WALSH E M, TUZYNSKI G P, SAFAK M, LAZAROVICI P, MARCINKIEWICZ C (2008). Integrin  $\alpha\beta 1$  is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins. *J Cell Sci* 121: 504-513.

WANG J, WANG X, SUN Z, WANG X, YANG H, SHI S, WANG S (2010). Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth Can Differentiate into Dopaminergic Neuron-Like Cells. *Stem Cells and Development* 19: 1375-1383.

WU L, DING J (2004). *In vitro* degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 25: 5821:30.

XIAOQIANG L, YAN S, SHUIPING L, LIANJUANG T, XIUMEI M, RAMAKRISHNA S (2010). Encapsulation of proteins in poly (L-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75: 418-24.

YE Z, MAHATO RI (2008). Role of nanomedicines in cell-based therapeutics. *Nanomedicine* 3: 5-8.

ZHANG N, KOHN D H (2012). Using Polymeric Materials to Control Stem Cell Behavior for Tissue Regeneration. *Birth Defects Research* 96:63–81.

#### 4. Discussão

##### *Isolamento, cultura e caracterização das CTMs da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos*

No presente trabalho, as CTMs foram isoladas a partir da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados humanos. Essa fonte de obtenção de CTMs tornou-se bastante viável por não ser invasiva, além do fato do material ser normalmente descartado após o processo natural de esfoliação. O protocolo descrito por Bernardi e colaboradores (2011), utilizado para a obtenção das CTMs, foi satisfatoriamente reproduzido. A técnica utilizada mostrou-se bastante eficaz, uma vez que as CTMs, com perfil altamente proliferativo, foram obtidas, expandidas e criopreservadas até o momento do seu uso durante os experimentos. Após o processo de descongelamento, as CTMs foram capazes de manter o seu perfil proliferativo, além de não apresentarem diferenças em relação à sua morfologia. As CTMs isoladas foram caracterizadas com sucesso durante a quinta passagem celular de acordo com os critérios postulados pela *International Society for Cellular Therapy*, pois demonstraram perfil imunofenotípico típico, mostrado pela elevada expressão para marcadores de CTMs e baixa ou nula expressão para marcadores de linhagem hematopoética. As amostras ainda apresentaram, na sua totalidade, capacidade plástico-aderente. Todas as amostras analisadas por citometria de fluxo e submetidas à diferenciação demonstraram pluripotencialidade ao diferenciar-se nas 3 linhagens mesodérmicas. Portanto, as células estudadas neste trabalho, nas condições experimentais empregadas, satisfazem os critérios para serem consideradas como células-tronco mesenquimais.

##### *Produção e caracterização das matrizes de nanofibras*

A padronização da emulsão foi necessária como primeiro passo do trabalho para permitir que a estratégia de incorporação do fator de crescimento às nanofibras fosse adequada. Essa padronização, exigiu uma longa etapa de otimização até que se encontrasse uma preparação estável e com viscosidade suficiente para aplicação no ES. O uso do ES de emulsão para esta abordagem é apoiado por diversos estudos (Qi *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2009; Xiaoqiang *et al.*, 2011). O protocolo adaptado de Liao e colaboradores (2008) possibilitou o desenvolvimento da emulsão que se mostrou mais adequada para produzir as fibras durante ES. Previamente à produção das fibras através da emulsão padronizada, diversos fatores inerentes à técnica de ES foram devidamente estabelecidos, tais como concentração da solução polimérica, taxa de fluxo, voltagem aplicada, diâmetro da agulha,

distância entre a agulha e a placa coletora, entre outros. Para a fabricação de nanofibras alinhadas, a velocidade de rotação do cilindro foi variada para obter a máxima orientação mantendo fixos os outros parâmetros citados anteriormente. O alinhamento eficaz das fibras foi observado com velocidade de 2,500 rpm, ou em velocidade tangencial de 94,25 km/hora. O controle de fatores externos como umidade e temperatura também foi essencial para obtenção de fibras com características homogêneas.

Após a padronização de todos os parâmetros citados, foi possível observar a formação das fibras para todos os grupos estudados, alinhadas e randomizadas, confirmados pela análise de MEV. Da mesma forma, foi possível observar fibras na escala nanométrica (nanofibras) para todos os grupos de matrizes, de acordo com os resultados do diâmetro das fibras. As matrizes de nanofibras produzidas em ambos os grupos apresentaram espessura similar, variando de 40 a 70 micrometros. Diferentes amostras de matrizes de nanofibras foram analisadas em períodos distintos durante o trabalho e apresentaram características semelhantes, o que confirma a padronização adequada dos parâmetros do ES. Esse fato é importante, uma vez que as matrizes de nanofibras eram produzidas e em seguida utilizadas, fazendo com que sua produção ocorresse continuamente ao longo do trabalho.

A homogeneidade do diâmetro entre os diferentes grupos de nanofibras produzidos é um fator importante para a avaliação do comportamento celular. Alguns estudos citam a influência do diâmetro das fibras na adesão, migração, diferenciação celular e na ativação de células associadas ao processo inflamatório.

Christopherson e colaboradores (2009) observaram a influência significativa do diâmetro das fibras sobre a adesão e a capacidade de migração das células através dos substratos produzidos por ES. As CT neurais de rato cultivadas sobre matrizes de fibras com diâmetros maiores ( $1452 \pm 312$  nm) apresentaram menor atividade migratória e formaram grandes agregados celulares. Da mesma forma, a variação do diâmetro das fibras de matrizes alinhadas mostrou diferença significativa na migração e alongamento das células de Schwann (CS). Fibras de pequeno diâmetro ( $293 \pm 65$  nm) não foram capazes de promover a extensão significativa dos neuritos tampouco a migração das CS (Wang *et al.*, 2010). Em outro estudo, a secreção de moléculas pró-inflamatórias por macrófagos mostrou-se dependente do diâmetro da fibra. As nanofibras minimizaram a resposta inflamatória quando comparadas aos filmes e às microfibras (Saino *et al.*, 2011). Além disso, o diâmetro médio alcançado pelas nanofibras produzidas no presente trabalho foi de  $567 \pm 121$  nm, o qual está dentro do diâmetro apresentado pelas fibras da MEC (100-600 nm). Diâmetro similar ao encontrado neste estudo foi considerado mais eficiente para a adesão de fibroblastos em comparação às fibras de

escala micrométrica (Tian *et al.*, 2007). Essa semelhança com as nanofibras da MEC permite adaptação, organização e manutenção da funcionalidade celular (Ye and Mahato, 2008). Portanto, as matrizes de nanofibras produzidas possuem características semelhantes entre si e são capazes de mimetizar fisicamente a estrutura da MEC.

#### *Degradabilidade das matrizes de nanofibras*

As matrizes de nanofibras ideais devem possuir capacidade controlada de degradação *in vivo* e acompanhar a formação do novo tecido (Gu *et al.*, 2011). As propriedades físico-químicas do polímero como, por exemplo, a hidrofiliabilidade, irão definir seu perfil de degradação. Materiais predominantemente hidrofílicos tendem a degradar mais rapidamente e o mecanismo normalmente ocorre através de hidrólise e difusão (Wu and Ding, 2004; Han and Cheung, 2011). Atualmente, os dispositivos produzidos por ET para reparo de lesões no SN devem seguir o seguinte critério em relação ao perfil de degradação: permanecer intactos até que os axônios possam preencher o espaço vazio deixado após a lesão e, em seguida, degradar-se gradualmente com mínima reação e edema. Taxas de degradação muito elevadas podem fazer com que axônios, em processo de regeneração, fiquem vulneráveis. Por outro lado, taxas de degradação muito baixas podem levar à compressão nervosa e/ou a reações imunes (Gu *et al.*, 2011).

No presente estudo, a taxa de degradação média observada para todos os grupos de matrizes ao final de 28 dias de incubação foi semelhante, em torno de 41%. Esse percentual elevado de degradação pode ter sido favorecido pela adição da fase aquosa à solução polimérica no momento do preparo da emulsão, aumentando a hidrofiliabilidade do polímero. É importante ressaltar que a taxa de degradação *in vivo* tende a aumentar devido a outros fatores providos pelo microambiente (Wu and Ding, 2004). Deve-se relacionar esses resultados com suas possíveis aplicações clínicas. Por exemplo, para lesões nervosas periféricas, a proliferação de células de Schwann no coto distal ocorre em 3 dias após a agressão axonal causada pela lesão. Essa proliferação está associada com a produção de algumas substâncias que podem atrair os axônios em crescimento (Siqueira, 2007). Já no caso de lesões raquimedulares, após o trauma inicial, a medula espinhal sofre mudanças patológicas ao longo do tempo. Em alguns minutos, a ocorrência de hemorragia, da perda da microcirculação e do vasoespasmos resulta em uma lesão concêntrica em expansão que perdura durante a fase aguda (aproximadamente 3 dias). O processo regenerativo natural praticamente não ocorre como no SNP. Ao contrário, um processo de destruição pós-traumática progressiva do tecido (lesão secundária) evolui rapidamente e diversos fatores inibitórios e excitotóxicos levam à perda de

função do tecido (Hagg and Oudega, 2006). Portanto, os dois exemplos de lesão, onde as matrizes produzidas poderão ser aplicadas *in vivo*, apresentam características que requerem tanto suporte trófico quanto suporte físico imediato, os quais devem permanecer por alguns dias. O suporte trófico é dado pelo fator de crescimento presente na matriz (NGF), o qual é liberado ao longo do processo de degradação, auxiliando na sobrevivência, extensão e maturação dos axônios. É importante observar também que o acréscimo do NGF às fibras, bem como seu alinhamento, não acarretaram em prejuízo à estabilidade das matrizes garantindo, desta maneira, sua aplicabilidade para a ET neural.

#### *Adesão celular*

Para que as CTMs possam proliferar, migrar e se diferenciar, elas precisam primeiramente aderir ao substrato. Portanto, a adesão é o primeiro passo para o desenvolvimento do novo tecido. Além disso, o tempo adequado de incubação das CTMs para avaliação da adesão celular também representa um parâmetro importante. Para os dispositivos produzidos, o melhor tempo de incubação das CTMs para avaliar a adesão celular foi investigado em um estudo paralelo (Silveira *et al.*, 2012). Sabe-se que alterações nas características do substrato podem modificar a resposta celular frente aos mesmos, podendo ter influência na adesão e proliferação das CTMs (Zhang and Kohn, 2012). Apesar do ES de emulsão ser uma variação da técnica já amplamente utilizada no laboratório de Células-tronco da UFRGS, avaliar o comportamento das CTMs frente às matrizes de nanofibras produzidas foi importante, uma vez que mostrou diferenças em relação às matrizes normalmente produzidas pela técnica convencional de ES. O estudo mostrou que 6h de incubação foi o melhor tempo para avaliar a adesão celular. Devido esse estudo, esse foi o tempo posteriormente aplicado a todos os grupos avaliados no presente trabalho.

Diversas proteínas chaves no processo de adesão celular mostram adsorção significativa às matrizes de nanofibras. Após o processo de adsorção, essas moléculas interagem com as CTMs através de receptores de integrina. No presente estudo, as CTMs mostraram-se capazes de aderir satisfatoriamente aos substratos produzidos independente das suas características. A melhor adesão das matrizes alinhadas contendo o NGF incorporado, quando comparados com as nanofibras alinhadas controle ( $P=0.028$ ), pode estar relacionada ao aumento da bioatividade ocasionada pela presença do FC. Esse efeito pode ser ainda mais evidenciado se for considerado o fato de que nas fibras sem o NGF, a melhor taxa de adesão foi obtida nas fibras randomizadas. Esse efeito está relacionado à maior superfície de contato presente nesse tipo de matriz. Entretanto, quando o NGF foi adicionado às matrizes, o fato de

haver o alinhamento das fibras foi superado pelo efeito biológico do FC, tornando o grupo de nanofibras alinhadas com incorporação do fator, o grupo que exibiu a maior taxa de adesão celular.

Existem vários mecanismos pelos quais as integrinas e fatores de crescimento cooperam para controlar o comportamento celular. Staniszewska e colaboradores (2008) relataram a ligação específica de um subtipo de integrina, o  $\alpha\beta1$ , ao NGF e a outras neurotrofinas. A interação dessa integrina com o seu ligante (NGF) induziu a ativação de uma proteína envolvida na adesão focal, que por sua vez estimulou o espalhamento celular. Sabe-se também que a presença de proteínas nas matrizes de nanofibras aumenta a sua hidrofilicidade facilitando a interação entre integrinas e molécula de adesão (Zhang and Kohn, 2012). Portanto, para as matrizes alinhadas contendo o NGF, está claro que de alguma forma, a presença do FC favoreceu a interação das CTMs com o substrato produzido.

Apesar de não haver diferença significativa, as matrizes de nanofibras alinhadas, em comparação com as randomizadas, mostraram uma menor tendência à adesão celular (comparação independente entre os grupos controle, RC e AC). Em um estudo, avaliando o comportamento celular de monócitos, Cao e colaboradores (2009) observaram maior adesão nas matrizes de nanofibras randomizadas em relação às alinhadas (Cao *et al.*, 2009). A justificativa para tal comportamento foi o maior espaço observado entre as fibras alinhadas, o qual diminuiu a área de superfície das nanofibras, dificultando o início do processo de adesão celular. A elevada superfície de contato promove às CTMs um ambiente adequado, comparável às placas de cultura, que representa uma superfície ótima para o cultivo e expansão das CTMs. Pelo conhecimento atual do grupo de pesquisa no qual o autor está inserido, praticamente nenhum trabalho anteriormente publicado avaliou a taxa de adesão de CTMs derivadas de dentes decíduos em matrizes de nanofibras contendo fatores neurotróficos.

### *Viabilidade celular*

Um passo importante para o desenvolvimento de matrizes de nanofibras para a ET é avaliar a biocompatibilidade das mesmas. O ensaio colorimétrico MTT é um método amplamente utilizado para avaliar a viabilidade das células cultivadas sobre estas estruturas. O ensaio baseia-se nas absorvâncias geradas pelos cristais de formazan dissolvidos (formados em células vivas), sendo proporcionais ao número de células viáveis. No presente estudo, as CTMs cultivadas sobre as matrizes de nanofibras apresentaram valores de absorvância similares ao longo do período avaliado. As CTMs cultivadas sobre as matrizes apresentaram



menor absorvância em relação ao grupo controle, somente no último período avaliado (72 horas), possivelmente indicando um aumento no número de células viáveis somente no grupo controle em relação ao período de 48 horas. Não foi possível observar uma tendência clara de aumento da absorvância nos grupos de matrizes de nanofibras ao longo do tempo (efeito observado para o grupo controle), ainda havendo uma diminuição na média de todos os grupos no tempo de 48h, exceto para o grupo controle. Esse fato poderia indicar que as CTMs mantiveram seu número, possivelmente não ocorrendo aumento no número de células. Qi e colaboradores (2011) mostraram que durante o ensaio de MTT, uma porção do formazan dissolvido é absorvido nas matrizes de nanofibras, levando a um resultado falso negativo para a viabilidade celular. Em uma análise de três dias, o percentual de corante absorvido pelas nanofibras resultou em uma variação de 35.6-50.2 % do valor real da viabilidade. Ainda, a avaliação da viabilidade por MTT não se mostrou comparável à análise da morfologia das células observadas por MEV. O autor sugere um método de correção com base na quantificação do corante formazan absorvido às matrizes (Qi *et al.*, 2011).

Dessa forma, no presente trabalho, em condições experimentais muito semelhantes ao estudo citado, pode ter ocorrido um maior número de células metabolicamente ativas presentes nas matrizes. No entanto, essas não conseguem ser detectadas eficientemente através do ensaio de MTT. É importante considerar essa hipótese visto que os resultados de viabilidade celular de certa forma não condizem com os resultados satisfatórios obtidos para a adesão celular nas matrizes de nanofibras, muito semelhantes ao controle. Salienta-se, ainda, que outros ensaios de avaliação da viabilidade celular também são colorimétricos, como por exemplo, o MTS, os quais também implicariam em baixa eficiência de detecção.

Outro dado que corrobora com essa possibilidade são os resultados observados no ensaio de degradação das matrizes, os quais indicaram uma taxa constante de degradação já a partir do primeiro dia. Esse efeito de aumento dos produtos de degradação das matrizes no meio de cultura, no qual as matrizes estão imersas, é observado somente *in vitro*. Tal efeito não deve acarretar prejuízos às células utilizadas em sistemas empregados na ET, nos quais os produtos de degradação são prontamente metabolizados pelo organismo em rotas já conhecidas para polímeros biodegradáveis, como no caso do PLGA.

### *Proliferação celular*

A taxa de proliferação celular, avaliada através do índice de células positivas para o marcador Ki-67 foi muito semelhante entre os grupos no primeiro tempo avaliado. Já no segundo tempo, uma tendência menor na taxa de proliferação foi observada para os grupos de

matrizes contendo fatores de crescimento. Embora esse achado não tenha mostrado resultados significativos para as amostras avaliadas, esse comportamento poderia indicar certo comprometimento com a diferenciação celular, visto que o NGF presente nas nanofibras pode influenciar a diferenciação neuronal (Cho *et al.*, 2010). Esse comportamento já é esperado para células que estão comprometidas com a diferenciação, em detrimento de sua taxa de proliferação (Arthur *et al.*, 2008).

Pode-se sugerir, portanto, que as matrizes produzidas promovem um ambiente celular adequado, no qual as células são capazes de manter sua taxa de proliferação semelhante àquela mostrada nas placas de cultura, consideradas padrão ouro na avaliação do comportamento celular. Além disso, o NGF presente nas matrizes, tanto alinhadas como randomizadas, parece diminuir a taxa de proliferação, sugerindo um comprometimento das CTMs com a diferenciação em linhagem neural.

#### *Citotoxicidade*

A citotoxicidade das matrizes de nanofibras foi avaliada pela dosagem da enzima LDH. Trata-se de uma enzima intracelular e sua presença no meio extracelular pode ser indicativa de dano às células. O aumento da concentração dessa enzima é proporcional ao aumento da morte celular (Steffens *et al.*, 2012). Os dispositivos produzidos mostraram-se adequados para o cultivo celular, visto que apresentaram níveis de LDH similares ao controle negativo. Portanto, através dos resultados mostrados, pode-se inferir que as matrizes de nanofibras produzidas possuem características atóxicas, não causando danos celulares que poderiam desencadear a ativação de mecanismos relacionados à morte das CTMs.

#### *Diferenciação neural*

Atualmente, a abordagem mais comum para compreensão da diferenciação de CTMs envolve o cultivo bidimensional em placas de cultura de poliestireno com suplementação, em *bolus*, de coquetéis contendo fatores de indução (Cho *et al.*, 2005; Arthur *et al.*, 2008; Portmann-Lanz *et al.* 2010). Porém, essa abordagem ignora o papel crítico da MEC na determinação do comprometimento celular, assim como a necessidade da liberação lenta e gradual de fatores de crescimento na manutenção do perfil de diferenciação. Portanto, a capacidade de combinar sinais bioquímicos e topográficos em um único dispositivo, agindo de maneira sinérgica para a sinalização celular, pode representar uma estratégia bastante válida na ET, especialmente para a aplicação neural (Jiang *et al.*, 2012; Ilie *et al.*, 2012).

No presente estudo, as CTMs derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos foram submetidas à diferenciação neural utilizando o protocolo adaptado de Arthur e colaboradores (2008). As CTMs cultivadas sobre as matrizes de nanofibras alinhadas e randomizadas contendo ou não NGF foram tratadas com meio de indução contendo fatores de crescimento (bFGF e EGF) durante 14 dias e, após, durante mais 7 dias com fatores de crescimento e ácido retinóico (AR). Como controles, as CTMs cultivadas sobre os mesmos grupos de matrizes foram tratadas com meio convencional. Ainda, as CTMs cultivadas diretamente sobre as placas de cultura foram utilizadas como controles adicionais e submetidas aos mesmos protocolos. As CTMs foram avaliadas de acordo com a sua morfologia e expressão de genes neuronais.

Após a indução, a presença de células com aparência neuronal, redução no número celular (avaliadas visualmente) e o aumento da expressão de marcadores neuronais indicaram que a diferenciação neural das CTMs foi realizada com sucesso. Arthur e colaboradores (2008) avaliaram a diferenciação neural de DPSCs, através de indução com fatores de crescimento e ácido retinóico sobre placas de cultivo e observaram aumento significativo na expressão gênica de marcadores para neurônios maduros (neurofilamentos de cadeia média e pesada). Já, a expressão de marcadores neurais precoces e de neurônios imaturos (nestina e  $\beta$ -III tubulina) foi semelhante após a indução em comparação às DPSCs não tratadas com meio indutor. No presente estudo, as CTMs provenientes de outra fonte, da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos, foram capazes de responder de maneira similar à indução neural proposta por Arthur e colaboradores, conforme sugerido pela morfologia e aumento da expressão do gene NSE, presente em neurônios maduros e manutenção dos níveis de expressão de nestina e  $\beta$ -III tubulina.

Sabe-se que as CTMs da polpa dentária normalmente expressam genes neurais mesmo sendo cultivadas em meio de crescimento convencional, sem qualquer protocolo de indução. De acordo com alguns autores, esse fato está relacionado à sua origem ectodérmica, mais precisamente da crista neural, inclusive sendo este um dos motivos da escolha desta fonte de células para a realização deste trabalho (Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2002; Arthur *et al.*, 2008). Portanto, a avaliação da diferenciação em linhagens neurais possui também, como um dos critérios, a quantificação do aumento e/ou diminuição da expressão de genes já expressos previamente ao protocolo de indução.

Trabalhos que realizaram a avaliação da diferenciação de CTMs cultivadas sobre matrizes de nanofibras produzidas por ES de emulsão em linhagens neurais são raros na literatura. Dessa forma, a comparação dos resultados obtidos com estudos semelhantes torna-

se bastante limitada. Çapkin e colaboradores (2012) também avaliaram a diferenciação neural de CTMs sobre matrizes de nanofibras alinhadas e randomizadas. O tratamento das CTMs teve duração de 14 dias e o meio indutor era basicamente composto por fatores de crescimento (EGF e bFGF). Na avaliação do potencial para a neurodiferenciação de dois tipos distintos de CTMs (MO e ADSCs), o melhor resultado foi obtido com as CTMs de MO. As mesmas apresentaram aumento na marcação de oligodendrócitos (O4) sobre as matrizes de nanofibras alinhadas (Çapkin *et al.*, 2012). Apesar das diferenças, o estudo também conseguiu mostrar a capacidade de diferenciação das CTMs sobre diferentes tipos de matrizes de nanofibras. No entanto, a diferenciação das CTMs sobre as placas de cultivo, o qual normalmente é considerado padrão para o comportamento celular, não é mostrado no estudo de Çapkin. Esse fato impossibilita avaliar as diferenças do cultivo das CTMs sobre as matrizes de nanofibras, no que diz respeito aos sinais proporcionados pelas características estruturais das mesmas.

Porém, é importante ressaltar que no cultivo bidimensional, o que acontece sobre as placas de cultivo, apesar de normalmente mostrar resultados mais homogêneos e melhor controlados, o mesmo não representa um controle ideal, uma vez que não apresenta diversas características inerentes aos dispositivos tridimensionais produzidos, que se assemelham em alguns aspectos à MEC natural (Larsen *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2011). No presente estudo, foi possível observar que as CTMs podem mudar a expressão dos genes avaliados quando cultivadas sobre as matrizes de nanofibras em comparação às placas de cultura. Apesar da diferença não ser significativa para a amostra avaliada, é possível que a interação entre as CTMs e as matrizes de nanofibras possa aumentar ou diminuir a expressão dos genes neurais aqui avaliados, em consequência dos sinais físicos e químicos presentes na matriz (Ilie *et al.*, 2012).

As CTMs cultivadas sobre as matrizes de nanofibras mostraram um aumento similar na expressão do gene da nestina. A nestina é uma proteína de filamento intermediário, expressa em células em divisão durante as fases iniciais do desenvolvimento do SNC, SNP e outros tecidos. Ao longo do processo de diferenciação, a expressão de nestina tende a diminuir, passando a ser substituída por proteínas de filamentos intermediários mais específicos (Michalczyk and Ziman, 2005). Portanto, a maior expressão de nestina mostrada no presente trabalho poderia indicar um número maior de precursores neurais, ainda em estágio mais inicial de diferenciação. Esse efeito é ainda mais evidente quando as células são submetidas à diferenciação com meio específico, especialmente no grupo de fibras randomizadas associadas à presença de NGF. Dessa maneira, parece que o fator de

crescimento desempenha um efeito sinérgico com o meio de diferenciação especialmente no que diz respeito à expressão do gene da nestina. Embora a célula pareça estar em um estágio mais imaturo de desenvolvimento, o aumento do nível de expressão da nestina indica resposta à indução dos estímulos neurotróficos, que posteriormente poderão ser convertidos no aumento da expressão de marcadores neuronais mais tardios como  $\beta$ -III tubulina e NSE.

Nas matrizes de nanofibras alinhadas não tratadas com meio de indução, as CTMs mostraram um aumento na expressão do gene NSE, que normalmente é expresso em células neuronais maduras (Abrous *et al.*, 2005). Esse aumento pode estar relacionado com o estímulo de superfície proporcionado pelo alinhamento das nanofibras. Alguns estudos investigam o papel de sinais topográficos e seu papel na diferenciação de CTMs em linhagens neurais (Jiang *et al.*, 2011; Çapkin *et al.*, 2012). Sabe-se que as características do substrato podem gerar respostas celulares devido a modificações detectadas no citoesqueleto e, através da sinalização celular, gerar diferentes comportamentos como, por exemplo, o início da diferenciação (Zhang and Kohn, 2012). Assim, uma parte das CTMs cultivadas sobre as matrizes alinhadas no presente estudo poderia estar iniciando o processo de diferenciação neural.

Em 2011, Jiang e colaboradores também constataram esse efeito positivo das nanofibras alinhadas sobre o comprometimento das CTMs com a linhagem neural. Os autores avaliaram a diferenciação das CTMs sobre as matrizes de nanofibras randomizadas e alinhadas contendo o AR encapsulado. Como controle, as CTMs cultivadas sobre placas de cultura sem indução foram utilizadas para avaliar tanto a expressão gênica quanto a expressão proteica. Em ambos os casos, a maior expressão de marcadores para células neuronais maduras foi observada sobre as matrizes de nanofibras alinhadas contendo o AR ou não. A liberação controlada do AR através das matrizes de nanofibras alinhadas aumentou a expressão gênica e proteica dos marcadores neurais de maneira significativa em relação às matrizes de nanofibras alinhadas controle. O efeito de aumento da expressão do gene NSE observado no presente estudo, proporcionado pelo alinhamento das fibras, parece não se manter quando as CTMs são cultivadas sobre estes mesmos grupos de matrizes com nanofibras alinhadas e submetidas à diferenciação com meio indutor. Ou seja, o alinhamento aliado ao meio de indução não parece agir de maneira sinérgica, como poderia ser esperado. Todos os grupos tratados com esse meio apresentaram diminuição na expressão do gene NSE em relação ao grupo controle diferenciado, efeito ainda mais ressaltado no grupo alinhado com NGF. Entretanto, ressalta-se que na comparação entre o nível de expressão desse gene

em todos os grupos submetidos à indução, em relação aos não submetidos, houve aumento da expressão do gene NSE.

O aumento na expressão de nestina e NSE, para as CTMs induzidas com meio de diferenciação em todos os grupos de matrizes, possivelmente indica diferentes estágios de diferenciação. Isso significa que uma subpopulação das CTMs diferenciadas possivelmente expressa genes de precursores neurais e outra subpopulação expressa genes de células neuronais mais maduras. Outra hipótese é que uma subpopulação das células diferenciadas apresente coexpressão desses genes em proporções diferentes, de acordo com seu estágio de maturação. Nas matrizes de nanofibras randomizadas com o NGF incorporado, a expressão de genes de precursores neurais parece predominar em relação aos outros grupos, bem como o contrário parece ocorrer nas matrizes alinhadas sem o NGF, sugerindo mais uma vez o efeito sinérgico entre a randomização e a presença do FC. Entre os grupos de matrizes avaliados após a indução, aquele que apresentou uma diferença maior na expressão dos genes de neurônios maduros, em relação a genes precursores neurais, foi o grupo AC (alinhadas controle). Esse padrão não foi observado para o grupo AN, sugerindo que a presença de NGF mantém as CTMs com um caráter de células neurais mais imaturas. Mesmo que esses resultados estejam de acordo com os previamente relatados na literatura, é possível que com um número amostral maior ou mesmo com um maior tempo de indução, seja possível detectar mais claramente essas diferenças.

No presente estudo, as CTMs de dentes decíduos esfoliados humanos cultivadas sobre as placas de cultura convencionais mostraram um padrão de diferenciação condizente com uma população de células neuronais em estágio de maturação mais avançado. Esse achado é corroborado pelo fato que as células apresentaram expressão para o gene NSE maior que o controle (3,65x), similar para o gene nestina (1,20x) e um pouco maior para o gene da  $\beta$ -III tubulina (1,60x). Quando as CTMs foram induzidas nas matrizes de nanofibras, elas não apresentaram esse mesmo comportamento. No entanto, as vias de sinalização geradas por receptores celulares em reconhecimento a ambientes com superfícies mais complexas (superfícies tridimensionais) são diferentes daquelas para superfícies bidimensionais (placas de cultivo), influenciando o comportamento celular e a sua diferenciação. As placas de cultivo não se assemelham a MEC natural em muitos aspectos, ao contrário das matrizes tridimensionais produzidas neste trabalho (Larsen *et al.*, 2006). Sendo assim, pode-se inferir que as diferentes matrizes de nanofibras produzidas são capazes de promover um microambiente adequado para que as CTMs possam diferenciar-se em células de linhagem neural.

Mesmo havendo indicação, através da morfologia e expressão de genes neurais, de que ao menos parte da população das CTMs responde à diferenciação, deve-se considerar que estes critérios não podem ser utilizados de maneira isolada para definir o destino das CTMs para células neurais. Como os resultados obtidos indicam uma propensão maior das CTMs em diferenciarem-se em células neuronais, mais critérios deverão ser avaliados para consolidar esses dados. Alguns parâmetros importantes a serem avaliados são a expressão de genes para linhagens gliais e a realização do estudo da funcionalidade da célula diferenciada, através de ensaios eletrofisiológicos. Esses critérios são importantes para determinar a efetividade e segurança dos protocolos testados, já que a maioria dos estudos não apresenta uma avaliação completa em relação à funcionalidade dessas células, necessárias para sua futura aplicação clínica (Reh, 2002).

Portanto, ainda há necessidade de estudos adicionais e com a associação de diversas metodologias para que a diferenciação das CTMs em células da linhagem neural possa ser efetiva e realmente represente uma célula funcional, preenchendo os critérios, por exemplo, de um neurônio funcional. Por outro lado, pode-se concluir que o desenvolvimento de dispositivos que possibilitem associar diferentes estímulos (físicos e/ou químicos) que contribuam para o processo de diferenciação ou que simplesmente possam mimetizar o microambiente proporcionado pela MEC, é uma alternativa interessante. Dessa forma, os estímulos providos pela matriz artificial, aliado ao ambiente onde as CTMs estão localizadas no organismo podem ser suficientes para que, no próprio organismo ela siga esses sinais e finalize seu processo de diferenciação, contribuindo fortemente para o processo regenerativo.

## 5. Conclusão

No presente estudo matrizes de nanofibras orientadas e randomizadas com e sem o NGF incorporado foram produzidas e caracterizadas com sucesso, de acordo com a sua morfologia e orientação. De modo geral, foi possível cultivar as CTMs de dentes decíduos esfoliados humanos sobre as matrizes produzidas e verificar que as mesmas interagem satisfatoriamente com a matriz artificial produzida, de acordo com os parâmetros biológicos avaliados.

A produção das matrizes de nanofibras alinhadas e randomizadas contendo ou não o NGF foi observada posteriormente à padronização de parâmetros relacionados à técnica *electrospinning* de emulsão (emulsão utilizada, fatores diretamente relacionados à técnica e fatores externos).

As matrizes produzidas foram devidamente caracterizadas de acordo com as propriedades físico-químicas, mostrando disposição aleatória ou alinhada das nanofibras, morfologia lisa e ausência de *beads*, diâmetro estatisticamente semelhante entre elas e às fibras da MEC e perfil de degradação similar para todos os grupos de matrizes.

As células da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos foram isoladas, cultivadas e caracterizadas como CTMs. Essas foram capazes de aderir e proliferar adequadamente às matrizes de nanofibras produzidas em todos os grupos. As CTMs cultivadas mostraram-se viáveis ao longo do período avaliado e as matrizes de nanofibras não causaram citotoxicidade durante o cultivo por 21 dias.

As CTMs, submetidas à diferenciação neural, cultivadas sobre todos os grupos de matrizes produzidos, apresentaram morfologia diferente de seus controles além da diminuição no número de células. Algumas células apresentaram citoplasma restrito ao redor do núcleo e estruturas semelhantes a prolongamentos bipolares. Foi possível observar a disposição orientada das CTMs em todos os grupos de matrizes alinhadas tanto para células submetidas à indução neural quanto para seus respectivos controles.

A análise da expressão gênica mostrou que as CTMs foram capazes de expressar genes neurais quando cultivadas sobre todos os grupos de matrizes produzidos. Além disso, o aumento na expressão gênica foi percebido quando as CTMs cultivadas sobre as matrizes eram tratadas com o meio de indução neural. O cultivo das CTMs nas matrizes com meio convencional aumentou a expressão da nestina em relação ao seu cultivo na placa. As CTMs



cultivadas sobre as matrizes de nanofibras alinhadas, com meio convencional, mostraram aumento na expressão da NSE em relação aos demais grupos nas mesmas condições de cultivo. As CTMs cultivadas sobre o grupo RN e submetidas à indução neural mostraram aumento na expressão do gene nestina.

Os resultados apresentados sugerem que a associação entre as CTMs e as matrizes de nanofibras produzidas por ES de emulsão é viável e pode trazer vantagens relacionadas ao comportamento das CTMs. Quando as matrizes são associadas a sinais químicos e topográficos, as mesmas podem ainda otimizar a resposta celular em relação ao dano tecidual, favorecendo o processo regenerativo. Dessa forma, a união desses componentes (CTMs e matrizes de nanofibras) representa uma estratégia na promoção de um ambiente celular amigável que tente mimetizar a estrutura nativa da MEC ao máximo, tanto em seus aspectos físicos quanto químicos. Assim, as principais limitações que dizem respeito ao reparo do tecido podem ser controladas de maneira mais eficaz nesse sistema, em comparação ao uso isolado das CTMs.

Ainda, mesmo que as CTMs aplicadas isoladamente no local da lesão possam agir liberando o FC, um número muito grande de células é necessário para liberar uma quantidade pequena de fator de crescimento. Esse fato pode ser limitante para a terapia celular convencional. Portanto, no sistema desenvolvido pelo presente trabalho, a quantidade de FC liberado em 24 horas das matrizes produzidas não precisa ultrapassar 100 pg para que já seja mais eficiente do que a ação de  $10^6$  células (Parekkadan and Milwid, 2010). Como o presente sistema incorpora uma quantidade de FC maior do que o valor citado, este mostra a grande vantagem de associar as CTMs às matrizes de nanofibras através da ET.

## 6. Perspectivas

Como perspectivas futuras estão a avaliação da diferenciação neural sobre as matrizes de nanofibras em relação à expressão de genes característicos de células gliais, assim como a avaliação da capacidade funcional das CTMs diferenciadas através de parâmetros eletrofisiológicos e utilização de modelos animais que representem determinados tipos de lesões do sistema nervoso.

Esses dispositivos poderão futuramente ser aplicados, por exemplo, em lesões do SN que requerem o restabelecimento de conexões nervosas. Alguns tipos de desordens neurológicas representam importantes causas de morbidade. O exemplo mais grave, onde praticamente não há regeneração espontânea do SN, é a lesão medular. Dessa forma, intervenções externas de caráter não paliativo tornam-se essenciais. Portanto, esses dispositivos poderão agir como uma “ponte”, onde as CTMs poderão atuar substituindo neurônios lesados, através de estímulos para a diferenciação, como os mostrados no presente trabalho.

Ainda, as CTMs sobre esta “ponte” poderão secretar fatores de crescimento essenciais para o processo regenerativo e que, normalmente, estão escassos no período após a lesão. Da mesma maneira, a própria matriz artificial, conforme demonstrado, poderá liberar fatores de crescimento adequados para estimular o crescimento do novo tecido. Assim, a abordagem desenvolvida permite combinar diversas estratégias que poderão agir sinergicamente favorecendo a regeneração tecidual. Em um futuro próximo, a aplicação desses biomateriais biodegradáveis e biocompatíveis, combinados às CTMs deverão representar uma alternativa viável e promissora na medicina regenerativa neural.

## 7. Referências Bibliográficas

Arthur, A.; Ruchkov, G.; Shi, S.; Koblar, S.A.; Gronthos S. Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells* 2008; 26:1787–1795.

Barbanti, S.H.; Zavaglia, C.A.C.; Duek, E.A.R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2005;15: 13-21.

Barnabé, G.F.; Schwindt, T.T.; Calcagnotto, M.E.; Motta, F.L.; Martinez, G.Jr.; de Oliveira, A.C.; Keim, L.M.; D'Almeida, V.; Mendez-Otero, R.; Mello, L.E. Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *PLoS One*. 2009; 4(4): e5222.

Bernardi, L., Luisi, S.B., Fernandes, R., Pires, T.D., Valentim, L., Fossati, A.C.M., Pranke, P. Stem cells from the pulp of human deciduous teeth isolation related to the physiological process of resorption. *J Endod* 2010; 37:973-979, 2011.

Bothwell, M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev' Neurosci* 1995; 18: 223-53.

Boudriot, U.G.B.; Dersch, R.; Greiner, A.; Wendorff, J-H. Role of electrospun nanofibers in stem cell technologies and tissue engineering. *Macromol Symp* 2005; 225: 09-16.

Brito, L.M.O.; Chein, M.B.C.; Marinho, S.C.; Duarte, T.B. Avaliação epidemiológica dos pacientes vítimas de traumatismo raquimedular. *Rev Col Bras Cir* 2011; 38(5): 304-309.

Campos, M.F.; Ribeiro, A.T.; Listik, S.; Pereira, C.A.B.; Sobrinho, J.A.; Rapoport, A.; Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Rev Col Bras Cir* 2008; 35(2): 088-093.

Cao H.; Mchugh K.; Chew S.Y.; Anderson J.M. The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93(3):1151-9.

Çapkin, M.; Çakmak, S.; Kurt, F.Ö.; Gümüşderelioglu, M.; Sen, B.H.; Türk, B.T.; Deliloglu-Glürhan S.I. Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs. *Biomed. Mater.* 2012; 045013 14pp.

Chadipiralla, K.; Yochim, J.M.; Bahuleyan, B.; Huang, C.Y.; Garciagodoy, F.; Murray, P.E.; Stelnicki, E.J. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 2010; 340: 323-333.

Chao, Y.I.; Choi, J.K.; Jeong, S.Y.; Yoo, H.S. Nerve growth factor (NGF)-conjugated electrospun nanostructures with topographical cues for neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* 2010; 6: 4725-33.

Chew, S.Y.; Wen, J.; Yim, E.K.F; Leong, K.W. Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. *Biomacromolecules* 2005; 6: 2017- 24.

Cho K.J.; Trzaska K.A.; Greco S.J.; McArdle J.; Wang F.S.; Ye J.H.; Rameshwar P.. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha. *Stem Cells* 2005; 23: 383–391.

Christopherson G.T.; Song H.; Mao H. The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials* 2009 30:556–564.

Chua, S.W.; Bielecki, R.; Wong, C.J.; Yamanaka, N.; Rogers, I.M.; Casper, R.F. neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 379: 217-21.

Complete public version of the 2011 annual statistical report for the spinal cord injury model systems. Disponível em: <https://www.nscisc.uab.edu/reports.aspx>. Acesso em dezembro de 2012.

Cowan, W.M. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: The Path to the Discovery of Nerve Growth Factor. *Annu. Rev Neurosci* 2001; 24:551–600.

Dahlmann-Noor, A.; Vijay, S.; Jayaram, H.; Limb, A.; Khaw, P.T. Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve. *Can J Ophthalmol* 2010; 45(4): 333-41.

Davis M.E.; Hsieh P.C.; Grodzinsky A.J.; Lee R.T. *Circ Res* 2005; 97:8-15.

Del Bel E.A.; Silva C.A.; Mladinic, M. O trauma raquimedular. *Coluna/Columna* 2009; 8(4): 441-449.

Deng W.; Obrocka, M.; Fischer, I.; Prock, D.J. *In Vitro* Differentiation of Human Marrow Stromal Cells into Early Progenitors of Neural Cells by Conditions That Increase Intracellular Cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282(1):148-52.

Dersch, R.; D.R.; Greiner, A.; Wendorff, J.H. Polymer Nanofibers by electrospinning. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 2004, Marcel Dekker, Inc.

Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-17.

Dos Santos, Davi Silveira. Avaliação da influência do tempo de incubação na adesão das células-tronco mesenquimais quando cultivadas em matrizes de nanofibras. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Frade, J.M.; Barde, Y. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *BioEssays* 1998; 20:137–145.

Govindasamy, V.; Abdullah, A.N.; Ronald, V.S.; Musa, S.; Aziz, Z.A.; Zain, R.B.; Totey, S.; Bhonde, R.R.; Kasim, N.H.A. Inherent Differential Propensity of Dental Pulp Stem Cells Derived from Human Deciduous and Permanent Teeth. *J Endod* 2010; 36: 1504–1515.

Gronthos S.; Brahim J.; Li W.; Fisher L.W.; Cherman N.; Boyde A.; DenBesten P.; Robey P.G.; Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81(8):531-5.

Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahim, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 13625–13630.

Gu, X.; Ding, Fei.; Yang, Y.; Liu, J. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Progress in Neurobiology* 2011; 93: 204-30.

Guimaraes, J.; Silveira, F. Abordagem diagnóstica das neuropatias periféricas. *Acta med port* 2008; 21: 83-88.

Gupta, D.; Venugopal, J.; Prabhakaran, M.P.; Dev, V.R.G.; Low, S.; Choon, A.T.; Ramakrishna, S. Aligned and random nanofibrous substrate for the *in vitro* culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2009; 5: 2560-69.

Gustafsson, Y.; Haag, J.; Jungebluth, P.; Lundin, V.; Lim, L.M.; Baiguera, S.; Ajallouelian, F.; Del Gaudio, C.; Bianco, A.; Moll, G.; Sjöqvist, S.; Lemon, G.; Teixeira, A.I.; Macchiarini, P. Viability and proliferation of rat MSCs on adhesion protein-modified PET and PU scaffolds. *Biomaterials* 2012; 33: 8094-8103.

Hagg T.; Oudega M. Degenerative and Spontaneous Regenerative Processes after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 2006; 23: 264-280.

Han, D.; Cheung, K.C. Biodegradable cell-seeded nanofiber scaffolds for neural repair. *Polymers* 2011; 3: 1684-1733.

Harris, R.C.; Chung, E.; Coffey, R.J.; "EGF receptor ligands". *Experimental Cell Research* 2003; 284 (1): 2-1.

Helmy, K.Y.; Patel, S.A.; Silverio, K.; Pliner, L.; Rameshwar, P. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv* 2010; 1(5): 693-705.

Herbst R.S. "Review of epidermal growth factor receptor biology". *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2004; 59: 21-6.

Horne, M.K.; Nisbet, D.R.; Forsythe, J.S.; Parish, C.L. Three-dimensional nanofibrous scaffolds incorporating immobilized BDNF promote proliferation and differentiation of cortical neural stem cells. *Stem Cells Dev* 2010; 6: 843-852.

Huang A.H.; Chen Y.K.; Lin L.M.; Shieh T.Y.; Chan A.W. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med* 2008; 37:571-4.

Huang, E.J.; Reichardt, L.F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736.

Ibarretxe, G.; Crende O.; Aurrekoetxea, M.; García-Murga, V.; Etxaniz, J.; Unda, F. Neural Crest Stem Cells from Dental Tissues: A New Hope for Dental and Neural Regeneration. *Stem Cells Int* 2012; 2012:103503.

Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* 2006; 3:589-601.

Kadar, K.; Kiraly, M.; Porcsalmy, B.; Molnar, B.; Racz, G.Z.; Blazsek, J.; Kallo, K.; Szabo, E.L.; Gera, I.; Gerber, G.; Varga, G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin – promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* 2009; 7: 167-75.

Kemp, S.W.; Walsh, S.K.; Midha, R. Growth factor and stem cell enhanced conduits in peripheral nerve regeneration and repair. *Neurol Res* 2008; 30(10):1030-8.

Kim Y.T.; Haftel V.K.; Kumar S.; Bellamkonda R.V. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 2008; 29: 3117-3127.

Kim, B.J.; Seo, J.H.; Bubien, J.K.; Oh, Y.S. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport* 2002; 13(9): 1185-8.

Kopen, G.C.; Prockop, D.J.; Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 10711–10716.

Laino, G.; Carinci, F.; Graziano, A.; D'Aquino, R.; Lanza, V.; De Rosa, A.; Gombos, F.; Caruso, F.; Guida, L.; Rullo, R. *In vitro* bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* 2006; 17: 511-515.

Lannutti, J.; Reneker, D.; Ma, T.; Tomasko, D.; Farson, D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering* 2007; 27: 504–09.

Le Blanc, K.; Ringden, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11:321-324.

Lee, Y.S.; Arinzeh, T.L.; Davis, M.E.; Hsieh P.C.; Grodzinsky, A.J.; Lee R.T. Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering. *Circ Res* 2005; 97: 8-15.

Li, D.; Xia, Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Adv. Mater.* 2006; 16:1151-1170.

Li, W.J.; Laurencin, C.T.; Caterson, E.J.; Tuan, R.S.; Ko, F.K. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 613-621.

Liao, S.; Chan, C.K.; Ramakrishna, S. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Materials Science and Engineering* 2008; 28: 1189 – 1202.

Liao, Y. et al. Preparation, characterization, and encapsulation/release studies of a composite nanofiber mat electrospun from an emulsion containing poly (lactic-co-glycolic acid). *Polymer (Guildf)* 2008; 49(24): 5294–5299.

Liao, Y.; Zhang, L.; Gao, Y.; Zhu, Z.T.; Fong, H. Preparation, characterization, and encapsulation/release from an emulsion containing poly (lactic-co-glycolic acid). *Polymer* 2008; 49: 5294-99.

Lindvall, O.; Kokaia, Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders-time for clinical translation? *J Clin Invest* 2010; 120 29-40.

Lu, P.; Blesch, A.; Tuszynski, M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation or artifact? *J. Neurosci Res* 2004; 77(2): 174-91.

Ma, L.; Cui, B.L.; Feng, X.Y.; Law, F.D.; Jiang, X.W.; Yang, L.Y.; Xie, Q.D.; Huang, T.H. Biological characteristics of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their differentiation into neurocyte-like cells. *Chinese* 2006; 44(7):513-7 (Abstr).

Madduri, S.; Gander, B. Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves. *J. Control. Release* 2012; 161(2):274-82.

Madigan, N.N. et al. Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2009; 169: 183–199.

Maisonpierre, P.; Belluscio, L.; Squinto, S.; Ip, N.; Furth, M.; Lindsay, R.; Yancopoulos, G. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 1990; 247: 1446–51.

Maisonpierre, P.C.; Belluscio, L.; Freidman, B.; Alderson, R.F.; Wiegand, S.J.; Furth, M.E.; Lindsay, R.M.; Yancopoulos, G.D. NT-3, BDNF and NGF in the developing rat

nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 1990; 5(4): 501-9.

Martins, A.; Araújo, J.V.; Reis, R.L.; Neves, N.M. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine (Lond)* 2007; 2(6):929-42.

Mendez-Otero, R.; Mello, L.E. Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *PLoS One* 2009; 4(4): e5222.

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* 2003; 100(10): 5807-12.

Mosna, F.; Sensebé, L.; Krampera, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev* 2010; 19(10):1449-70.

Neuhuber, B.; Gallo, G.; Howard, L.; Kostura, L.; Mackay, A.; Fischer, I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 2004; 77(2): 192-204.

Norman, J.J.; Desai, T.A. Methods for Fabrication of Nanoscale Topography for Tissue Engineering Scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering* 2006; 34 (1): 89-101.

Nourbakhsh, N.; Soleimani, M.; Taghupour, Z.; Karbalaie, K.; Mousavi, S.B.; Talebi, A.; Nadali, F.; Tanhaei, S.; Kiyani, G.A.; Nematollahi, M.; Rabiei, F.; Mardani, M.; Bahramiyani, H.; Torabinejad, M.; Nasr-Esfahani, M.H.; Baharvand, H. Induced *in vitro* of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int. J. Dev. Biol* 2011; 55: 189-95.

Orive, G.; Anitua, E.; Pedraz, J.L.; Emerich, D.F. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 682-692.

Parekkadan B. and Milwid J.M. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12:87-117.

Perry, B.C.; Zhou, D.; Wu, X.; Yang, F.C.; Byers, M.A.; Chu, T.M.; Hockema, J.J.; Woods, E.J.; Goebel, W.S. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods* 2008; 14: 149-156.

Pittenger, M.F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

Portmann-Lanz C.B.; Schoeberlein A.; Portmann R.; Mohr S.; Rollini P.; Sager R.; Surbek D.V. Turning placenta into brain. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202:294.e1-e11.

Portmann-Lanz, C.B.; Schoeberlein, A.; Portmann, R. *et al.* Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. *J Obstet Gynecol* 2010; 202-94.

Prabhakaran, M.P.; Venugopal, J.R.; Ramakrishna, S. Mesenchymal stem cells differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30: 4996-5003.

Qi R.; Shen M.; Cao X.; Guo R.; Tian X.; Yuand J.; Shi X. Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials. *Analyst* 2011; 136, 2897.

Qi, H.; Hu, Ping.; Xu, J.; Wang, A. Encapsulation in Fibers by Emulsion Electrospinning: Morphology Characterization and Preliminary Release Assessment. *Biomacromolecules* 2006; 7: 2327-30.

Rismanchi, N.; Floyd, C.L.; Berman, R.F.; Lyeth B.G. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. *Brain Res* 2003; 991: 46-55.

Rodrigues, L.P.; Iglesias, D.; Nicola, F.C.; Steffens, D.; Valentim, L.; Witczak, A.; Zanatta, G.; Achaval, M.; Zatz, M.; Pranke, P.; Netto, C.A. Functional recovery of wistar rats with traumatic spinal cord injury after in situ administration of human umbilical cord mesenchymal stromal cells. In: *ISSR 10<sup>th</sup> Annual meeting*. 2011.

Rodrigues, L.P.; Iglesias, D.; Nicola, F.C.; Steffens, D.; Valentim, L.; Witczak, A.; Zanatta, G.; Achaval, M.; Pranke, P.; Netto, C.A. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45: 49-57.

Rodríguez-Lozano, F.J.; Insausti, C.L.; Iniesta, F.; Blanquer, M.; Ramírez, M.D.; Meseguer, L.; Meseguer-Henarejos, A.B.; Marín, N.; Martínez, S.; Moraleda, J.M. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17: 1062-7.

Sahni, V.; Kessler, J.A. Stem cell therapies for spinal cord injury. *Nat Rev Neurol* 2010; 6(7): 363-72.

Saino E.; Focarete M.L.; Gualandi C.; Emanuele E.; Cornaglia A.I.; Imbriani M.; Visai L. Effect of Electrospun Fiber Diameter and Alignment on Macrophage Activation and Secretion of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. *Biomacromolecules* 2011; 12:1900–1911.

Sakai, V.T.; Zhang, Z.; Dong, Z.; Neiva, K.G.; Machado, M.A.; Shi S.; Santos, C.F.; Nor, J.E. Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *J Dent Res* 2010; 89: 791-796.

Sanchez-Ramos, J.; Song, S.; Cardozo-Pelaez, F.; Hazzi, C.; Stedeford, T.; Willing, A.; Freeman, T.B.; Saporta, S.; Janssen, W.; Patel, N.; Cooper, D.R.; Sanberg, P.R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 2000; 164(2):247-56.

Santos Jr., A.R.; Wada, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2007; 17: 308-317.

Schmidt, C.E.; Leach, J.B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 2003; 5: 293-347.

Scuteri, A.; Miloso, M.; Foudah, D.; Orciani, M.; Cavaletti, G.; Tredici, G. Mesenchymal stem cells neuronal differentiation ability: a real perspective for nervous system repair? *Stem Cell Res Ther* 2011; 6(2): 82-92.

Secco, M.; Zucconi, E.; Vieira, N.M.; Fogaça, L.L.Q.; Cerqueira, A.; Carvalho, M.D.F.; Jazedje, T.; Okamoto, O.K.; Muotri, A.R.; Zatz, M. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem cells* 2008; 26: 146–150.

Siqueira, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. *Rev Neurocienc* 2007; 15(3): 226-233.



Smith, I.O.; Liu, X.H.; Smith, L.A.; Ma, L.A. Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2009; 1(2): 226–236.

Soares, A.P.; Knop, H.L.A.; Jesus, A.A.; Araújo, T.M.R. Células-tronco em Odontologia. *Dental Press Ortodon Ortop Facial* 12: 33-40 2007.

Sofroniew, M.V.; Howe, C.L.; Mobley, W.C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci* 2001; 24:1217–281.

Soleimani, M.; Nadri, S.; Shabani, I. neurogenic differentiation of human conjunctiva mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold. *Int. J. Dev. Biol* 2010; 54: 1295-300.

Staniszewska I.; Sariyer I.K.; Lecht S.; Brown M.C.; Walsh E.M.; Tuszynski G.P.; Safak M.; Lazarovici P.; Marcinkiewicz C. Integrin  $\alpha 9\beta 1$  is a receptor for nerve growth factor and other Neurotrophins. *J Cell Sci.* 2008; 121: 504–513.

Steffens, Daniela. Desenvolvimento de matrizes de Poli-D,L-ácido láctico pela técnica de *electrospinning* para utilização no cultivo de células-tronco para a engenharia de tecidos. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Sung H.; Meredith C.; Johnson C.; Galis Z.S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 2004; 25:5735–5742.

Thuret, S.; Moon, L.D.F.; Gage, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 628-643.

Tian F.; Hosseinkhani H.; Hosseinkhani M.; Khademhosseini A.; Yokoyama Y.; Gomez Estrada G.; Kobayashi H. Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro- and nanofibers. *Journal of Biomedical Materials Research* 2008; 84(2):291-9.

Wang, H.B.; Mullins, M.E.; Cregg, J.M.; McCarthy C.W.; Gilbert, R.J. Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration. *Acta Biomaterialia* 2010; 6 2970–2978.

Wang, J.; Wang, X.; Sun, Z.; Wang, X.; Yang, H.; Shi, S.; Wang, S. Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth Can Differentiate into Dopaminergic Neuron-Like Cells. *Stem Cells and Development* 2010; 19: 1375-1383

Wang, Y.; Zhao, Z.; Zhao, B.; Qi, H.X.; Peng, J.; Zhang, L.; Xu, W.J.; Hu, P.; Lu, S.B. Biocompatibility evaluation scaffolds with peripheral nerve tissues and cells *in vitro*. *Chinese Medical Journal* 2011; 124(15): 2361-66.

Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Heiss, C.; Alt, V.; Klisch, C.; Meissl, H.; Schnettler, R. Bone. Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone* 2006; 38(6):911-21.

Willerth, S.M.; Sakiyama-Elberth, S.E. StemBook: Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, 2008.

Woodbury, D.; Schwarz, E.J.; Prockop, D.J.; Black, I.B. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 61: 364-70.

Wu, L.; Ding, J. *In vitro* degradation of three-dimensional porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 5821-30.

Xiaoqiang, L.; Yan, S.; Shuiping, L.; Lianjiang, T.; Xiumei, M.; Ramakrishna, S. Encapsulation of proteins in poly (L-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 75: 418-24.

Xiaoqiang, L.; Yan, S.; Shuiping, L.; Lianjiang, T.; Xiumei, M.; Ramakrishna, S. Encapsulation of proteins in poly (L-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010; 75: 418-24.

Xie, J.; MacEwan, M.R.; Schwartz, A.G.; Xia, Y. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale* 2010; 2(1):35-44.

Xu, C.H.; 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.

Yan, S.; Xiaoqiang, L.; Shuiping, L.; Xiumei, M.; Ramakrishna, S. Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; 73: 376-81

Yang, F. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 2603-2610.

Yang, F.; Murugan, R.; Ramakrishna, S.; Wang, X.; Ma, Y.X.; Wang, S. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 1891-00.

Yang, H.; Xia, Y.; Lu, S.Q.; Soong, T.W.; Feng, Z.W. Basic Fibroblast Growth Factor-induced Neuronal Differentiation of Mouse Bone Marrow Stromal Cells Requires FGFR-1, MAPK/ERK, and Transcription Factor AP-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 5287-5295.

Ye, Z.; Mahato, R.I. Role of nanomedicines in cell-based therapeutics. *Nanomedicine* 2008; 3: 5-8.

Yuen, E.C.; Howe, C.L.; Yiwen, L.; Holtzman, D.M.; Mobley, W.C. Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis. *Brain and Development* 1996; 18: 362-368.

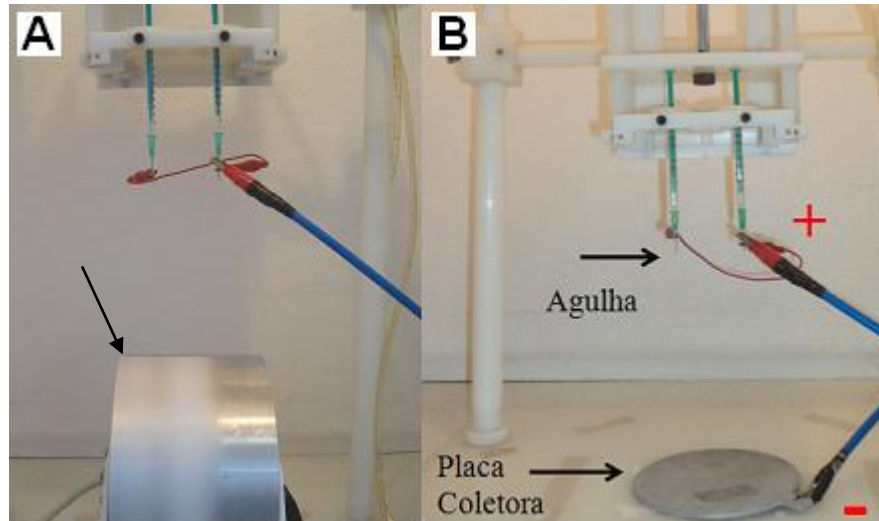
Zanatta, G; Rudisile, M; Camassola, M; Wendorff, J; Nardi, N; Pranke, P; Netto, C. A. Mesenchymal stem cell adherence on Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanofibers scaffold is integrin- $\beta$ 1 receptor dependent. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2012; 8(2):211-8.

Zhang N. and Kohn D.H. Using Polymeric Materials to Control Stem Cell Behavior for Tissue Regeneration. *Birth Defects Research* 2012; 96:63-81.

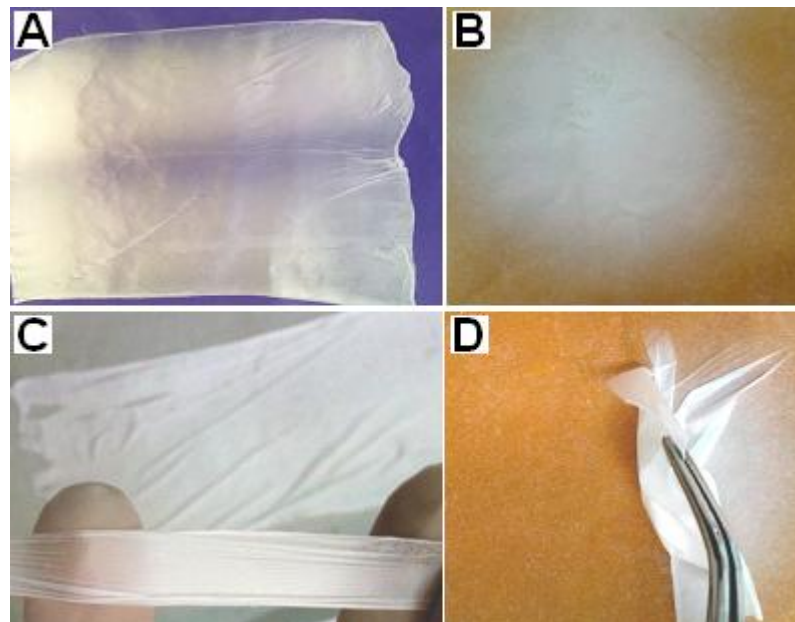
Zhaoyang, Y.; Mahato, R.I. Role of nanomedicines in cell-based therapeutics. *Nanomedicine* 2008; 3: 5-8.

## ANEXO

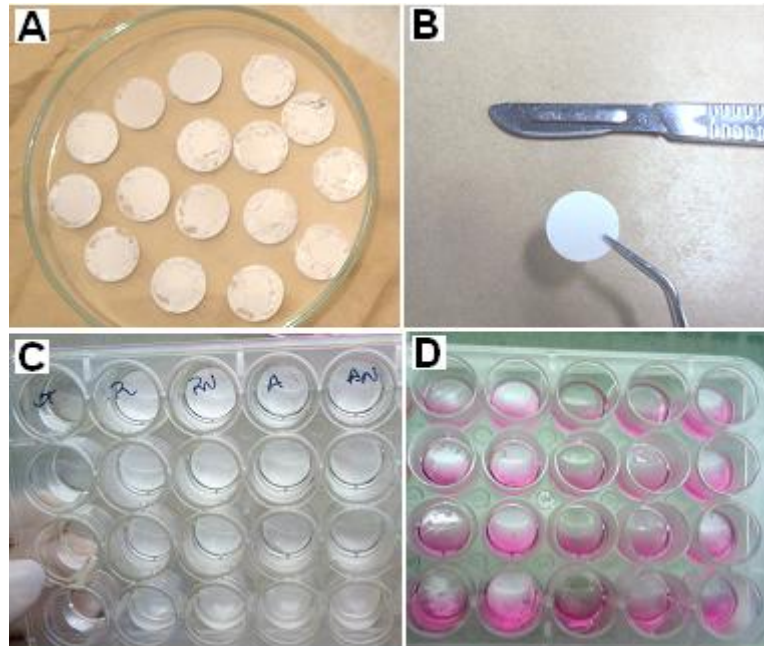
Anexo I – Imagens do processo de produção das matrizes de nanofibras e seu processamento até a semeadura das CTMs.



**Figura 1** - Aparato de *Electrospinning* utilizado para a produção das matrizes de nanofibras: (a) Aparato utilizado para produção das nanofibras alinhadas. A seta indica as nanofibras depositadas sobre o cilindro. (b) Aparato utilizado para a produção das nanofibras randomizadas. Foto: Laboratório de Hematologia e Células-tronco, UFRGS.



**Figura 2** - Matrizes de nanofibras produzidas coletadas sobre papel: (A) matrizes com nanofibras alinhadas e (B) matrizes com nanofibras randomizadas. Aspetto das matrizes alinhadas (C) e randomizadas (D) durante manipulação. Fonte: arquivo próprio.



**Figura 3** - Matrizes de nanofibras coladas sobre lamínulas de vidro durante seu preparo para a primeira etapa de esterilização. (A) várias matrizes de um mesmo grupo e (B) matriz mostrada isoladamente. (C) Matrizes de nanofibras coladas em lamínulas posicionadas nas placas de cultura de 24 poços para a última etapa de esterilização. (D) Matrizes de nanofibras pós-semeadura celular com meio de cultivo. Fonte: arquivo próprio.

## Anexo II – TCLE (Termo de consentimento livre e esclarecido)

## CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE DENTES DECÍDUOS PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PARA O PROJETO DE PESQUISA:

*“Avaliação da diferenciação de células-tronco mesenquimais em matrizes de nanofibras contendo o fator de crescimento neural incorporado e sua aplicação como base para engenharia de tecidos”.*

Pesquisas recentes têm indicado que existem células-tronco no dente-de-leite (decíduos). O objetivo deste trabalho é utilizar as células dos dentes decíduos para derivar linhagens de células-tronco para uso em pesquisa básica, pré-clínica e clínica.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo. Ao participar desta pesquisa, o paciente não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que futuramente os resultados desse estudo sejam usados em benefício de outros pacientes. Os procedimentos utilizados nesta pesquisa obedecem aos critérios da ética na Pesquisa com Seres Humanos conforme a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de saúde. Nenhum dos procedimentos utilizados oferece riscos à sua dignidade. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa. O critério de inclusão dos doadores para essa pesquisa será os pacientes atendidos no setor de Odontologia Pediátrica da UFRGS que necessitam realizar procedimentos para remoção dos dentes decíduos. Esse delineamento será realizado pelo dentista responsável pela criança não havendo conexão com os pesquisadores desse projeto. Serão excluídos desse estudo os pacientes que necessitam remover outros dentes que não os decíduos. Para proteger a privacidade do paciente, a identidade não será revelada após a doação do dente nem para os pesquisadores envolvidos.

Eu, \_\_\_\_\_ (responsável pelo paciente menor de idade), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, estou de acordo com a participação nesse estudo e autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, doar o dente depois da extração. O material coletado ficará armazenado ao longo do período de realização da pesquisa e ao final do período será descartado. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS (nº 19273) que se localiza na Avenida Paulo Gama, 110 no 2º andar do prédio da Reitoria, telefone (51) 3308-3738.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Responsável pelo Participante

Pesquisador Responsável:

RG: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Telefone de contato: