

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

**MATRIZES DE NANOFIBRAS ALINHADAS COM FATOR DE CRESCIMENTO
EPIDERMAL INCORPORADO COMO SUPORTE EFICIENTE PARA A
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM CÉLULAS NEURAIS**

THAYANE ANTONIOLLI CRESTANI

Porto Alegre, 2013

THAYANE ANTONIOLLI CRESTANI

**MATRIZES DE NANOFIBRAS ALINHADAS COM FATOR DE CRESCIMENTO
EPIDERMAL INCORPORADO COMO SUPORTE EFICIENTE PARA A
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM CÉLULAS NEURAIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Jotz
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Pranke

Porto alegre, 2013

Dedico este trabalho aos meus exemplos de vida, **Levino e Ademildes**, pelo constante apoio, contribuindo para eu me tornar uma pessoa cada vez melhor. E a todos os pesquisadores que incansavelmente dedicam-se a desvendar os mistérios da Ciência.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer os meus orientadores, **Prof. Dr. Geraldo Jotz** e **Prof^ª. Dr^ª. Patricia Pranke** pela oportunidade, pela confiança e pelo belo exemplo de profissionalismo. Todo o conhecimento que me proporcionaram em não somente esses dois anos de mestrado é imensurável! Obrigada por tudo e principalmente por acreditarem tanto no meu potencial quando às vezes nem eu acredito!

Agradeço ao meu “co-co-orientador” **Prof. Dr. Diogo André Pilger** por ser sempre tão receptivo quando eu necessitei esclarecer dúvidas. Tua dedicação e participação diária na busca de respostas frente às dúvidas que surgiram no desenvolvimento deste trabalho foi uma contribuição muito importante! Obrigada por ser sempre tão atencioso comigo e pelo exemplo de profissionalismo.

À minha querida amiga e co-autora desse trabalho **Kerlin Quintiliano**, por ter vivenciado comigo cada minuto dessa conquista. Pela parceria nos experimentos, pela amizade, pelo ombro amigo quando precisei e por ouvir as minhas tantas lamentações. Obrigada por todo o teu apoio na elaboração de cada “pedaço” deste trabalho, não sei se teria conseguido sem a tua ajuda!

Á minha maravilhosa bolsista de iniciação científica **Virginia Etges Helfer**, umas das minhas melhores escolhas! Obrigada pela tua ajuda durante os diversos experimentos deste trabalho. A tua competência, disponibilidade e pro-atividade são admiráveis!

Aos “meus” bolsistas de iniciação científica emprestados, **Davi Silveira dos Santos** e **Eduardo A. Balbuena**, pela ajuda indispensável durante a execução deste trabalho, inclusive tecnológica. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos que precisei.

Ao **Prof. Dr. Antonio C. Cassola** pelo tempo dedicado aos experimentos de eletrofisiologia, pelo auxílio nas análises, pela paciência e pelos ensinamentos nessa “outra ciência”.

À **Estela Mitie Cruvinel** pela ajuda no estabelecimento do protocolo de diferenciação neural e pela colaboração nos experimentos de eletrofisiologia.

Aos colegas de laboratório **Dani, Dai, Bruna, Janine, Andrea, Fernanda, Pedro, Yakime, Martina, Régis, Gabriel, Douglas, Joelson, Gerson, Lisi, Daniele, Stefanie** por toda a ajuda e amizade. Pelo ótimo convívio no laboratório mesmo precisando dividir um espaço “apertadinho” diante o experimento de todos. Obrigada por compreenderem meus momentos de nervosismo e me proporcionarem tantos momentos de descontração.

Às ex-colegas de laboratório **Cris** e **Anne** pela amizade, pelas risadas trocadas, por cuidarem da organização do laboratório e pelas broncas quando necessárias.

À **Fernanda** e a técnica **Simone**, pela ajuda em sempre organizar a “bagunça” do laboratório.

Aos meus pais, **Levino** e **Ademildes**, por todo o esforço que fizeram para a minha formação. Por todo o amor e paciência apesar das incontáveis vezes que descarreguei em vocês todo o meu cansaço e mal-humor. Obrigada pelo apoio e auxílio em todas as minhas decisões e por me ensinarem a sempre buscar a realização dos meus sonhos.
Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, **Thayse** e **Thales**, os quais eu tenho muito orgulho. Obrigada pelo contínuo estímulo e por não medirem esforços em me ajudar. É muito bom ter a certeza que eu sempre posso contar com vocês!

Ao meu querido namorado, **João Henrique**, pelo carinho, pelo companheirismo e pela ajuda com as correções em inglês. Obrigada por compreender a minha ausência e “crises” de ansiedade e nervosismo em alguns momentos.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Neurociências** desta Universidade pela excelência científica em ensino.

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

Ao **Instituto de Pesquisa com Células-tronco** pelo apoio financeiro e por proporcionar a todos os alunos aprendizagem, formando profissionais mais capacitados.

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

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

Sumário

Lista de Figuras e tabelas	8
Lista de Abreviaturas	9
Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução.....	14
1.1. Danos ao sistema nervoso central	14
1.2. Células-tronco e Terapia Celular.....	14
1.2.1 Células-tronco mesenquimais derivadas de dentes decíduos humanos esfoliados	16
1.3. Nanofibras como matrizes na Engenharia de Tecidos	19
1.3.1 Técnica de <i>Electrospinning</i>	20
1.4. Incorporação de fatores de crescimento em matrizes de nanofibras	23
1.5. Fator de crescimento epidermal	26
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. Artigo Científico	30
4. Discussão	62
5. Conclusão	77
6. Referências bibliográficas.....	79
7. Anexos	90

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática do aparato de *electrospinning*.

Tabela 1: Perfil imunofenotípico das SHEDs analisadas por citometria de fluxo.

Figura 2: Diferenciação das CTMs nas linhagens (A) osteogênica, (B) adipogênica e (C) condrogênica, coradas com *Alizarin Red*, *Oil Red* e *Alcian Blue* respectivamente; (D) controle (CTMs não diferenciadas).

Figura 3- Fotografia do aparato de *electrospinning*.

Figura 4: Matrizes de nanofibras produzidas por ES fixadas em lamínulas de vidro (A) e colocadas em placas de cultura de 24 poços (B) para posterior cultivo das CTMs.

LISTA DE ABREVIATURAS

3D - Três dimensões

® - Marca registrada

% - Porcentagem

° - Graus

°C - Graus Celsius

± - mais ou menos

< - Menor que

> - Maior que

AC - *Scaffolds* com nanofibras alinhadas controle

AE - *Scaffolds* com nanofibras alinhadas contendo fator de crescimento epidermal

AR - Ácido retinóico

AsAp - Ácido ascórbico-2 fosfato

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *Brain-derived Neurotrophic Factor*)

BrdU - 5-bromo-2-deoxiuridina

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

Ca²⁺ - Íon de cálcio

cm² - centímetro quadrado

CD - antígeno celular (do inglês, *Cluster of Differentiation*)

CO₂ - Dióxido de carbono

CT - Células-tronco

CTMs - Células-tronco mesenquimais

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

DIF - Células induzidas à diferenciação neural

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

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzimaimunoensaio (do inglês, *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)

ES - Eletrofiação (do inglês, *Electrospinnig*)

EGF - Fator de crescimento epidermal (do inglês, *Epidermal Growth Factor*)

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*)

ET - Engenharia de Tecidos

FC - Fator de crescimento

FDA - *Food and Drug Administration*

fg - Fentograma

g - Força que exerce a gravidade

GAD - Glutamato descarboxilase (do inglês, *Glutamic Acid Decarboxylase*)

GDNF - fator neurotrófico derivado da glia (do inglês, *Glial-Derived Neurotrophic Factor*)

GFAP - Proteína fibrilar glial ácida (do inglês, *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GPC - Cromatografia de permeação em gel (do inglês *Gel Permeation Chromatography*)

GRD - Gânglios da raiz dorsal

HEPES - n-2 hidroxietil piperazine- n' - 2 ácido sulfônico etano

HFIP - 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol

HLA-DR - do inglês, *human leukocyte antigens*

K⁺ - Íon de potássio

kV - kilovolts

LDH - Lactato Desidrogenase

M - Molar

m³ - Metro cúbico

µg - Micrograma

µg/mL - Micrograma por mililitro

MAP2 - Proteína associada aos microtúbulos (do inglês, *mitogen-activated protein*)

MAPT - Proteína tau associada aos microtúbulos (do inglês, *mitogen-activated protein tau*)

MEC - matriz extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/mL - Miligrama por mililitro

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

m/m - massa/massa

MSCs - do inglês, *Mesenchymal Stem Cells*

MTT - Método do Sal de Tretazolium

n - número de amostra

N DIF - Células não induzidas à diferenciação neural

Na⁺ - Íon de sódio

Nav - Correntes dependentes de voltagem para Na⁺

NeuN - Antígeno neuronal nuclear (do inglês, *Neuronal Nuclear Antigen*)

NFM - Proteína de neurofilamento intermediário (do inglês, *Neurofilament medium*)

ng - Nanograma

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

NMDA - N-metil-d-aspartado

NMDG - n-metil-D-glucamina

nm - Nanometro

nM - Nanomolar

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

pf - Picofarad

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

PE - Ficoeritrina (do inglês, *Phycoeritrin*)

pS - Picosiemens

RIP - do inglês, *regular phenobarbitol-inducible P450*

rpm - Rotações por minuto

SFB - Soro fetal bovino

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

SNC - Sistema nervoso central

SVZ - zona subventricular (do inglês, *subventricular zone*)

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

TE - do inglês, *Tissue engineering*

THF - Tetrahidrofurano

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

x – Vezes

Resumo

Danos ao sistema nervoso central (SCN) resultam em perda de conexões axonais, das funções motoras e sensoriais. Uma das estratégias para seu reparo é o transplante de células-tronco mesenquimais (CTMs). Porém essa alternativa requer uma adequada via de aplicação. Nesse sentido, o uso de matrizes alinhadas pode ser usado para apoiar o crescimento e diferenciação das CTMs e, quando incorporadas com fatores de crescimento, otimizam o processo de regeneração tecidual. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diferenciação neural das CTMs cultivadas sobre matrizes de nanofibras orientadas com o fator de crescimento epidermal (EGF) incorporado. Os *scaffolds* com fibras alinhadas foram produzidos por *electrospinning* de emulsão e avaliados conforme a sua morfologia, o diâmetro das nanofibras, a degradabilidade e a liberação do EGF. As CTMs utilizadas foram provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos. Essas células foram cultivadas nos *scaffolds* e avaliadas conforme os testes biológicos: adesão, viabilidade, proliferação, citotoxicidade e diferenciação neural. Os *scaffolds* com fibras alinhadas controle (AC) e contendo o EGF (AE) apresentaram morfologia, diâmetro das nanofibras e tempo de degradação semelhantes. Com base no total de EGF presente na matriz AE, 90,14% foi liberado após 28 dias. O citoesqueleto e o núcleo das CTMs cultivadas nos *scaffolds* AC e AE estavam mais alongados e alinhados quando comparado com as CTMs cultivadas no poço de cultura (controle). As CTMs aderiram mais nas matrizes AE em relação às matrizes AC, porém a proliferação e viabilidade celular foram similares, exceto no tempo de 72 horas, o qual a viabilidade no grupo controle foi maior, em comparação aos demais grupos. Os *scaffolds* AC e AE não foram tóxicos para as CTMs. Em relação aos resultados da neuro-diferenciação, a expressão de nestina e neurofilamentos consideravelmente maior em todos os grupos analisados quando comparado ao grupo controle. A expressão de β III-tubulina e GFAP foi maior em todos os grupos diferenciados quando comparada ao grupo controle. A maioria das CTMs cultivadas nas matrizes AC e AE, induzidas ou não à diferenciação neural, apresentaram correntes dependente de voltagem para sódio. O valor de condutância máxima foi maior para todos os grupos analisados quando comparado ao grupo controle onde as células não foram diferenciadas. Portanto, as matrizes com nanofibras orientadas induzem à diferenciação neural das CTMs em neurônios funcionais tanto na ausência como na presença de EGF incorporado. As matrizes AE ainda mostraram ser capazes de melhorar a adesão celular. Dessa forma, conclui-se que as matrizes de nanofibras estudadas são uma possível estratégia para otimização da regeneração de lesões neurológicas.

Palavras-chaves: Fator de crescimento epidermal, engenharia de tecidos, *scaffolds*, células-tronco mesenquimais, reparo de lesões neurológicas

Abstract

Damage to the central nervous system (CNS) results in loss of axonal connections and motor and sensory functions. One of the strategies for its repair is the transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs). However, this requires a suitable application route. Accordingly, the use of scaffolds support the growth of MSCs and, when incorporated with growth factors, optimize the regeneration process. The purpose of this study was to evaluate the neural differentiation of MSCs cultured on nanofiber matrices oriented with epidermal growth factor (EGF) incorporated. Aligned scaffolds were produced by electrospinning emulsion and evaluated according to their degradation, the morphology and diameter of the nanofibers, and release of EGF from the nanofibers. MSCs used were from human exfoliated deciduous teeth (SHED). These cells were cultured on the scaffolds and evaluated according to biological tests: adhesion, viability, proliferation, cytotoxicity and neural differentiation. The aligned control scaffolds (AC) containing EGF (AE) presented similar morphology, diameter of nanofibers and degradation time. Based on the total EGF present in the scaffold AE, 90.14% was released after 28 days. The cytoskeleton and the core of the MSCs cultured on scaffolds AC and AE were more aligned and elongated when compared to the MSCs grown on plate wells (control). MSCs adhered more to matrices AE when compared to matrices AC, although proliferation and cell viability were similar, except after 72 hours. In this period, the viability of the control group was higher when compared to the rest of the groups. Scaffolds AC and AE were not toxic to MSCs. In regard to the results of neuro-differentiation, the expression of nestin and neurofilament was much higher in all groups than the control group. The expression of β III tubulin and GFAP was higher in all differentiated groups than the control group. Most of the MSCs grown in matrices AC and AE, induced or not to neural differentiation, showed voltage-dependent sodium currents. The maximum value of conductance of these groups was higher for the cells in all groups compared to the control group, where the cells were not differentiated. Therefore, oriented nanofiber matrices induce neural differentiation of MSCs into functional neurons both in the absence and in the presence of incorporated EGF. The matrices AE also showed improved cell adhesion. Thus, these matrices are a possible strategy for optimizing the regeneration of neurologic lesions.

Keywords: epidermal growth factor, tissue engineering, scaffolds, mesenchymal stem cells, repair of neurological injuries

1. INTRODUÇÃO

1.1. Danos ao sistema nervoso central

Os danos ao sistema nervoso, causados por fatores mecânicos, químicos, térmicos ou isquêmicos, podem prejudicar várias funções neurológicas tais como cognição, memória, linguagem e movimento voluntário. Na maioria das vezes, esses fenômenos ocorrem através de esmagamento ou transecção de vias nervosas resultando na interrupção da comunicação entre os corpos de células nervosas e seus tecidos alvos. Entre os tipos de lesão neurológica, aquelas que envolvem o sistema nervoso central (SNC) estão entre as mais propensas a resultar em morte ou invalidez permanente (Zhang *et al.*, 2005).

Após uma lesão no SNC, os macrófagos infiltram-se lentamente no local da lesão. Os astrócitos reativos, os glicosaminoglicanos e outras moléculas inibidoras impedem os neurônios e outras células de se infiltrarem no local da lesão, formando a cicatriz glial que limita a capacidade auto-regenerativa do microambiente. Esses eventos inflamatórios resultam na perda das conexões axonais, conduzindo, conseqüentemente, à perda das funções motoras, sensoriais e autonômicas normalmente de modo (ou forma) irreversível (Thuret *et al.*, 2006)

Diferentes estudos têm demonstrado que, para promover a regeneração axonal no SNC lesado, um ambiente *in vivo* adequado é fundamental. Apesar de ainda não haver uma terapia eficaz para o reparo das lesões no SNC, o transplante de células-tronco (CT) é uma estratégia promissora. As células transplantadas preenchem a cavidade resultante da lesão, substituem as células mortas e criam um ambiente favorável para a regeneração axonal. Ainda, essas células podem se diferenciar em neurônios permitindo a formação de novos circuitos e, quando transplantadas, levam à redução da lesão e melhora comportamental em animais (Lindvall e Kokaia, 2004; Thuret *et al.*, 2006).

1.2. Células-tronco e Terapia Celular

A medicina regenerativa tem por objetivo reparar ou substituir tecidos lesados do organismo (Quaglia, 2008). Nos últimos anos, observa-se um grande avanço nesse campo, devido ao melhor entendimento da célula e do processo de regeneração tecidual.

A terapia celular, com base no uso das CT, oferece uma grande vantagem, pois estas células apresentam elevada plasticidade, com capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação em outras linhagens celulares (Nardi e Meirelles, 2006).

As CT são classificadas, quanto a sua origem, em embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são totipotentes (até o terceiro dia do desenvolvimento embrionário) ou pluripotentes (na fase de blastocisto). Essas células são capazes de gerar todos os tipos celulares encontrados no organismo humano. Entre as células-tronco adultas, algumas também apresentam alta plasticidade, enquanto outras são consideradas multipotentes, ou seja, diferenciam-se em um número limitado de células (Nardi e Meirelles, 2006). Entre os diferentes tipos de células-tronco adultas existentes, as células-tronco hematopoéticas foram as primeiras a serem descritas. Posteriormente, foram descobertas as células-tronco mesenquimais (CTMs), as quais têm sido reconhecidas com as CT adultas com a maior plasticidade (Barry e Murphy, 2004; Chevallier *et al.*, 2009; Zuk *et al.*, 2001).

As CTMs são uma opção promissora para a utilização terapêutica devido a sua capacidade de auto-renovação e de diferenciação em diversos tipos celulares, bem como devido a facilidade de obtenção (Dominici *et al.*, 2006). Além disso, as CTMs não apresentam problemas éticos relacionados à sua utilização (Vindigni *et al.*, 2010). No ser humano, a medula óssea é a sua principal fonte. Entretanto, as CTMs têm sido isoladas de diversos órgãos e tecidos, tais como o tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical (Secco *et al.*, 2008), polpa dentária (Bernardi *et al.*, 2011; Miura *et al.*, 2003), entre outros. Diante da dificuldade da punção da medula óssea, essas últimas fontes têm sido utilizadas como uma alternativa acessível para o isolamento das CTMs.

As CTMs são reconhecidas pela sua pluripotencialidade sendo capazes de se diferenciar em **condroblastos**, **osteoblastos**, **adipócitos**, bem como todos os tipos celulares das três camadas germinativas, quando submetidas às condições apropriadas (Barry e Murphy, 2004; Chevallier *et al.*, 2009; Zuk *et al.*, 2001). A *International Society for Cellular Therapy* detalhou três propriedades que devem ser evidenciadas para que as células sejam designadas como CTMs: isolamento por aderência em plásticos e proliferação *in vitro*; diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos; bem como o perfil imunofenotípico com positividade para os marcadores CD73, CD90 e CD105 e negatividade para CD11b, CD14 CD19, CD34, CD45 ou CD79 alfa e HLA-DR, estes últimos marcadores de células-tronco hematopoéticas (Carrancio *et al.*, 2008;

Dominici *et al.*, 2006;). Desse modo, as células utilizadas nesse trabalho foram caracterizadas como CTMs conforme anexo I.

Embora as CTMs tenham despertado grande interesse devido ao seu possível potencial de envolvimento no processo de reparo tecidual, as suas funções não estão restritas à reposição celular. As citocinas e fatores de crescimento liberados por elas apresentam efeitos tróficos, tais como modulação do sistema imune, inibição da fibrose e apoptose, aumento da angiogênese, estímulo para divisão e diferenciação celular (Caplan e Dennis, 2006). Recentemente, demonstrou-se que as CTMs produzem fatores neurotróficos que são importantes para a sobrevivência e a funcionalidade dos neurônios. Além disso, essas células, quando induzidas à neurogênese através de meio de cultura de diferenciação, modificam sua morfologia e alteram a expressão de proteínas (Sadan *et al.*, 2009).

1.2.1. Células-tronco mesenquimais derivadas de dentes decíduos humanos esfoliados

A existência de CT derivadas do tecido pulpar de dentes incisivos decíduos humanos esfoliados (SHEDs, do inglês *Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth*) foi proposta por Miura e colaboradores em 2003. Essas células são de origem mesenquimal e demonstraram potencial de diferenciação adipogênico, osteogênico, condrogrênico e neurogênico quando submetidas a condições *in vitro* apropriadas. (Miura *et al.*, 2003).

Além disso, Miura e colaboradores atribuíram maior potencial de proliferação e clonogenicidade às SHEDs, quando comparadas às células-tronco derivadas da medula óssea (Miura *et al.*, 2003). Do ponto de vista prático, um baixo número de células-tronco exige um maior tempo para a expansão *in vitro*, a fim de obter um número significativo de células para a terapia celular. Esse procedimento pode ser demorado, de alto custo, não descartando o risco de ocorrer problemas como contaminações e perdas celulares, devido à manipulação do material biológico. Se por um lado, a polpa de dentes decíduos tem um baixo número inicial de células, por outro lado, essas células apresentam uma rápida e grande capacidade proliferativa. Desse modo, as SHEDs são uma fonte ideal de CTMs para pesquisa, porque não provocam desconforto de coleta ao paciente e também são capazes de produzir um número substancial de células, evitando assim longo período em cultura e diminuindo ao máximo a manipulação do material

(Miura *et al.*, 2003). A redução no tempo de manipulação *in vitro* diminui a chance de ocorrer alterações genéticas nas células em cultura, o que não é permitido para um material que possa vir a ser implantado em um novo organismo (Miura *et al.*, 2003).

Outra grande vantagem apontada ao uso dessas células refere-se à sua facilidade de obtenção, uma vez que os dentes utilizados são aqueles que caem naturalmente (dentes de leite), não sendo necessário um processo invasivo como a coleta de material da medula óssea (Miura *et al.*, 2003).

Autores como Miura e Huang mostraram que as SHEDs expressam uma variedade de marcadores moleculares de células neurais mesmo quando cultivadas em condições normais. Isso não ocorre com CTMs de outras fontes, como medula óssea, por exemplo, evidenciando o comprometimento das SHEDs com a linhagem neural, possivelmente relacionado à sua origem da crista neural. Entre os marcadores, podemos citar os genes: β III-tubulina, tau, glutamato descarboxilase (GAD), antígeno neuronal nuclear (NeuN), Neurofilamento M (NFM) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Com a utilização do protocolo de diferenciação neural, as SHEDs apresentam a expressão aumentada de β III-tubulina, GAD e NeuN, enquanto que os outros marcadores neurais, como NFM, tau e GFAP, permanecem inalterados (Huang *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 2003). Além disso, a morfologia das células também é alterada, surgindo processos multicitoplasmáticos que expressam MAP2 e MAPT, as quais são proteínas associadas aos microtúbulos. O potencial de desenvolvimento neural também foi demonstrado *in vivo* através do implante das SHEDs no giro denteado do hipocampo de ratos imunocomprometidos. Essas células sobreviveram por mais de 10 dias dentro do microambiente do encéfalo do rato e expressaram marcadores neurais, como NFM (Miura *et al.*, 2003).

Não existe na literatura um consenso entre o melhor meio que deve ser utilizado para diferenciar as células-tronco na linhagem neural. Dessa forma, Helfer e colaboradores avaliaram a neuro-diferenciação das SHEDs quando expostas ao meio DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e Neurobasal acrescidos de ácido retinóico após 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento. Os resultados mostraram que a partir do sétimo dia, a proliferação das SHEDs diminuiu e as células exibiram características fenotípicas neurais quando submetidas em ambos os protocolos de indução em relação ao grupo controle (não diferenciado). Porém, a diferenciação neural foi mais evidente no 14º e 21º dias de tratamento com marcação de nestina e β III-tubulina (Helfer *et al.*, 2012).

Embora muitos trabalhos tenham sido publicados mostrando a diferenciação neural bem sucedida, é importante analisar a funcionalidade das células, pois muitos desses trabalhos já foram criticados por utilizarem reagentes citotóxicos, gerando células com morfologia e expressão protéica semelhante aos dos neurônios, porém não funcionais (Lu *et al.*, 2004). Para confirmar a funcionalidade de CTMs neurodiferenciadas, testes de eletrofisiologia podem ser realizados para avaliação da expressão de canais dependentes de voltagem. Esses canais estão associados ao fenômeno de potencial de ação, característico das células com característica de excitabilidade elétrica (Kandel *et al.*, 200).

O primeiro trabalho a mostrar funcionalidade de neurônios diferenciados a partir de SHEDs *in vitro* foi publicado em 2008. Nesse trabalho, realizou-se a observação da morfologia celular, avaliou-se a expressão de marcadores proteicos, tais como nestina, β III-tubulina, neurofilamento médio e neurofilamento de cadeia pesada, bem como se analisou os dados de eletrofisiologia, com os quais foram observados a presença de canais de sódio dependente de voltagem (Arthur *et al.*, 2008).

Diferente do protocolo descrito por Arthur e colaboradores (2008), Király e colaboradores (2009) descreveram outro protocolo de diferenciação, no qual as SHEDs apresentaram morfologia neuronal. Após a indução da diferenciação, essas células passaram a expressar menos nestina e vimentina, as quais são proteínas de filamento intermediário expressas durante o desenvolvimento, mas com expressão menor em células maduras. No entanto, contrariamente, essas células apresentaram maior expressão de neurogenina-2, N-tubulina, enolase, os quais são marcadores específicos de neurônios maduros, bem como maior expressão de GFAP. Em relação à eletrofisiologia, foram encontradas células com canais de sódio e de potássio dependentes de voltagem (Király *et al.*, 2009).

Em 2011, o mesmo grupo avaliou as SHEDs induzidas à diferenciação *in vitro*, pelo mesmo protocolo publicado em 2009, quando injetadas no cérebro de ratos. Os autores observaram que essas células incorporavam-se ao tecido, sendo que a maioria das mesmas encontrava-se na zona progenitora neural e na zona subventricular. Observou-se, ainda, que uma menor proporção dessas células foram encontradas no córtex. As SHEDs passaram a expressar mais os marcadores neurais N-tubulina, NFM, NeuN e GFAP e apresentaram aumento significativo das correntes dependentes de voltagem para sódio e potássio quando injetadas no rato com lesão cortical, indicando maior estágio de maturação dessas células nesta região (Király *et al.*, 2011).

A capacidade das SHEDs em expressar marcadores neurais e diferenciar-se em células desta linhagem, mostrando funcionalidade semelhante a neurônios, é um dos fatos que as tornam candidatas apropriadas para uso terapêutico em doenças neurodegenerativas (Arthur *et al.*, 2008).

1.3. Matrizes de Nanofibras para a Engenharia de Tecidos

A bioengenharia, ou engenharia de tecidos (ET), é uma ciência interdisciplinar baseada na fusão dos princípios da engenharia, ciências dos materiais e das ciências da saúde, tendo como objetivo criar, reparar ou substituir tecidos e órgãos lesados. A ET utiliza a combinação de três ferramentas básicas: células, biomateriais e fatores de crescimento (FC). As células são responsáveis pela secreção de matriz extracelular para a formação do novo tecido, enquanto que o biomaterial tem a função de fornecer o suporte físico e um ambiente adequado para que as células cumpram eficazmente seu propósito. Já os fatores de crescimento podem ser adicionados ao conjunto a fim de, ao serem liberadas no local da lesão, funcionem como moléculas biologicamente ativas recrutando células progenitoras para os tecidos lesados (Ikada, 2006). A maioria dos estudos na área de ET utiliza estratégias envolvendo apenas células e biomateriais, ou mesmo somente biomateriais para guiar as células do hospedeiro. No entanto, o presente trabalho, inédito no Brasil, abordou a união das três estratégias visando produzir uma matriz que não somente auxiliasse a correta distribuição das células, mas também pudesse induzir a diferenciação das mesmas.

Diversos estudos apontam que a via de administração das células e a sua permanência no local da lesão são fatores limitantes para o reparo da lesão. Por isso, para que a regeneração neurológica possa ocorrer através da terapia celular é fundamental que um ambiente favorável seja implantado. Para isso, é importante a presença de um suporte para o crescimento das CTMs, para que, posteriormente, possa ocorrer o estabelecimento das conexões com os circuitos do hospedeiro. Uma estratégia para otimizar a regeneração tecidual é a criação de um microambiente que mimetize as condições normais do tecido humano e que permita a proliferação e diferenciação celular. Uma alternativa para viabilizar esta sistemática seria a utilização de matrizes tridimensionais. O biomaterial guia as células, o que poderia assegurar a sua correta distribuição, melhorando a sua capacidade proliferativa no local da lesão, evitando assim que as células migrem para outros locais, carreadas pela corrente circulatória,

quando comparada com as estratégias terapêuticas de apenas injetar as células-tronco no local da lesão. Com isso, esse suporte pode garantir que as células possam permanecer no local da lesão em tempo apropriado para promover a diferenciação celular e regeneração do tecido. Ainda, se o tecido lesado precisar ser regenerado em um formato específico, esse suporte ainda poder vir a servir como um molde para o novo tecido a ser formado (Teng *et al.*, 2002).

Um número amplo de materiais pode ser utilizado na medicina regenerativa para a confecção das matrizes, ou suportes. Entre esses, encontram-se os produzidos por diferentes tipos de polímeros sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis que são os preferencialmente utilizados para o uso humano. Isso se deve ao fato que a remoção fisiológica do substrato pelo organismo do hospedeiro evita que uma segunda cirurgia seja realizada nesse paciente para remoção do biomaterial implantado (Venugopal *et al.*, 2012). Na literatura, também se observa o uso de matrizes a base de materiais naturais tais como o colágeno, o alginato, a agarose, o hidrogel entre outros (Santos e Wada, 2007).

1.3.1. Técnica de *Electrospinning*

Diversas técnicas foram sugeridas para a produção de matrizes. Entre elas, destaca-se a técnica de *electrospinning* (ES) ou eletrofiação, que é um método altamente versátil que permite a formação de sistemas reticulares de fibras, principalmente feitas a partir de soluções poliméricas cujo diâmetro pode variar de micrometros a poucos nanometros. Esse método funciona pelo princípio eletrostático, no qual a solução polimérica é inserida no aparato por uma seringa que é submetida a uma diferença de voltagem elétrica. Nesse processo, a solução forma um jato de material fluido que é acelerado e estirado através de um campo elétrico produzindo fibras com diâmetro reduzido (Ziabari e Haghi, 2009) (Figura 1). A fotografia do aparato de ES e das matrizes utilizadas nesse trabalho encontram-se no anexo II.

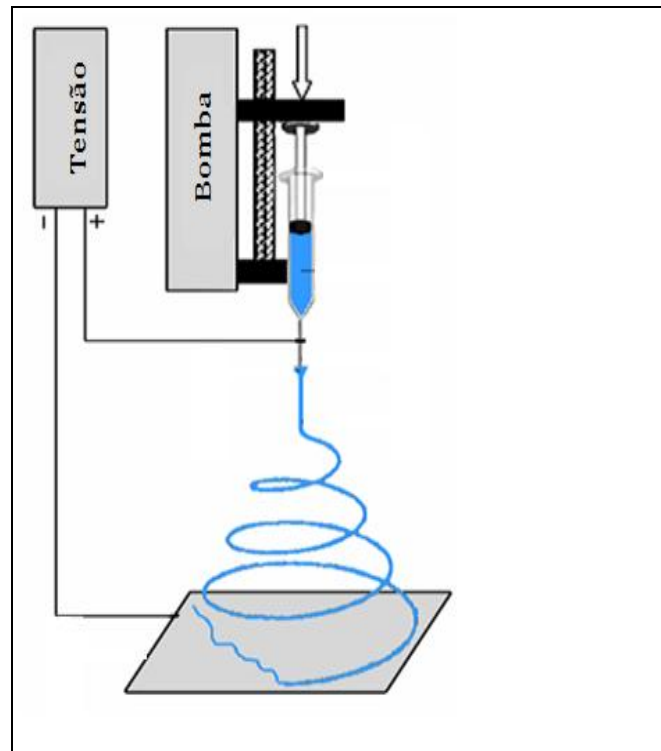


Figura 1: Representação esquemática do aparato de *electrospinning* (Fonte: Ziabari e Haghi, 2009).

Na bioengenharia, a técnica de ES destaca-se pela produção de matrizes, comumente chamados de *scaffolds*, que mimetizam estruturalmente e dimensionalmente as fibras de colágeno da matriz extracelular natural. Esses *scaffolds* são formados por nano ou microfibras, apresentam um elevado número de poros interconectados e oferecem uma extensa área superficial em relação ao seu volume, favorecendo a adesão e penetração das células através das matrizes (Lim e Mao, 2009). Outra vantagem da utilização das matrizes de nanofibras é a possibilidade de serem desenvolvidas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, não apresentando problemas referentes à rejeição em casos de implantes (Shin et al., 2012).

Além disso, através da técnica de ES, as fibras das matrizes produzidas podem ser arranjadas aleatoriamente ou de modo orientado. Em geral, o comportamento das células cultivadas sobre as matrizes pode ser influenciado pela orientação, formato e tamanho da superfície do material. A orientação das nanofibras nos *scaffolds*, por exemplo, se randomizada ou alinhada, modulam a adesão, formato, organização do citoesqueleto, diferenciação de vários tipos de células, como células endoteliais, tronco mesenquimais e tronco neurais (Lim et al., 2010; Meng et al., 2010; Yim et al., 2007). Quando esses diversos tipos de células são cultivadas em matrizes de nanofibras

randomizadas, as mesmas apresentam-se com morfologia poligonal e seus filamentos de actina mostram-se organizados aleatoriamente, formando uma estrutura tipo rede. No entanto, as células cultivadas sobre nanofibras alinhadas possuem formato fusiforme e seus filamentos de actina ficam arranjados em paralelo ao longo das fibras (Lim *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2010). As matrizes de nanofibras alinhadas são comumente utilizadas na ET neurais, pois fornecem suporte para a cultura de CTMs, estimulam a diferenciação neuronal e aumentam o alongamento do citoesqueleto e do núcleo da célula.

O melhor desempenho das células quando cultivadas em nanofibras alinhadas é um exemplo típico do controle morfológico e bioquímico do comportamento da célula através da adesão à matriz. As nanofibras alinhadas guiam as células para se alongarem ao longo do eixo da fibra principal. A forma da célula alongada possivelmente, então, estimula as vias bioquímicas específicas da transdução do sinal extracelular (Lim *et al.*, 2010).

Tendo em vista que o alongamento das células cultivadas nas matrizes pode ser calculado, Yim e colaboradores (2007) mostraram que o citoesqueleto e núcleo das CTMs eram cinco e quatro vezes mais alongados, respectivamente, quando cultivadas em matrizes orientadas do que nas randomizadas. Por outro lado, a proliferação das CTMs nas matrizes, quando avaliada pela marcação nuclear do 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), foi menor quando as fibras estavam em disposição orientada, comparada com as fibras com disposição randomizada, mostrando o possível comprometimento dessas células com a diferenciação. Ainda, com o intuito de confirmar essa hipótese, as células cultivadas nos dois tipos de matrizes foram diferenciadas na linhagem neurogênica, com meio acrescido de ácido retinóico (AR). As CTMs cultivadas nas matrizes com fibras alinhadas expressaram os marcadores neuronais MAP2 e β -III tubulina com ou sem a diferenciação induzida por AR. Porém, quando as CTMs foram cultivadas nas matrizes com fibras randomizadas, a marcação foi positiva somente com a indução da diferenciação com meio de cultura neurogênico. Dessa forma, através desse trabalho pode-se sugerir que a topografia da matriz por si só pode induzir ao aumento de marcadores neuronais (Yim *et al.*, 2007).

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade dessas matrizes no tecido nervoso periférico, Yu e colaboradores (2011) cultivaram gânglios da raiz dorsal (GRD) e células de Schwann em matrizes de nanofibras alinhadas e randomizadas. O crescimento dos neuritos dos GRD e a migração das células de Schwann prolongaram-

se unidirecionalmente, paralelo às fibras alinhadas. Além disso, os neuritos cresceram mais rapidamente nas matrizes com fibras orientadas ($2.537,6 \pm 987,3$ mm) do que nas matrizes com fibras randomizadas ($493,5 \pm 50,6$ mm). A distância de migração das células de Schwann cultivadas em moldes orientados foi significativamente maior comparada com os aleatórios ($2.803,5 \pm 943,6$ mm e $625,3 \pm 47,8$, respectivamente). Esses resultados sugerem que as matrizes com fibras alinhadas podem ser promissoras para a ET com o intuito de regenerar o nervo periférico (Yu *et al.*, 2011).

Um trabalho semelhante avaliou o comportamento dos neuritos dos GRD cultivados em matrizes de nanofibras alinhadas com diferentes diâmetros. Nos moldes com nanofibras de menor diâmetro (231 nm), o comprimento dos neuritos dos GRD foi 42% e 36% menor do que aqueles observados nas matrizes com diâmetro intermediário (759 nm) e grande (1.325 nm), respectivamente. Esses resultados novamente corroboram a ideia de que a topografia da matriz, incluindo o diâmetro das nanofibras, é um importante parâmetro ao ser considerado na construção de moldes para aplicações na ET neurais (Wang *et al.*, 2010).

1.4. Incorporação de fatores de crescimento em matrizes de nanofibras

A regeneração tecidual requer a transferência de uma grande quantidade de informações entre as diferentes populações celulares, tecidos e órgãos. Nesse contexto, os FC desempenham um papel importante, pois são responsáveis pela comunicação intercelular. Os FC ligam-se a receptores específicos na superfície das células e modulam a atividade celular, incluindo fenômenos tais como a adesão, a proliferação, a diferenciação e a migração celular. A concentração do fator, a sua identidade química e a duração da resposta desses fatores são o que irão determinar o destino da célula durante o processo de diferenciação (Tayalia e Mooney, 2009).

A via de administração dos FC é um fator crucial para o sucesso da medicina regenerativa. A administração endovenosa tem sido utilizada com frequência, porém, muitas vezes, os FC não alcançam o tecido-alvo, difundindo-se pela corrente circulatória, diminuindo seus efeitos tróficos. Assim, para promover sua regeneração, o tecido deve ficar exposto às proteínas endógenas por um período de tempo considerável que varia de dias até semanas (Tayalia e Mooney, 2009). Nesse sentido, as matrizes poliméricas tornam-se um bom veículo para a disponibilização adequada de diferentes FC, uma vez que propiciam um maior contato das células com o local a ser regenerado.

Além disso, as matrizes proporcionam uma liberação lenta e controlada do princípio ativo no local desejado, à medida que a matriz de nanofibras vai sendo degradada por hidrólise (Tayalia e Mooney, 2009).

Dessa forma, o ideal para a ET é a obtenção de uma matriz que não só mimetize a topografia e a constituição da MEC, mas que também tenha uma bioatividade aumentada (Lu *et al.*, 2009). Nesse contexto, implantar as matrizes no local da lesão, possibilitando a formação de uma rede em estrutura tridimensional que serve de apoio para as novas células, associado ao fornecimento de FC tem sido estudado por diversos autores (Bertram *et al.*, 2010; Chew *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2009; Shanbhag *et al.*, 2010).

Existem diversas estratégias para a incorporação de FC nas matrizes produzidas por ES. Dentre as diversas abordagens descritas na literatura, pode-se destacar a incorporação do FC através do ES de emulsões. Na literatura, o termo “emulsão de ES” é caracterizado pela mistura de uma suspensão de biomoléculas em uma solução polimérica, seja essa mistura feita por processos mecânicos ou ainda pela adição de um tensoativo. Nessa abordagem, as moléculas bioativas encontram-se dispersas por toda a fibra e não somente na superfície, permitindo assim perfis de liberação mais controlados do que a adsorção física. Outro modo de incorporar FC é através de ES coaxial, na qual duas soluções (solução polimérica e solução contendo o FC) são simultaneamente submetidas ao processo de ES, através de duas seringas acopladas e que trabalham com velocidades distintas (Lu *et al.*, 2009). Nessa técnica, a solução contendo o FC passa por dentro da solução polimérica, que forma a camada externa da nanofibra. Esse método garante que o agente incorporado fique no interior das fibras formando o que é chamado de matrizes do tipo “casca-núcleo”. Embora tenha um grande potencial para a incorporação de agentes bioativos essa técnica apresenta a desvantagem de ser um procedimento bastante complexo e de difícil execução (Tayalia e Mooney, 2009).

A fim de auxiliar e manter a diferenciação neuronal das CTMs por um período prolongado, muitos estudos têm associado o uso de FC incorporado às matrizes, com o uso de citocinas e fatores de crescimento também no meio de cultura. No contexto de neurogênese, o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento neural (NGF), assim como o AR e o β -mercaptoetanol têm sido amplamente utilizados para este fim, visto que essas substâncias mostraram-se promissoras para o processo de diferenciação. Assim, surgiu a hipótese de que ao incorporar FC às matrizes, os mesmos seriam promissoras para o uso

na ET, devido ao fato de auxiliarem na indução e manutenção da diferenciação neurogênica (Cho *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012; Khang *et al.*, 2012).

Recentemente, Jiang e colaboradores (2012) avaliaram o efeito combinado das CTMs cultivadas em *scaffolds* com fibras orientadas e tratadas com meio de cultura contendo AR, com matrizes com fibras orientadas quando o AR é incorporado às mesmas. O AR foi misturado na solução polimérica e, posteriormente, as matrizes foram produzidas por ES. Primeiramente, foram realizados testes para demonstrar a liberação do AR das matrizes. Após uma liberação inicial de 31,2% no primeiro dia, o AR presente nos *scaffolds* foi liberado de maneira constante (2,1% por dia) durante 14 dias. Um total de 60% do AR incorporado foi liberado até o 14º dia. Posteriormente, através da técnica de imunofluorescência, foi possível observar que a presença do AR nas matrizes com fibras alinhadas aumentou a marcação de MAP2 e β -III tubulina em relação às CTMs do grupo controle (cultivadas diretamente nos poços). Ainda, o marcador de imunofluorescência RIP (*regular phenobarbital-inducible P450*) foi utilizado para identificar oligodendrócitos imaturos e maduros que promovem ou não a mielinização. A marcação de para RIP foi maior nas matrizes com fibras alinhadas quando o AR foi incorporado às mesmas, quando comparada com o grupo controle e com as CTMs cultivadas nos *scaffolds* também com fibras orientadas, porém quando o AR foi adicionado ao meio de cultura, mas não incorporado ao biomaterial. As matrizes com fibras alinhadas contendo AR expressaram sinaptofisina, o que indica a possibilidade de formação de sinapses entre as células cultivadas sobre esses moldes. Os resultados de expressão gênica mostraram um aumento de MAP2 e galactocerebrosideo nas matrizes com fibras alinhadas quando o AR foi incorporado, em relação às CTMs controle e quando cultivadas nos *scaffolds* com fibras orientados e tratadas com AR no meio de cultura (Jiang *et al.*, 2012).

Portanto, em conjunto, esses resultados mostram um aumento do potencial de diferenciação das CTMs com a utilização de matrizes com fibras alinhadas com o AR incorporado, destacando a importância do uso desse tipo de biomaterial (Jiang *et al.*, 2012).

1.5. Fator de crescimento epidermal

O fator de crescimento epidermal (EGF) é sintetizado na glândula submaxilar, no intestino delgado, no pâncreas, no rim, na glândula pituitária e no cérebro. Essa

proteína atua ligando-se com elevada afinidade ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*), na superfície da célula, estimulando a atividade da proteína tirosina-cinase. A superfamília do EGFR, composta por distintos receptores, é expressa em neurônios do hipocampo, do cerebelo, do córtex e de outras regiões do sistema nervoso central (Wong e Guillaud, 2004).

Após esse fator e receptor serem descoberto, o foco dos trabalhos envolvendo suas utilizações foram relacionados com o desenvolvimento de terapias contra o câncer baseados na inibição do EGFR. Mais recentemente, diversos trabalhos demonstraram que o EGF também está envolvido na neurogênese. Estudos mostraram que camundongos transgênicos deficientes de EGFR desenvolveram defeitos epiteliais, doenças neurodegenerativas e morreram no primeiro mês de nascimento. Alterações na regulação do EGF e seu receptor também podem estar envolvidos com o processo de envelhecimento (Wong e Guillaud, 2004).

O EGF estimula o crescimento, a proliferação e a diferenciação de numerosos tipos de células, incluindo neurônios e células da glia, bem como a migração neural (Buonanno e Fischbach, 2001).

Estudos *in vitro* mostraram que pequenas concentrações de EGF (pg/mL) aumentaram a sobrevivência dos neurônios e estimularam o crescimento de seus neuritos. Além disso, o EGF também aumenta a captação de dopamina e protege contra a morte induzida por toxicidade pelo glutamato, em culturas de neurônios dopaminérgicos (Yamada *et al.*, 1997). O EGF aumenta a expressão do receptor de N-metil-d-aspartado (NMDA) que medeia o aumento da concentração intracelular de íons cálcio, em culturas de neurônios de hipocampo de ratos. (Abe e Saito, 1992).

Evidências indicam que o EGF é um regulador chave da produção de oligodendrócitos (Aguirre *et al.*, 2007; Aguirre e Gallo, 2007). Estudo publicado por Gonzalez-Perez e colaboradores (2009) mostrou que a infusão intracerebral de EGF aumentou o número total dos astrócitos que expressam BrdU e aumentou entre 300 a 400% o número de oligodendrócitos responsáveis pela formação da bainha de mielina.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o EGF mantém a viabilidade e a proliferação das células localizadas na zona subventricular (SVZ, do inglês *subventricular zone*) do encéfalo (Benoit *et al.*, 2001). Além disso, a administração de EGF no encéfalo de camundongos resultou na expansão das células localizadas na SVZ e na proximidade do corpo estriado, o que indica que estas células têm capacidade migratória (Craig *et al.*, 1996).

Fatores de crescimento, tal como o EGF, podem estimular a divisão celular e regular o destino das células progenitoras durante o desenvolvimento, fornecendo sinais extracelulares importantes para a regulação da proliferação e da determinação do destino das células-tronco e progenitoras no SNC. Estudo sugere que o EGF pode induzir os precursores do SNC a produzir tanto neurônios como astrócitos *in vitro* (Kuhn *et al.*, 1996).

Dessa forma, evidências mostram que quando as CTMs são cultivadas em meio contendo EGF, as mesmas são capazes de se diferenciarem em células tipo-neurônios e expressarem marcadores neurais (Bae *et al.*, 2011, Govindasamy *et al.*, 2010; Morsczech *et al.*, 2010). Em trabalho publicado por Arthur e colaboradores (2008), as CTMs diferenciadas com meio enriquecido com EGF adquiriram o fenótipo semelhante a neurônios maduros e aumentaram a expressão dos anticorpos β -III tubulina e neurofilamentos, quando comparadas as células não diferenciadas. Ainda, evidenciou-se nessas mesmas células diferenciadas a presença de canais de sódio funcionais, consistentes com os relatados para neurônios.

Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que tenha utilizado o EGF incorporado em matrizes com a finalidade de avaliar o seu efeito no comportamento celular destinado a aplicação na ET neurais. Quanto ao uso do EGF associado ao uso de CT cultivadas em *scaffolds* produzidos pela técnica de ES para a ET neural, Jin (2011) e Prabhakaran (2009) e seus colaboradores usaram o EGF no meio de cultivo, mas não incorporado nas matrizes (Jin *et al.*, 2011; Prabhakaran *et al.*, 2009). Já Gümüşderelioğlu (2011) e Tıǧlı (2010) e seus colaboradores ligaram quimicamente o EGF às matrizes, mas com foco na ET para regeneração de pele. Dessa forma, nenhum desses trabalhos envolvendo matrizes contendo EGF avaliou a diferenciação das células em precursores neurais ou seu uso em doenças neurológicas (Gümüşderelioğlu *et al.*, 2011; Tıǧlı *et al.*, 2010).

Há estudos em que fatores de crescimento neurais, tais como o NGF, o BDNF e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) foram incorporados em matrizes com fibras alinhadas e mostraram resultados promissores. Quando as matrizes com o BDNF foram enxertadas em modelo de lesão medular, observou-se redução na resposta inflamatória, aumento da densidade de fibras nervosas e melhora na locomoção dos animais (Han *et al.*, 2009). Já quando matrizes contendo GDNF foram enxertadas em modelo de lesão do nervo periférico, houve um aumento no número de axônios, bem

como da densidade de fibras nervosas e os animais tiveram uma melhor recuperação funcional e regeneração do nervo (Chew *et al.*, 2007).

Desse modo, tendo em vista que o EGF é um dos fatores predominantemente responsáveis pela diferenciação neurogênica das CTMs, o mesmo foi selecionado para ser utilizado com matrizes para a engenharia de tecido neural. A hipótese é que esse fator, quando incorporado às nanofibras, possa estimular a proliferação e diferenciação das SHEDs, promovendo a formação de redes neurais e contribuindo para a aplicação futura na regeneração tecidual e em modelos animais de lesão raquimedular e do nervo periférico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a diferenciação neural das CTMs cultivadas sobre suportes de matrizes de nanofibras orientadas, com o EGF incorporado.

2.1. Objetivos Específicos

- a) Produzir matrizes de nanofibras orientadas pela técnica de *electrospinning* a partir de polímeros de PLGA com e sem o EGF incorporado;
- b) Caracterizar as propriedades físico-químicas das matrizes de nanofibras com e sem o EGF incorporado;
- c) Avaliar a cinética de liberação do EGF a partir das matrizes de nanofibras;
- d) Caracterizar as propriedades biológicas das CTMs quando cultivadas em matrizes de nanofibras com e sem o EGF incorporado;
- e) Diferenciar as CTMs na linhagem neural, quando cultivadas em matrizes de nanofibras alinhadas, com e sem o EGF incorporado.
- f) Avaliar a funcionalidade das CTMs diferenciadas em linhagem neural cultivadas em matrizes de nanofibras com e sem o EGF incorporado.

O anexo III mostra o esquema da metodologia utilizada no presente trabalho.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

This paper will be submitted to the Experimental Cell Research journal.

The differentiation of human mesenchymal stem cells cultivated on aligned nanoiber scaffolds into functional neurons under neuronal inductive medium

Thayane Crestani^{1,2}; Kerlin Quintiliano^{1,2}; Virginia Etges Helfer¹; Davi Silveira dos Santos¹; Eduardo A. Balbuena¹, Estela Mitie Cruvinel³, Antonio Carlos Cassola³, Geraldo Jotz^{2,4}; Diogo André Pilger¹; Patricia Pranke^{1,4,6}

¹ The Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy,² Post-graduate Program in Neuroscience; ³ The Biosciences Institute, The Federal University of São Paulo (USP); ⁴ Post-graduate Program in Physiology, The Federal University of Rio Grande do Sul; ⁵ The Department of Morphological Sciences; The Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS); ⁶ The Stem Cell Research Institute (SCRI). Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Pranke P

E-mail: patriciapranke@ufrgs.br

Pharmacy Faculty

Hematology and Stem Cell Laboratory

Ipiranga Av, 2752, 304

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

Phone: +55 51 3308-5275 / 3308-5257

Abstract

One strategy for neural regeneration is by using scaffolds containing growth factors associated with mesenchymal stem cells (MSCs). The aim of this work has been to produce aligned nanofiber matrices (AC) with incorporated epidermal growth factor (AE) to evaluate its influence on MSC differentiation. Aligned nanofiber scaffolds were produced by electrospinning and MSCs, from human exfoliated deciduous teeth, were cultivated on these scaffolds and evaluated using different biological tests. The AC and AE scaffolds presented similar degradation time. The morphology and diameter of their nanofibers were also similar. 90.14% of EGF was released for the AE scaffold. MSCs cultured on scaffolds AC and AE were more aligned and elongated. MSCs adhered more on AE matrices than AC scaffolds. Both scaffolds were atoxic to MSCs. In regard to neural differentiation, the expression of nestin and neurofilaments was higher in all the scaffolds groups than control. The expression of β III tubulin and GFAP was higher in all the differentiated groups than the control. Most of the MSCs grown in matrices AC and AE, differentiated or not, expressed voltage-dependent sodium currents showing similar maximum conductance value similar. Thus, these matrices are a possible strategy for optimizing the regeneration of neurological lesions.

Keywords: epidermal growth factor, tissue engineering, scaffolds, mesenchymal stem cells, repair of neurological injuries

INTRODUCTION

Damage to the central nervous system (CNS) result in loss of axonal connections and consequently, in loss of motor functions, usually irreversible, as well in loss of sensory and autonomic functions [1]. Although there is still no effective therapy for the repair of lesions in the CNS, transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) is a promising strategy. This is due to the fact that these cells possess the capacity for self-renewal and pluripotency, being able to differentiate into various cell types, including neural cells [2-4]. These transplanted cells create a favorable environment for axonal regeneration and differentiation into neurons and glial cells, allowing the formation of new circuits [1,5].

Mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) offer several advantages over other sources of MSCs. These cells do not require an invasive procedure to be obtained, as is in the case for the collection of bone marrow cells [6]. Furthermore, SHEDs normally express neural markers and differentiate into this cell lineage showing similar functionality to neurons [7-8].

Several studies indicate the route of administration of the cells and their permanence at the injury site, as limiting factors for injury repair. One strategy to optimize tissue regeneration is the creation of a micro-environment that mimics the normal human tissue and allows cell proliferation and differentiation. An alternative would be the use of three dimensional matrices or scaffolds, which could ensure the correct distribution of MSCs, improving their proliferative capacity at the lesion site, thus preventing the cells from migrating to other locations, transported by the bloodstream [9].

Several techniques have been suggested for producing scaffolds. One such technique is electrospinning (ES). This technique stands out for its ability to produce scaffolds that structurally and dimensionally mimic collagen fibers of the natural extracellular matrix (ECM). These scaffolds favor the adhesion and penetration of cells through the nanofibers, and when made from biocompatible and biodegradable polymers, they do not present problems regarding rejection in cases of transplantation [10]. Furthermore, through ES, matrices can be produced with aligned fibers as is commonly used in neural tissue engineering (TE) since they stimulate neuronal differentiation and increase the elongation of the cytoskeleton and the cell nucleus [11].

Growth factors (GF) play an important role in tissue regeneration, as they are responsible for interacting with organs and tissues [12]. Their route of administration is a crucial factor for their use in regenerative medicine. Intravenous administration has been used frequently, but often GF do not reach the target tissue, spreading through the bloodstream and decreasing their trophic effects [12]. In this sense, scaffolds become a good vehicle for the adequate availability of GF, since they provide greater contact of the cells with the site to be regenerated. In addition, scaffolds provide a slow and controlled release of the GF in the desired location, while the nanofibers are being degraded by hydrolysis [12].

Epidermal growth factor (EGF) stimulates the growth, proliferation and differentiation of numerous cell types, including neurons and glial cells, as well as neural migration [13]. When the SHEDs are cultured in a medium containing this GF, they are able to differentiate into neuronal-like cells, expressing neural markers such as β -III tubulin and neurofilament, and present functional sodium channels consistent with those reported for neurons [7-8].

There are at present no studies in scientific literature that have used EGF incorporated into scaffolds in order to evaluate its effect on cell behavior, designed for application in neural TE. However, considering that this GF is one of the factors mainly responsible for neurogenic differentiation of MSCs, it has been selected to be incorporated in the scaffolds. The hypothesis of this study is that EGF incorporated into scaffolds of aligned nanofibers can stimulate neural differentiation of SHEDs, contributing to the future application in animal models of spinal cord and peripheral nerve injury.

MATERIAL AND METHODS

Scaffolds produced by electrospinning

Two groups of scaffolds were produced: scaffolds with aligned nanofibers without EGF incorporated (Aligned Control - AC) and scaffolds with aligned nanofibers with EGF incorporated (Aligned with EGF – AE). AE scaffolds were developed through an organic phase consisting of PLGA 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, with the addition of 1 μ g/mL of EGF. The BSA protein was used in scaffolds containing EGF in order to stabilize the GF when in

contact with the organic solvent. AC scaffolds were produced in the same way as described for the scaffolds of the first group, except for the presence of EGF.

These polymer solutions were placed between electrodes, with the application of 22kV at the positive electrode and 2kV at the negative electrode, using 2 needles of 0.80 mm inner diameter and flow rate of 0.002 mL.h⁻¹. The two needles were only used to optimize the production process facilitating faster production speed. For alignment of the fibers, the scaffolds were collected on a rotating basis of aluminum with 20 cm diameter and with a speed of 2,500 rpm (tangential velocity of 26.18 m/s) which were positioned 15 cm from the needles. The scaffolds were produced with controlled temperature of 20 °C (± 2 ° C) and relative humidity of 30% (± 5 %).

The scaffolds produced had a thickness of approximately 30 μ m and were fixed on round glass coverslips of 15 mm diameter using PLGA polymer solution dissolved in HFIP 11% (m/m). Subsequently, they were placed in culture plates of 24 wells and sterilized with ultraviolet light for 1 hour in a vertical laminar flow hood.

Isolation of mesenchymal stem cells and cell culture

The mesenchymal stem cells were isolated from human exfoliated deciduous teeth pulp of five donors (n = 5). The samples of deciduous teeth were obtained in partnership with the Post-Graduation Program of Odontopediatrics from the Federal University of Rio Grande do Sul. All procedures were performed after agreement of the person responsible for the patient by signing a consent form approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, registered in project number 19273.

Immediately after extraction, the teeth were immersed in 1 mL of MSC culture medium consisting of DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/Hepes (Sigma-Aldrich), 10% bovine fetal serum (Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 0.45 μ g/mL gentamicin. In a biological safety cabinet, the pulp tissue was removed from the teeth and cut into various fragments, which were transferred to a solution of collagenase type I 0.2% (Invitrogen) and then incubated for 60 minutes at 37°C in a water bath. Cells were then centrifuged at 800 g for 10 minutes, re-suspended in 1 mL of DMEM/Hepes culture medium and plated in 12 well culture plates as described by Bernardi and colleagues (2011) [14]. The medium was replaced after 24 hours in order to isolate adherent cells and was then refreshed once every 3 days to allow further growth. The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%

CO₂ until they reached 90% confluence, when they were detached with trypsin–EDTA 0.5% solution (Sigma-Aldrich) and re-seeded at a density of 5,000 cells/cm². The cells were cultivated until 5th passage when they were then used in the experiments proposed.

The cells isolated from primary teeth used in this study were characterized as mesenchymal stem cells by the following properties: (1) ability to adhere to plastic and demonstrate characteristic morphology, (2) immunophenotypic profile and (3) plasticity. These analyzes were carried out using three different primary cultures.

Physicochemical properties of the scaffolds and EGF release assay

For the following tests, three samples were analyzed for each group of scaffold (AC and AE) produced on different days (n = 3).

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 10 kV and a magnification range of 1,000-20,000 x after metallization of the samples with a thin layer of gold. The images were taken with a magnification of 3,500 x.

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. Three scaffolds produced on different days for the two groups of scaffolds were evaluated. Three different fields for each scaffold were selected to obtain the images.

Degradability

Approximately 30 mg of scaffolds from each group were submerged in 10 mL of PBS buffer, 120 rpm at 37 °C. The degradability was evaluated at different times: 0 (scaffolds not subjected to degradability), 7, 14 and 28 days after incubation. 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 selected time, the samples were kept in an incubator during 24h to allow for excess water evaporation. A quantity of 10 mg of each sample was dissolved in 4 mL of

tetrahydrofuran (THF). Analyses were performed on three different samples for each incubation period and the results presented by calculating the average from the data obtained.

EGF release

To assess EGF release over time, approximately 180 mg of AE scaffolds were immersed in 10 mL PBS containing 2% of penicillin/streptomycin and 3% of fungizone. The same assay was performed with AC scaffolds used as negative control to discard the potential presence of false-positive reactions. The scaffolds were kept under stirring at 120 rpm, 37 °C. EGF concentration was detected by ELISA (Human EGF ELISA Kit, Invitrogen®) in the following ranges: 2h, 8h, 24h, 3 days, 7 days, 14 days and 21 days. In each of the times described above, the total volume of PBS was removed and frozen. The PBS was then renewed and after 21 days the dosage of EGF was performed for each time period. Absorbance measure (450 nm) was performed at Wallac EnVision (Perkin Elmer) for both matrices. The absorbance of AC was discounted for concentration calculations of EGF. The results were expressed as percentages of cumulative release.

Biological analysis of MSCs cultivated on scaffolds

For all the tests described below different cultures of MSCs were used. Tests for every primary culture were performed in triplicate and the groups analyzed were: cells cultured directly on plate wells (control), cells grown in AC and AE scaffolds.

Cell morphology on scaffolds with phalloidin marker

MSCs were seeded at a density of 30,000 cells for each scaffold (AC and AE) and also directly to the culture plate wells (control). After 21 days, the MSCs on the scaffolds and on the wells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and were subsequently blocked with Triton X-100 0.1% for 10 minutes. Staining was then performed using 50 mg/mL rhodamine conjugated phalloidin for 40 minutes in order to identify cytoskeleton actin filaments. Samples were then washed with 1x PBS and stained with 0.5 mg/mL DAPI for 1 minute. Photomicrographs of representative images from different samples were acquired using an inverted microscope (Nikon Eclipse) fitted with a Nikon DS-U3 camera with 40 x magnification. (Note: this test was

evaluated in only one primary culture of MSCs, which was an observational and not a statistical test).

Adhesion assay

Cell adhesion was performed through DAPI staining (4',6-diamidino-2-phenylindole), a nuclear cell marker. The MSCs were seeded at a density of 30,000 cells for each scaffold (AC and AE) and also directly on to the culture plate wells (control) (n=4). Cells were maintained in an incubator at 37 ° C and 5% CO₂. After 6 hours, the cells on the scaffolds and on the wells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 5µg/mL of DAPI in PBS for 1 minute. Washes with PBS 1x were then performed to remove excess dye. Analyses were performed using an inverted microscope, and images were acquired from nine random points of scaffolds. After counting the number of cells in the images, the cells average per scaffold group was evaluated and the result expressed as the mean average of cells per 400 x image magnification for each group.

Metabolically active cells

The number of metabolically active cells was assessed by the colorimetric assay of method salt tretazolium (MTT) (Sigma-Aldrich ®) after seeding a total of 45,000 cells per well or each scaffold (n=3) in a period of time of 6h, 24h, 48h and 72h. Each specific point the cells were then incubated with 0.25µg/mL of MTT for 2h. MTT solution was removed and 400 µL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added per well to dissolve the crystals formed. Absorbance was measured at 560 nm and 630 nm. The results were calculated by the label subtraction (560 nm - 630 nm) and expressed as average absorbance for each group. The absorbance measure was performed in the equipment Wallac EnVision (Perkin Elmer).

Cell proliferation

Cell proliferation was assessed on 4th and 7th days after cell seeding (30,000 cells per scaffold/well) by immunofluorescence with the antibody Ki67, a marker for the protein which appears in all phases of cell cycle (n=3). After 4 and 7 days, the cells on the scaffolds/wells were fixed with 4% paraformaldehyde and were blocked for 30 min with blocking buffer containing PBS with 1% bovine serum albumin (Sigma) and 0.25% Triton X-100. They were then incubated with PBS and primary antibody Ki67

(1:1,000) overnight. The secondary antibodies used were Alexa-488 for 1 hour and the nuclei were stained with DAPI for 1 minute. Analyses were performed using an inverted microscope and five random fields of each scaffold/well were used to evaluate cell proliferation at 400 x magnification. To calculate the percentage of proliferating cells, the average total cell number and Ki67 positive cells were used. The average number of Ki67 positive cells over the total number of cells represents the proliferation rate for each group.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity was assessed by measurement of enzyme lactate dehydrogenase (LDH) (Labtest). After seeding 45,000 cells per matrices/wells (n=4), the test was performed in the following time periods: 4, 7, 14 and 21 days. Two control groups were also evaluated: negative control, when cells adhered directly to wells, and positive control, when cells adhered directly to wells on the day of treatment with Triton X-100 (Sigma-Aldrich ®) at concentration of 1% (v / v). Triton X-100 causes cell death permitting the maximal LDH release. Absorbance measure was performed in the equipment Wallac EnVision (Perkin Elmer).

Neural differentiation

MSC population used for differentiation experiments was phenotypically homogeneous (n=3).

Based on the protocol described by Arthur and colleagues (2008), the cells were treated for three weeks in order to differentiate into neural cells. Before cell seeding, scaffolds and wells which were induced to reach neural differentiation were coated with Geltrex® diluted in DMEM-F12 medium (Sigma-Aldrich) overnight. After this period, the scaffolds and wells were washed with PBS. Scaffolds and wells for the control group (not induced to neural differentiation) were treated only with PBS. A total of 45,000 and 10,000 cells were cultivated per scaffold and directly on each well plate respectively. Cells were cultured in DMEM 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin for three days and the medium was then introduced for neural differentiation. During the first week of induction, the cells were treated with Neurobasal A medium (Invitrogen) supplemented with Glutamax (Invitrogen), 1x B27 (Invitrogen), 20ng/mL EGF (Promega), 40ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma) and 1% penicillin/streptomycin. In the second week, cells were treated with DMEM-F12

supplemented with insulin-transferrin-sodium-selenite (ITS) (Sigma-Aldrich), 40ng/mL FGF and 1% penicillin/streptomycin. In the third week of differentiation the same medium of the second week was used plus 0.5 μ M of all-trans retinoic acid. The group not induced to neural differentiation was treated with DMEM 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin for the same period. After 3 weeks, the neural differentiation was assessed by morphology, immunofluorescence and electrophysiology.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature, then washed with PBS for 10 minutes (n = 3). The culture was blocked for 30 min with blocking buffer containing PBS with 1% bovine serum albumin (Sigma) and 0.25% Triton X-100. Cells were then incubated with primary antibody IBB and anti-nestin (1:400), anti- β -III tubulin (1:400), anti-NF-M (1:150) and anti-GFAP (1:400) overnight. The secondary antibodies used were Alexa-488 for 1 hour and nuclei were stained with DAPI for 1 minute. Analyses were performed using an inverted microscope and the images were obtained from five random fields of each scaffold/well at 400 x magnification. After counting the number of cells in the images, the average of cells per scaffold/well was evaluated and the result expressed as percentage of cell positive for the marker measured in relation to the total number of cells.

Electrophysiology

The expression of voltage-gated Na⁺ channels was evaluated by measuring currents at fixed voltage by whole cell patch clamp technique. The cells were detached from the plates and scaffolds by trypsin, and aliquots were transferred to a chamber adapted to an inverted microscope (n = 2). The compartment with the cells was perfused with solution containing: 134 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 5 mM D-Glucose. The microelectrodes had resistances of about 2 M Ω when filled with the solutions used in the experiments. The amplifier used was an Axopatch 200B (Axon Instruments). For voltage control, data acquisition and data analysis, the pClamp suite (Axon Instruments) was used running in a personal computer.

The pipette solution contained: 10 mM NaCl, 115 mM CsF, 10 mM TEACl, 9 mM EGTA, 3.5 mM CaCl₂ (free Ca²⁺ concentration of 100 nM), 10 mM HEPES. With this solution, currents for K⁺ channels were inhibited. Other currents through non-

voltage-gated channels were subtracted "on line" by P/N protocol. In all experiments, 90% access resistance was compensated for. Voltage-dependent Na⁺ currents were identified by activation and inactivation kinetics and by I-V relations of the current peak values. An Additional test was performed replacing N-methyl-D-glucamine (NMDG) for Na⁺ in a bath solution.

For comparing cells of different sizes, the currents were divided by membrane capacitance, estimated by capacitive transient or reading of capacitance cancellation control in the patch clamp amplifier. It is known that there is a linear relationship between capacitance and membrane area.

The I-V relation, normalized by cell capacitance, was fitted by Ohm-Boltzman equation below:

$$I = (V_m - V_r) \frac{g_{max}}{1 + \exp\left(\frac{V_h - V_m}{k}\right)}$$

The parameters in the equation were determined as follows: g_{max} (maximum conductance), V_r (reversal potential), $V_{1/2}$ (potential at which the probability of channel opening is 1/2) and k (steepness of the sigmoid relation open to the probability of the channel to membrane potential).

The maximum conductance depends on the density of Na⁺ channels in the cell membrane. Therefore it allows the comparison of this protein expression in different phenotypes.

Statistical analysis

The results for cell viability assay, cell proliferation and electrophysiology were represented as mean and standard error. The other results were represented as mean and standard deviation. The degradability, metabolically active cells, cytotoxicity assay and cell proliferation were assessed by repeated measures analysis of two factors: time and group (Hotelling) and Bonferroni post hoc test.

Analysis of nanofibers diameter and adhesion were evaluated by ANOVA (One Way) and Tukey post hoc test. Immunofluorescence test and electrophysiology were analyzed by ANOVA (Two way) as well as Bonferroni post hoc test. For decision criteria a significance level of 5% was used. The results were generated by SPSS 16.

RESULTS

Physicochemical properties of the scaffolds and EGF release assay

Morphology and fiber diameter

Both scaffolds AC and AE presented well-formed fibers, highly aligned, without beads and with interconnected pores, which was as a result of the optimized electrospinning parameters used during this study. The electrospinning conditions were optimized with regard to the concentration of the polymer, the solvent used, the voltage applied, the flow rate and the distance between the collector and the needle tip to obtain continuous stretch of uniform fibers (without beads or droplets).

The results of fiber diameter were 537 ± 73 nm for AC scaffolds (Fig. 1A) and 581 ± 79 nm for AE scaffolds (Fig. 1B) ($p > 0.05$).

Degradability

The degradability was measured in different periods simulating the physiological characteristics of the human body (37 C in 1x PBS, pH 7.4). The degradation rate after 28 days of analysis was 44.7% for AC group and 41.3% for AE group. There was no statistical difference between the groups in relation to degradation rate or molecular weight in any of the evaluation periods ($p > 0.05$).

Analyzing the graph in Fig. 2, it is observed that the degradation process is gradual, and before the 7th day the molecular chain breaking starts with a decrease in molecular weight in both matrices. Moreover, there is a statistical difference among the different periods of degradation. The molecular weight for AC and AE scaffolds after 28 days of analysis was smaller than in 0 day and 7 days ($p < 0.01$ for both times). This shows that both scaffolds were losing their molecular weight, i.e, they were in a process of degradation.

Release kinetics of EGF

The cumulative EGF release profile from AE scaffold is shown in Fig. 3. After an initial burst of 60.27 % within 24 hours, EGF was released at a fairly constant rate of 5.97% per day for at least 28 days. Based on the total EGF presented into the scaffold, there was an average of 90.14% release over a period of 28 days.

Biological evaluations

MSC morphology on scaffolds

MSCs cultured on AC and AE scaffolds are presented evenly distributed along the scaffolds, with prominent extension of the actin filaments and the morphology changed compared to the control (Fig. 4). Following 21 days of cultivation, the cell bodies and nuclei of MSCs cultured on AC and AE scaffolds were elongated and aligned along the matrices axis. Moreover, MSCs on these scaffolds had actin filaments (red), mostly stretched and had produced more protrusions aligned along the same (Figs. 4B, C). In contrast, MSCs cultured on the control showed neither elongation nor orientation, and high cell densities. No morphological change was observed on the control as well. Cells showed a polygonal structure with small actin filaments arranged in all directions, characterizing their mesenchymal appearance (Fig. 4A).

Cellular adhesion assay

The adhesion assay showed that the cells adhere significantly more on the control group than on AC scaffold ($p < 0.05$). Cells adhere more on AE than on AC scaffolds ($p < 0.05$) and the adhesion of AE scaffolds was similar to the control group (Fig. 5).

Cellular viability assay

In relation to MTT assay, in three points of measurement (6, 24 and 48 hours) there was no statistical difference between the groups ($p > 0.05$) (Fig. 6). In relation to 72 hours, the metabolically active cells were significantly higher in the control group in comparison to AC and AE scaffolds ($p < 0.05$ for both). Moreover, in 72 hours, the cellular viability in the control group was statistically different from 6 and 24 hours ($p < 0.05$). However, this difference was not observed on AC and AE scaffolds.

Proliferation rate

The number of Ki67 positive cells per number of DAPI positive cells in percentage is presented in Fig. 7. The proliferation rate in 4 and 7 days of analysis was similar for all groups (control, AC and AE) with no statistical difference ($P > 0.05$), despite the fact that the percentage of Ki67 positive cells on AE scaffolds was lower in 7 days compared to 4 days ($P > 0.05$).

Cytotoxicity assay

The concentrations of LDH produced in different matrices are presented in Fig. 8. In all days of analyzes (4, 7, 14 and 21 days), dosages of LDH for both matrices were similar to the negative control (control) ($p > 0.05$). Further, AC e AE matrices showed LDH dosages much lower than positive control (Triton group), which represents the maximum release of LDH, i.e., the total death. Additionally, Triton group was the only one that showed a significant increase ($p < 0.001$) of values dosage enzyme LDH over all periods of analysis.

Neural differentiation

MSC morphology by phase contrast microscopy

When MSCs were cultured on plate wells treated with induction medium, the morphology observed by phase contrast microscopy changed compared to untreated cellular culture (undifferentiated control cells) (Fig. 9). Following 21 days of induction most of the differentiated control cells retracted their cytoplasm, forming spherical cell bodies, emitted cellular protrusions and decreased their proliferation rate, compared to the undifferentiated control cells. Differentiated control cells gradually lost their mesenchymal appearance (like fibroblast) and acquired a neuron-like morphology, expressing both bipolar (Fig. 9B; arrows) and stellate forms (Fig. 9C; arrow) similar to that of sensory and motor neurons respectively. In contrast, undifferentiated control cells increased proliferation, maintained their mesenchymal appearance and did not show any morphology reminiscent of neurons (Fig. 9A).

Immunofluorescence

The protein expression patterns of astrocytes (GFAP), early (Nestin), intermediate (β III-tubulin) and late (NFM) neuronal-associated markers expressed by MSCs cultured in well/scaffolds in the neural inductive conditions were determined by immunocytochemical analysis. Representative images of MSCs stained with these markers were presented in Fig. 12. The data demonstrated that nestin, β III-tubulin, NFM and GFAP expression was detected on all analyzed samples.

The number of MSCs positively stained for the respective neural-specific is presented in Fig. 13. The expression of the nestin and NFM markers of all analyzed groups was significantly higher than the control ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

The expression of β III-tubulin and GFAP was similar in all differentiated groups and significantly higher than the control group ($p < 0.05$).

Electrophysiology

To confirm that CTMs were differentiating into functionally active neurons on well plates and both group of scaffolds, Na^+ currents through voltage-gated channels (Nav) were evaluated using patch clamp technique. The number of cells expressing Na^+ currents is shown in table 1. Most cells grown on AC and AE matrices induced or non-induced to neural differentiation, expressed Nav. All MSCs cultured on the AC scaffolds not induced to differentiation and on the AE scaffolds induced to differentiation, expressed Nav. In relation to cells grown on wells, only one cell expressed Nav when not induced to differentiation. However, when these cells were treated with neural differentiation medium, 75% of them expressed Nav.

All cells that expressed Nav were analyzed separately and the maximum electrical conductance per μf (conductance per cell capacitance) conferred to surface membrane by voltage-gated sodium channels is shown in figure 13. The MSCs from all analyzed groups, except the control not induced to differentiation, showed very similar values of maximum conductance. Nondifferentiated MSCs cultured in the AE matrices showed a non statistically significant reduction in the average value of the maximum conductance (894.08 ± 240.37 pS/pf) compared to the other groups; however it was higher than the control group (56.56 pS/pf).

DISCUSSION

This is the first study to evaluate cell differentiation of MSCs into neural precursors in aligned nanofiber scaffolds with incorporated EGF. It is also the first work which evaluates the expression of voltage-dependent Na^+ channels using MSCs differentiated into neural lineages and cultivated onto scaffolds. The results of this study demonstrated that the scaffolds produced by aligned nanofibers, induce neural differentiation of MSCs, giving rise to functional neurons, when cultivated on these devices, even in the presence or absence of incorporated EGF.

With a focus on neural regeneration, AC and AE scaffolds were developed to mimic the architecture of ECM and support the growth and differentiation of MSCs. It was observed through SEM analysis that nanofiber from both types of scaffolds

produced had similar morphology and diameters. Even though there is no consensus in the literature about the ideal diameter of the nanofibers to neural TE, intermediate diameter nanofiber matrices (300-759 nm), tend to increase the length of cell neurites when compared with other nanofibers diameters, as shown by some studies [15,16]. Therefore, this data shows that aligned nanofiber matrices with intermediate diameters, around 500 nm, produced and used in this study, appear to be suitable for cell culture, possessing great applicability in neural TE. This hypothesis is strengthened when it is noted that the better results were obtained from nanofibers with diameters between 300 e 800 nm, compared to nanofibers with smaller diameters (less than 300 nm) or to microfibers (with more than 1 μm). Therefore the best results were obtained with fibers with the same size as the natural ECM.

Furthermore, nanofibers presented interconnected pores, as observed by SEM in Fig. 1, permitting the exchange of nutrients, metabolites and regulatory factors with the external environment, essential for cell survival [17]. The porous structure of the scaffolds is also desired since it helps in the catalysis of protein incorporated into the matrices, as in the case of EGF, which was the focus of the present study. The porous structures also facilitates the diffusion of such substances due to the large surface area [18].

Degradability is an important attribute to be evaluated according to the location where regeneration is intended. In other words, the rate of degradation of the biomaterial should be similar to the rate of tissue regeneration [19]. The results of this study showed that degradation of the matrices AC and AE was relatively rapid, occurring in 28 days (44.7% and 41.3%, respectively). Nevertheless, it should be considered that *in vivo*, the degradation rate should probably be even greater, since other plasma components can accelerate this process.

The release profile of EGF showed a high initial release in the first three days, but relatively constant and slower through the end of the assessed period (28 days), in which most of the incorporated EGF was released. This initial release is probably related to the protein which did not diffuse through the nanofiber remaining on its surface. However, after the initial burst, the release occurs more slowly and gradually, by diffusion of the GF and/or the polymer degradation [20]. Furthermore, there needs to be a balance between the rate of scaffold degradation and the kinetics release of GF for this device to be ideal. It must also be capable of releasing much of the GF dosage initially contained in the scaffold (initial burst), followed by a linear model wherein the

incorporated GF is released in a more controlled way. Accordingly, if the matrices had a slow degradation, the EGF would not be released in time to promote tissue regeneration and neural differentiation.

In regard to the cellular assays, it was observed that MSCs cultured on the AC and AE matrices were more aligned and elongated along the axis of the matrix when compared to the control. This finding suggests that the nanofibers could provide an architecture that best physically mimics the ECM as compared to the wells of culture, especially when the focus of the study is neural differentiation. Moreover, in the present work, the presence of EGF in the scaffolds of nanofibers did not modify cell morphology compared with scaffolds without such incorporated GF.

An essential feature for the successful application of biomaterials in TE is that these are capable of promoting cell adhesion, and this is a crucial stage for subsequent cell proliferation and differentiation [21]. An important finding was the fact that cells adhered significantly more when they were grown in AE scaffolds compared to AC scaffolds. As all the physiochemical parameters analyzed, such as fiber diameter and the rate of degradation are similar, this difference can probably be attributed to the presence of FC, since these factors play an important role in cell behavior. Furthermore, Fig. 1 shows that the compact alignment of the nanofibers, in both groups of matrices, leaves little space between the fibers and reduces the amount and size of interconnected pores. This could contribute to reducing the adhesion of MSCs in AC scaffolds compared with the control group. However, this condition appears to be reversed when EGF was added to the matrices.

The cellular metabolism of MSCs cultured in wells (control) and AC and AE scaffolds showed no statistical difference when rated for 6, 24 and 48 hours, but was higher in the control group after 72 hours. However, eventually these results were compromised by interference in the measure of absorbance due to the degradation process of the matrices which had already been initiated during this period. Therefore, it is suggested that the use of other alternative tests, such as WST and indirect measures of cell viability, as cell proliferation tests, may be more appropriate for this evaluation in scaffolds produced.

Due to the observed results with MTT, immunohistochemistry technique was chosen to evaluate cell proliferation. MSCs cultured directly on culture plates and AC and AE scaffolds have similar proliferation rate in both periods analyzed. However, there was a tendency to reduction in the percentage of Ki67-positive MSCs cultured on

AE scaffolds from the 4th to the 7th day. It is speculated that EGF facilitates the differentiation of MSCs and in this process, cells cease proliferation, begin to change in their morphology, characterizing the onset of differentiation, and subsequently undergo changes in expression of genes and proteins [7]. Therefore, a hypothesis about the tendency in reducing the proliferation of MSCs cultivated on AE scaffolds is the possibility that the quantity of EGF released from the matrix is starting the process of neural differentiation, detriment to the process of proliferation. However, the quantity of EGF released does not seem sufficient to produce a significant reduction in cell proliferation rate, since it was not enough for a statistical difference to be observed. Nevertheless, it is worth mentioning that during tissue regeneration using MSCs there is paracrine action of the same with the release of GF, including EGF [22]. Therefore, the amount of EGF incorporated into the matrix plus the release of EGF's own MSCs could be sufficient to achieve a physiological result. Moreover, if the analysis was performed for longer, or even in its use *in vivo*, where polymer degradation is faster, the amount of EGF would be higher resulting in a more pronounced effect.

Although EGF is widely used in many studies involving the cultivation of different cell types, there was a need to assess whether the process for incorporated scaffolds with the EGF could be prejudicial to the MSCs. The results indicated that in all periods analyzed, dosages of LDH were similar for the control, AC and AE matrices, but significantly lower than the 1% Triton group, the positive control, which is the maximum release of LDH, or in other words, total death. EGF, in pharmacological doses, has cytoprotective effects which can be extremely useful for prevention or therapy of diseases. However, evidence suggests that at high concentrations, this GF can participate in promoting cell malignancy [23]. Therefore it can be said that both scaffolds have produced no cytotoxic potential for MSCs.

In relation to neural differentiation, the results of this present study showed that MSCs cultured in the matrices were receptive to neural differentiation using medium differentiation over a period of 3 weeks. These cells had retracted their cytoplasmic processes, forming spherical cells morphologically similar to neurons, and decreased their rate of proliferation, as seen in Fig. 9. On the other hand, MSCs of control group had highest number of cells and maintained their mesenchymal appearance, showing no morphology similar to neurons. The reduction in cell proliferation was not a result of cell death as shown by another group [7]. As this study used similar differentiation protocol as the later authors, it can be inferred that reduction in cell proliferation

induced to neuronal differentiation was not due to cell death. Although it is not possible to observe the morphology of MSCs cultured on matrices by phase contrast microscopy due to the compact biomaterial, it is believed that these cells had morphology similar to neurons, as found in the differentiated MSCs cultured directly on the plates. Immunofluorescence analyzes were performed in order to identify neural markers and also for visualization of the morphology of these cells cultured on scaffolds.

SHEDs differentiated or not differentiated by neural medium, expressed the marker of immature, intermediate and mature neurons and astrocytes, respectively, nestin, β III-tubulin, GFAP and NFM. These results confirm the findings of Miura and colleagues (2003) in which this type of MSCs constitutively express certain proteins present in neurogenesis, probably due to its origin from the neural crest [6,7].

Whereas nestin and NFM protein expression detected was low for the control group, the expression of these markers were increased at three weeks after the induction of differentiation. Moreover, MSCs cultured in AC and AE scaffolds also showed increased nestin and NFM expression even when these cells were not differentiated. These data showed that undifferentiated SHEDs cultured on AC and AE matrices were able to differentiate into neural precursors and mature neurons similarly as with the group treated with differentiation medium. This result may be related to the change of MSC morphology when cultured on AC and AE matrices. These cells showed increased cytoskeletal rearrangement and extensions with extensive elongation of the nucleus along the axis of the matrice, as seen in Fig 4B and C. This change in cellular morphology may play an important role in the establishment of signal transduction for differentiation. The cells produce mechanical tension in their actin cytoskeleton and exert tensile forces which can alter the shape of the cell, inducing them to differentiate. However, the exact mechanism by which the change of cellular forms influences gene expression and cell differentiation is not well understood [24]. Therefore, the topography of the scaffolds, in the case the alignment of the nanofibers, may cause the induction of a significant increase of nestin and NFM, suggesting differentiation of MSCs to neuronal precursors and mature neurons.

The expression of β III-tubulin and GFAP increased significantly in differentiated control group and in differentiated AC and AE matrices compared with the control group undifferentiated. These results are similar to findings by others authors in which similar MSCs increase β III-tubulin and GFAP expression after the process of neural differentiation [6,7]. Furthermore, these results also corroborate with Jiang and

colleagues (2012), showing that the differentiated MSCs grown on aligned nanofiber arrays increase their marking β -tubulin III in relation to the control group [25]. The data from the present study showed that when SHEDS were differentiated in the AC and AE matrices, they were able to differentiate into immature neurons and astrocytes similarly to SHEDS differentiated directly on the culture plate.

However, there was a trend increase in expression of β III-tubulin and GFAP for MSCs cultured in AC and AE scaffolds not differentiated compared to the control group. It is speculated that the topography of scaffolds is able to induce differentiation of MSCs in various lineages, such as neural lineages [25,26]. One hypothesis about that tendency is the possibility that the topography of the matrix is beginning the process of neural differentiation. However, the topography matrix and the quantity of EGF released is probably not sufficient to produce an increased expression of GFAP and β III-tubulin, since it was not enough for a statistical difference to be observed.

In the present study, the voltage-gated Na^+ channels were analyzed to confirm if the MSCs, differentiated or not differentiated, and cultured in scaffolds, differentiated into functional neurons. In most analyzed cells, in all groups except the control, it was possible to verify the presence of inward Na^+ current confirmed by blocking the current in the presence of N-methyl-D-glucamine. The presence of outward currents of the cells was also observed, but no test was carried out to confirm the nature of these ionic currents. However their traces were consistent with those found in voltage-dependent K^+ currents.

There are no studies in literature that have evaluated the expression of voltage-gated Na^+ channels in MSCs differentiated into neural lineage and cultured on scaffolds. The studies evaluating the expression of these channels in other cell types, such as neural stem cell cultured on scaffolds are also rare. The results of this study showed that most of MSCs differentiated on AC and AE scaffolds expressed Nav. Moreover, undifferentiated MSCs cultured on AC and AE scaffolds with aligned nanofibers also expressed more Nav when compared with the control group. However, most of the MSCs cultured in AC and AE matrices, differentiated or not differentiated, were able to express Nav showing higher maximum conductance values compared to the control group. This data suggests that the matrix topography alone can induce differentiation of MSCs into functionally active neurons even when these cells were not treated with neural differentiation medium. Although the average maximum conductance of group AC undifferentiated was lower than those of other groups, except the control, this

difference was not statistically significant. It is important to note that one in three analyzed undifferentiated cells cultured on AE matrices expressed Nav with similar size to the other scaffold and differentiated control groups. Moreover, these values would possibly resemble the other groups studied, if the number of analyzed cells was increased. However, the presence of voltage-gated Na⁺ channels, inclusive of their size and the properties of Nav in all groups, except the control, were consistent with those reported by neuronal cells [27]. A single cell in the control group expressed Nav and this did not show characteristic dimension of neural cells. This data confirms that the MSC control group did not differentiate in neural lineage, maintaining its characteristics of mesenchymal cells. Finally, there is a direct correlation with increased neuronal markers (Nestin, β III-tubulin and NFM) with the presence and the value of the conductance maximum Nav, confirming differentiation of MSCs on AC and AE scaffolds into functionally active neurons. The findings of this present study demonstrate the importance of the alignment of the nanofibers for neuronal differentiation, showing their advantage for use in neural TE.

CONCLUSION

The results suggest that the use of nanotechnology as a tool associated with MSCs is one strategy that can be used in nerve regeneration therapy. The scaffolds produced in this work by electrospinning technique are able to stimulate neural differentiation of MSCs into functional neurons, both in the absence and in the presence of incorporated EGF. AE scaffolds improved the cell adhesion of MSCs compared to the scaffolds without EGF, being used preferably for the neural TE. Therefore, the scaffolds produced in this study may contribute to future application in tissue regeneration and animal models of spinal cord injury and peripheral nerve.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by 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

- [1] S. Thuret, L.D. Moon, F.H. Gage, Therapeutic interventions after spinal cord injury, *Nat Rev Neurosci.* 7 (2006) 628-643.
- [2] P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. , A.J. Katz, P. H.P. Lorenz, M.H. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.* 7 (2001) 211-228.
- [3] F.P. Barry, J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *Int J Biochem Cell Biol.* 36 (2004) 568-584.
- [4] N. Chevallier, F. Anagnostou, S. Zilber, G. Bodivit, S. Maurin, A. Barrault, P. Bierling, P. Hernigou, P. Layrolle, H. Rouard, Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate, *Biomaterials* 43 (2009) 1-9.
- [5] O. Lindvall, Z. Kokaia, Recovery and rehabilitation in stroke: Stem cells, *Stroke* 35 (2004) 2691–2694.
- [6] M. Miura, S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L.W. Fisher, P.G. Robey, S. Shi, SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 5807-5812.
- [7] A. Arthur, G. Rychkov, S. Shi, S.A. Koblar, S. Gronthos, Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues, *Stem Cells* 26 (2008) 1787–1795.
- [8] M. Király, B. Porcsalmy, A. Pataki, K. Kádár, M. Jelítai, B. Molnár, P. Hermann, I. Gera, W.D. Grimm, B. Ganss, A. Zsembery, G. Varga, Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons, *Neurochem Int.* 55 (2009) 323-332.
- [9] Y.D. Teng, E.B. Lavik, X. Qu, K.I. Park, J. Ourednik, D. Zurakowski, Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seed with neural stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 3025-3029.

- [10] S.H. Lim, H.Q. Mao, Electrospun scaffolds for stem cell engineering, *Adv Drug Deliv Rev.* 61 (2009) 1084-1096.
- [11] S.H. Shin, O. Purevdorj, O. Castano, J.A. Planell, H.W. Kim, A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration, *J Tissue Eng.* 3 (2012) 1-11.
- [12] P. Tayalia, D.J. Mooney, Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv Mater.* 21 (2009) 3269-3285.
- [13] A. Buonanno, G.D. Fischbach, Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 (2001) 287-296.
- [14] L. Bernardi, S.B. Luisi, R. Fernandes, T.P. Dalberto, L. Valentim, J.A. Bogo Chies, A.C. Medeiros Fossati, P. Pranke, The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption, *J Endod.* 37 (2011) 973-979.
- [15] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 2603-2610.
- [16] H.B Wang, M.E. Mullins, J.M. Cregg, C.W. McCarthy, R.J. Gilbert, Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2970-2978.
- [17] R.C. Dutta, A.K. Dutta, Comprehension of ECM-cell dynamics: a prerequisite for tissue regeneration, *Biotechnol Adv.* 28 (2010) 764-769.
- [18] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol Adv.* 28 (2010) 325-347.

- [19] M. Navarro, C. Aparicio, M. Charles-Harris, M.P. Ginebra, E. Engel, J.A. Planell, Development of a biodegradable composite scaffold for bone tissue engineering: physico-chemical, topographical, mechanical, degradation and biological properties, *Adv Polym Science* 200 (2006) 209-231.
- [20] W. Ji, Y. Sun, F. Yang, J.J. van den Beucken, M. Fan, Z. Chen, J.A Jansen, Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications, *Pharm Res.* 28 (2011) 1259-1272.
- [21] N. Zhang, D.H. Kohn, Using Polymeric Materials to Control Stem Cell Behavior for Tissue Regeneration, *Birth Defects Res C Embryo Today.* 96 (2012) 63-81.
- [22] M.P. Prabhakaran, J.R. Venugopal, S. Ramakrishna, Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering, *Biomaterials* 30 (2009) 4996-5003.
- [23] C.R. Plata-Salamán, Epidermal Growth Factor and the Nervous System, *Peptides* 12 (1991) 653-663.
- [24] A. Maniotis, C.S. Chen, D.E. Ingber, Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 849-854.
- [25] X. Jiang, H.Q. Cao, L.Y. Shi, S.Y. Ng, L.W. Stanton, S.Y. Chew, Nanofiber topography and sustained biochemical signaling enhance human mesenchymal stem cell neural commitment, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1290–1302.
- [26] M. Rodrigues, L.G. Griffith, A. Wells, Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells, *Stem Cell Res Ther.* 26 (2010) 1-32.
- [27] E.R. Kandel, T.M. Schwartz, T.M. Jessell, *Principles of Neural Sciences.* 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

Subtitles of figures

Figure 1: Scaffold morphology evaluated by SEM photographs: A) AC nanofiber scaffolds; B) AE nanofiber scaffolds. Magnification of 3,500x.

Figure 2: Molecular weight loss measured in different periods: 0 (not subjected to the degradation process), 7, 14, 30 and 60 days

Figure 3: *In vitro* EGF release from AE matrices. Data are presented as media of cumulative percentage release of EGF (n = 3).

Figure 4: MSC morphology by confocal microscopy: A) Cells cultivated directly on plate wells; B) Cells cultivated on AC scaffolds; C) Cells cultivated on AE scaffolds. Red: rhodamine-conjugated phalloidin, a cytoskeletal marker; Blue: nuclear staining with DAPI. Magnification of 400x.

Figure 5: MSC adhesion assay after 6 hours of seeding on plate wells and scaffolds. Data are presented as media \pm standard deviation of number of adherent cells per 400x (n = 6). * $p < 0.05$, denotes a significant difference between the control and AC scaffold, and between AE and AC scaffolds (ANOVA one way, post hoc Tukey).

Figure 6: Cellular viability assay after 6, 24, 48 and 72 hours of seeding MSCs on plate wells (control) and on AC and AE scaffolds. Data are presented as media \pm standard error of absorbance (n = 3). * $p < 0.05$, denotes a significant difference between CT and AE and AC scaffolds (Repeated measures analysis, post-hoc Bonferroni).

Figure 7: Cell proliferation after 4 and 7 days of seeding MSCs on plate wells and AC and AE scaffolds. Data are presented as media \pm standard error of proliferation rate in percentage (number of Ki67 positive cells per number of DAPI positive cells per 400x magnification) (n = 3). ($p > 0.05$; Repeated measures, post-hoc Bonferroni).

Figure 8: Cytotoxicity assay after 4, 7, 14 and 21 days of seeding MSCs on plate wells, AC and AE scaffolds. Data are presented as media \pm standard deviation of absorbance

of LDH dosage (n = 4). * $p < 0.001$, denotes a significant difference between Triton and all other groups. (Repeated measures analysis, post-hoc Bonferroni).

Figure 9: MSC morphology seeding on plate wells by phase contrast microscopy after 21 days: A) MSCs cultivated with the control medium; B and C) MSCs exposed to neuronal inductive medium. Magnification of 200x (A and B) and 400x (C).

Figure 10: Representative images of MSCs stained with nestin, β -III tubulin, NF-M, and GFAP. Magnification of 400x.

Figure 11: The number of MSCs cultured in nondifferentiation (N DIF) and differentiation (DIF) medium positively stained for the respective neural-specific antibodies. Data are presented as media \pm standard deviation of percentage of field positive cells per 400x magnification (n = 3). * $p < 0.05$ denotes a significant difference between the control and the other groups, ** $p < 0.01$ denotes a significant difference between the control and the other groups (ANOVA two way, post hoc Bonferroni)

Table 1: The number of cells cultured in nondifferentiation (N DIF) and differentiation (DIF) medium that showed voltage-dependent sodium currents (Nav) using whole cell patch clamp technique.

Figure 12: Electrophysiology test of MSCs cultured in nondifferentiation (N DIF) and differentiation (DIF) medium (n= 2). Data is presented as media \pm standard error of maximum conductance of cells that showed Nav. # the standard error was not shown because the number of cells that expressed Nav was very small. (ANOVA two way, post hoc Bonferroni).

Figure 1:

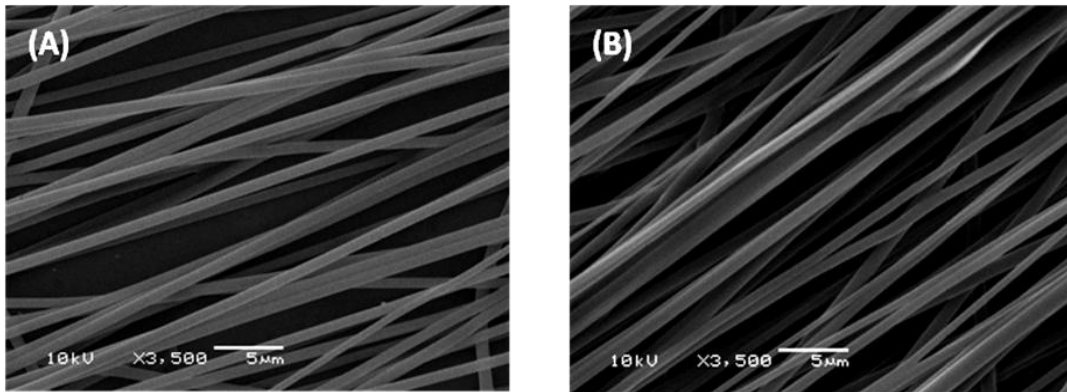


Figure 2:

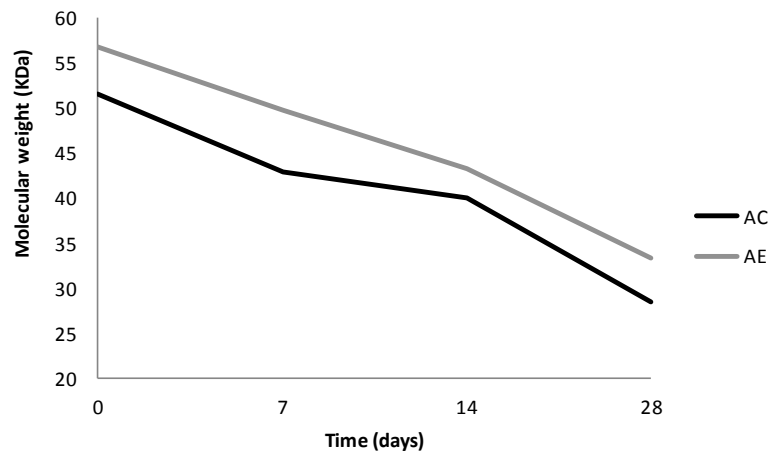


Figure 3:

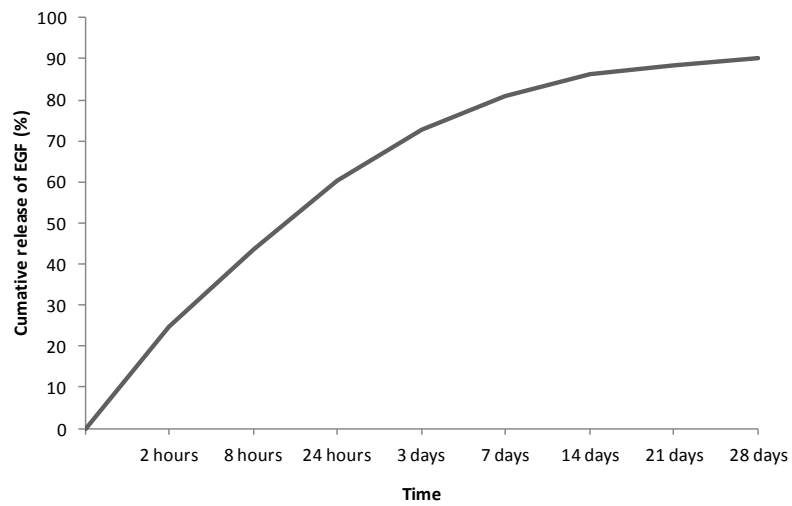


Figure 4:

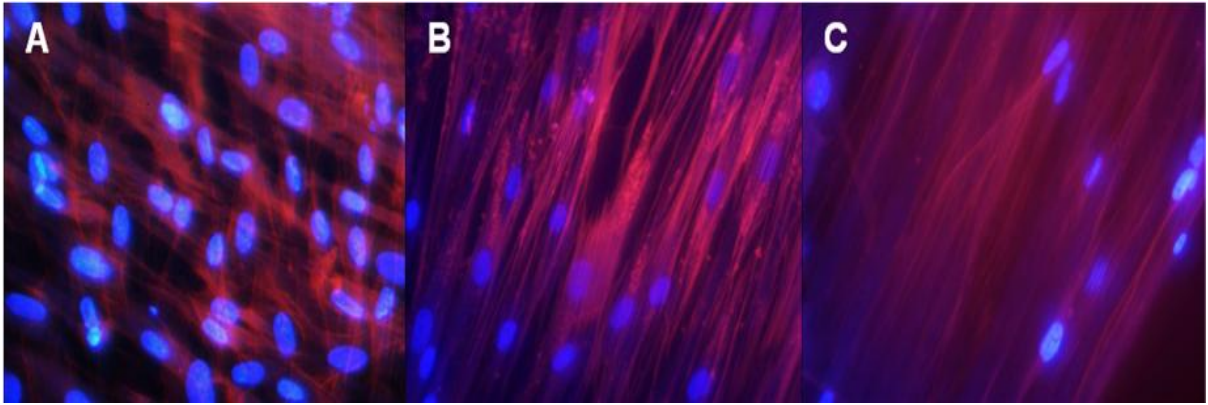


Figure 5:

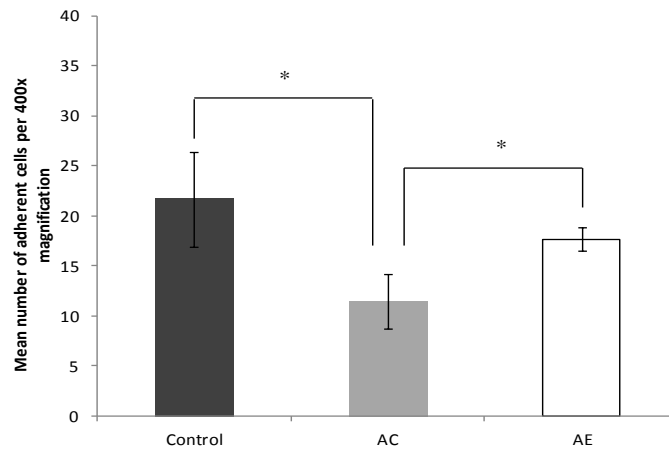


Figure 6:

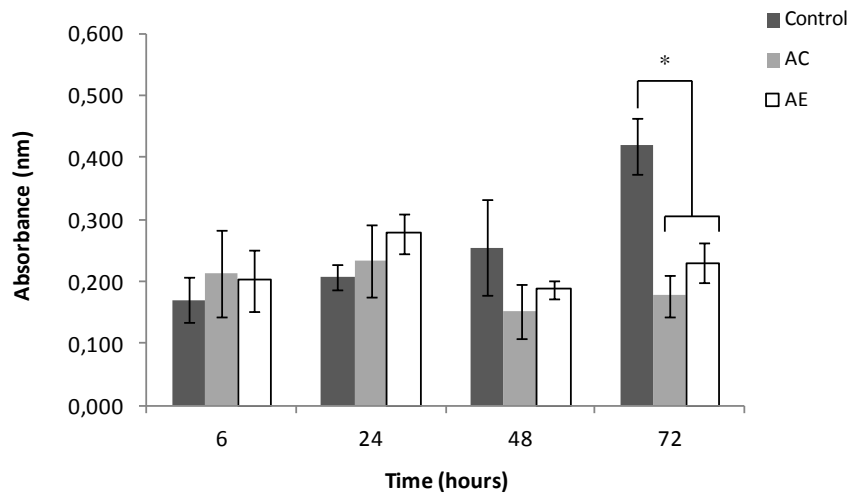


Figure 7:

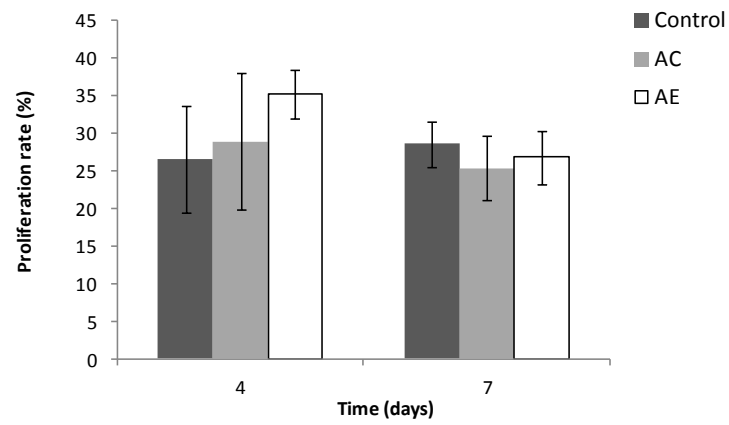


Figure 8:

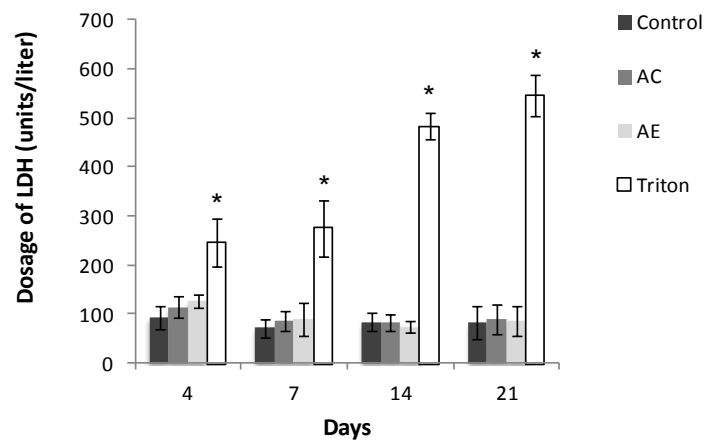


Figure 9:

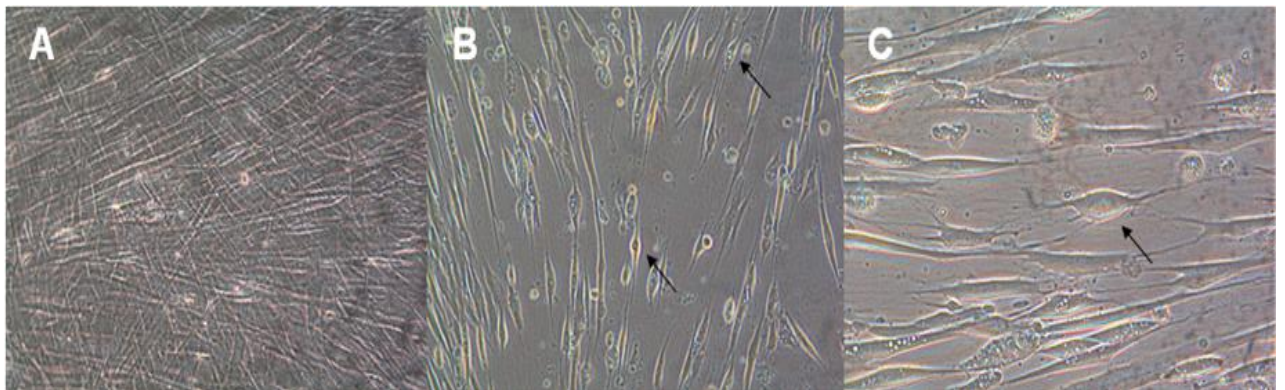


Figure 10:

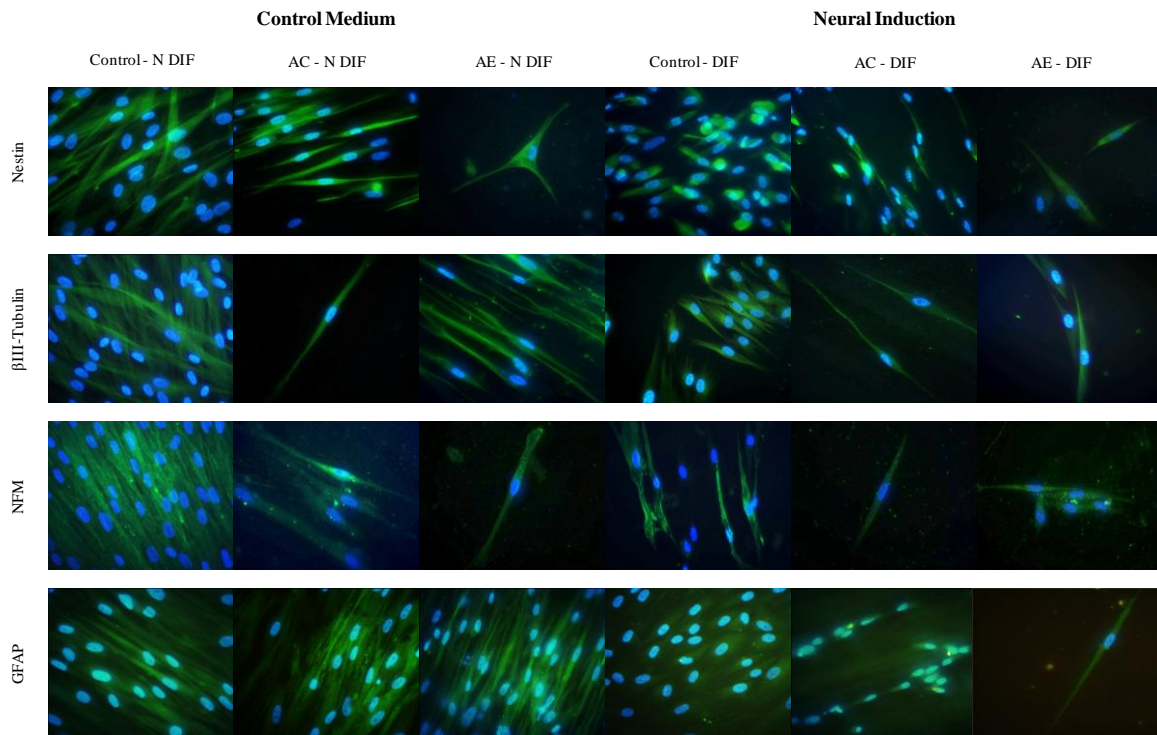


Figure 12:

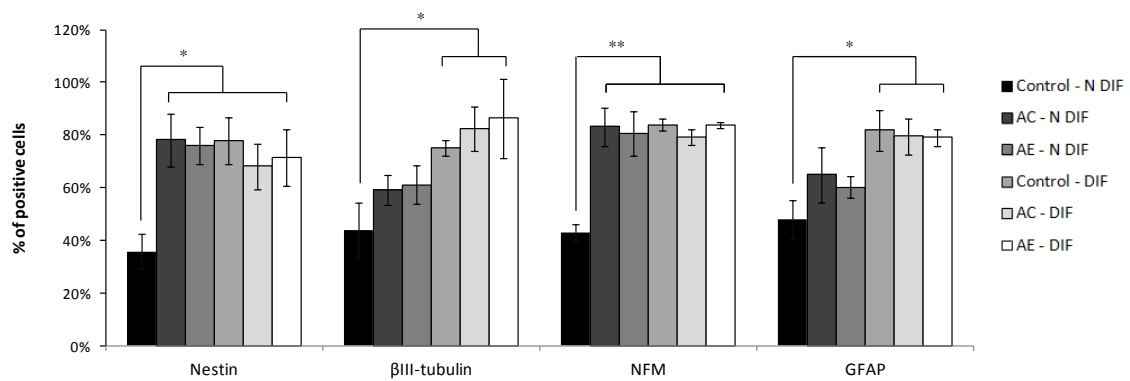
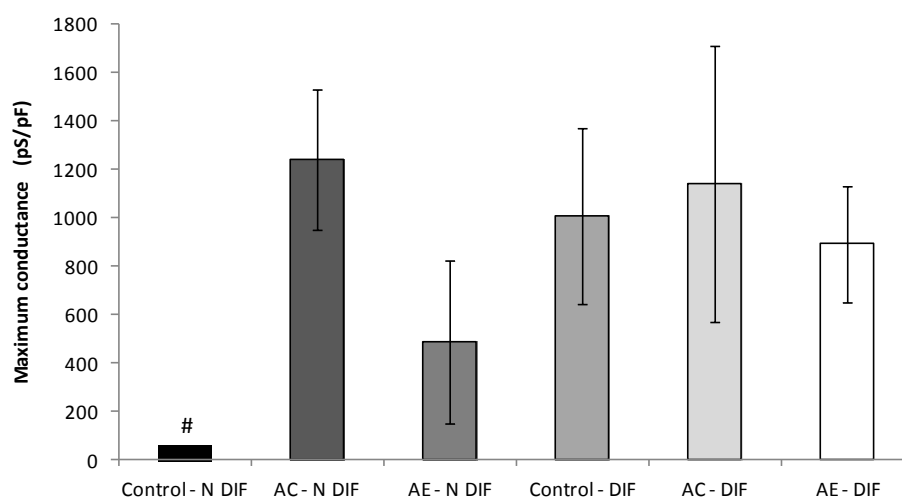


Table 1:

	Presence of Nav	Ausence of Nav
Control - N DIF	1 (12.5%)	7
AC - N DIF	7 (100%)	0
AE - N DIF	4 (57.14%)	3
Control - DIF	5 (71.43%)	2
AC - DIF	7 (87.5%)	1
AE - DIF	5 (100%)	0

Figure 13:



4. DISCUSSÃO

A utilização dos biomateriais ou *scaffolds* é uma ferramenta promissora para apoiar a proliferação das CTMs e proporcionar um maior contato das células no tecido a ser regenerado. Os *scaffolds* também são capazes de evitar a migração das células para outros locais, transportadas pela corrente sanguínea, quando aplicados sistemicamente no corpo humano. Além disso, é possível incorporar fatores de crescimento nas matrizes, como o EGF, que irão auxiliar na indução e manutenção da neurodiferenciação podendo ser uma alternativa interessante para a ET neural.

Com o foco na regeneração neural, matrizes AC e AE foram desenvolvidas para mimetizar a arquitetura da MEC. O sucesso de um biomaterial tridimensional depende de muitos parâmetros os quais variam desde uma escala macro até nanométrica. Por isso, para uma melhor adequação do biomaterial desenvolvido ao tecido que se pretende regenerar, diversos parâmetros físico-químicos foram ser avaliados, como a morfologia, o diâmetro das nanofibras e o tempo de degradação do material. Além disso, a interação desses sistemas com as células também foram considerado, através da avaliação de diferentes propriedades biológicas, tais como a adesão e proliferação celular, bem como a citotoxicidade.

As matrizes AC e AE foram obtidas através da otimização dos diversos parâmetros citados e foram analisadas por MEV. Observou-se que os dois tipos de *scaffolds* apresentaram morfologia semelhante com fibras bem formadas, altamente alinhadas, sem *beads* ou gotas e com poros interconectados. Em relação à medida dos diâmetros das fibras, observou-se que as fibras dos dois grupos de matrizes formadas apresentaram resultados semelhantes em torno de 500 nm, sendo ideais para a ET. Esse resultado assemelha-se ao tamanho das fibras de colágeno da MEC, cujos diâmetros variam de 50 a 600 nm (Ye e Mahato, 2008; Zhang e Kohn, 2012) mimetizando fisicamente, desta forma, um ambiente adequado para a adaptação celular.

A técnica de incorporação do EGF, desenvolvida no presente trabalho, baseou-se principalmente nos estudos de Liao (2008) e Chew (2005) e seus colaboradores. Esses dois trabalhos incorporam diferentes substâncias pela técnica de ES de emulsão. Chew e colaboradores (2005) incorporam NGF em matrizes de nanofibras e utilizam BSA para estabilizar o FC (Chew *et al.*, 2005). Já Liao e colaboradores (2008) produziram *scaffolds* incorporados com rodamina através de ES de emulsão com PLGA e span-80. Os *scaffolds* produzidos por esses autores apresentaram fibras com morfologia e

diâmetro semelhante ao grupo controle (*scaffolds* sem rodamina), com um diâmetro médio de fibras de 500 nm (Liao *et al.*, 2008). Esses resultados corroboram com o presente estudo em que a incorporação do EGF por *electrospinning* de emulsão não influenciou na morfologia e diâmetro da matriz.

Fibras nanométricas têm sido preferidas por fornecerem não somente uma ampla área superficial para a adesão e desenvolvimento celular, mas também devido ao fato de aumentarem o comprimento dos neuritos das células. Matrizes de nanofibras alinhadas produzidas com diâmetro intermediário (759 nm) foram capazes de aumentar o comprimento dos neuritos do GRD quando comparadas às matrizes de diâmetro menores (231 nm) (Wang *et al.*, 2010). Outro trabalho mostra que CT neurais tiveram seus neuritos mais alongados quando cultivadas sobre matrizes com fibras alinhadas de diâmetro na faixa de 300 nm em comparação com as matrizes com fibras de diâmetro maior, na escala micrométrica (1,5 μ m) (Yang *et al.*, 2005). Logo, esses resultados mostram que não há um consenso na literatura sobre o diâmetro ideal das nanofibras para a ET neural. Porém, matrizes de nanofibras com diâmetro intermediário (300 a 759 nm), como mostram esses trabalhos, tendem a aumentar o comprimento dos neuritos das células quando comparados com nanofibras de outros diâmetros. Portanto, esses dados em conjunto mostram que as matrizes de nanofibras alinhadas com diâmetro intermediário, em torno de 500 nm, confeccionadas e utilizadas nesse trabalho parecem ser adequadas para o cultivo celular, possuindo grande aplicabilidade na ET neural. Essa hipótese é fortalecida quando se observa que os melhores resultados foram obtidos com fibras entre 300 e 800 nm de diâmetro, quando comparadas com fibras menores (abaixo de 300 nm) ou micrométricas. Logo, os melhores resultados foram obtidos com fibras que possuem o mesmo tamanho que as fibras da MEC natural.

Além disso, as nanofibras apresentaram poros interconectados como pode ser observado pelas imagens de MEV, na figura 1 (artigo), assegurando o arranjo tridimensional que pode favorecer a migração celular. Esses poros também permitem as trocas de nutrientes, fatores reguladores e metabólitos com o meio externo, essenciais para a sobrevivência das células (Dutta e Dutta, 2010). Se esse processo for impedido, a atividade metabólica do tecido é reduzida e surgem áreas de comprometimento da viabilidade celular e eventual necrose. Dessa forma, a regeneração necessária no tecido lesado não é alcançada. Ainda, a estrutura porosa dos *scaffolds* também é desejada pois auxilia na catalisação de proteínas incorporadas às matrizes, como no caso do EGF,

foco do presente estudo, e facilita a difusão dessas substâncias devido a grande área de superfície (Bhardwaj e Kundu, 2010).

A degradabilidade dos *scaffolds* é geralmente considerada uma característica indispensável para sua aplicabilidade na ET. Essa característica é importante tendo em vista que os biomateriais são utilizados como moldes temporários para o cultivo, proliferação e diferenciação das células, não havendo necessidade de sua posterior remoção (Bhardwaj e Kundu, 2010). A degradação *in vivo* dos mesmos envolve diversos mecanismos, sendo a solubilidade do material um dos fatores mais importantes nesse processo. Biomateriais altamente solúveis são mais suscetíveis à reação de hidrólise implicando em curto tempo de degradação, logo, são rapidamente reabsorvidos pelos fluidos biológicos não acompanhando a velocidade de regeneração do tecido. Ao contrário, biomateriais com baixa solubilidade apresentam uma reabsorção ineficiente permanecendo no local da lesão por longos períodos de tempo, o que pode acarretar a não regeneração ou regeneração inadequada do tecido. Dessa forma, a degradação é uma propriedade importante que deve ser avaliada de acordo com o local onde se quer regenerar, ou seja, a taxa de degradabilidade do biomaterial deve ser semelhante à taxa de regeneração do tecido (Navarro *et al.*, 2006). Nesse contexto, a escolha do material é muito importante. Dessa forma, o PLGA foi utilizado nesse estudo, pois possui tempo de degradação intermediário e é reabsorvido pelo organismo gerando subprodutos que são metabolizados no Ciclo de Krebs e eliminados através da urina e da respiração (Middleton e Tripton, 2000; Barbanti e Zavaglia, 2005). O PLGA também tem sido relatado como um ótimo polímero para a fabricação de dispositivos de liberação controlada de agentes ativos como peptídeos, proteínas, vacinas e FC (Fredenberg *et al.*, 2011), sendo alguns já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Dinarvand *et al.*, 2011), tornando esse polímero adequado para o uso na ET.

O tensoativo Span-80 possui extremidades hidrofílicas e hidrofóbicas e vem sendo utilizado com o intuito de internalizar a fração aquosa contendo a proteína, diminuindo, assim, o contato com o solvente orgânico. Além disso, esse surfactante é capaz de aderir na superfície das matrizes de nanofibras e retardar sua degradação impedindo a penetração e difusão de moléculas de água nas nanofibras e prevenindo a degradação do PLGA com uma velocidade mais rápida que a desejada. Portanto, a degradação de um *scaffold* pode ser criteriosamente controlada através de ajustes na quantidade da fase aquosa na emulsão e/ou na concentração da proteína na fase aquosa (Liao *et al.*, 2008).

Apesar desse fato, a degradação das matrizes AC e AE foi relativamente rápida, ocorrendo em 28 dias (44,7% e 41,3%, respectivamente). As quantidades de Span-80 e de EGF incorporados não influenciaram na solubilidade e, conseqüentemente, na degradabilidade do *scaffold*. Ainda, deve-se considerar que *in vivo*, a taxa de degradação provavelmente será ainda maior, uma vez que outros componentes plasmáticos podem acelerar este processo. Com isso, considera-se que as matrizes AC e AE produzidas podem ser boas candidatas à regeneração de tecidos que necessitam uma rápida taxa de regeneração, como no caso do neural.

Ainda, o conhecimento da degradação das matrizes auxilia na compreensão do mecanismo de liberação da proteína. Dessa forma, considerando o uso dessas matrizes como dispositivos de liberação controlada de FC, sugere-se que o ideal é uma rápida degradação, pois, após o *burst* (ou rápida liberação) inicial, a liberação dos agentes bioativos ocorre à medida que as matrizes vão sendo degradadas (Ji *et al.*, 2011). Nesse sentido, caso as matrizes tivessem uma degradação lenta, o EGF não seria liberado em tempo hábil para promover a regeneração tecidual e diferenciação neural.

No presente estudo, as matrizes de nanofibras alinhadas com EGF incorporado foram produzidas por ES de emulsão com sucesso. O perfil de liberação do EGF mostrou uma liberação inicial elevada nos primeiros três dias, porém relativamente constante e mais lenta até o final do período avaliado (28 dias), no qual a maior parte do EGF incorporado foi liberado. Esses resultados são semelhantes a outros publicados na literatura que descrevem uma típica curva de liberação, na qual se observou uma liberação inicial, seguido de uma liberação sustentada dos agentes bioativos (Ji *et al.*, 2011, Jiang *et al.*, 2012). Essa liberação inicial está provavelmente associada à proteína que não se difundiu pela nanofibra permanecendo na sua superfície. Ainda, essa característica é comum aos *scaffolds* de nanofibras produzidos por ES, pois devido a sua grande área de superfície e elevada porosidade, uma liberação brusca significativa é inicialmente observada (Bhardwaj e Kundu, 2010). Porém, após o *burst* inicial, a liberação se dá de forma mais lenta e gradual, por difusão do FC e/ou pela degradação do polímero (Ji *et al.*, 2011).

Por outro lado, os FC facilmente perdem sua atividade devido a transformação química ou física. Portanto, a preservação da atividade FC é um pré-requisito para a liberação bem sucedida do mesmo. Quando os *scaffolds* começam a degradar, o microambiente ácido, induzido por produtos de hidrólise, é também favorável à destruição da integridade do FC. Por isso é necessário haver um equilíbrio entre a taxa

de degradação da matriz e a cinética de liberação do FC sendo o dispositivo ideal aquele que é capaz de liberar inicialmente grande parte da dosagem de FC contida na matriz (*burst* inicial) seguido de um modelo mais linear no qual o FC incorporado é liberado de forma mais controlada (Ji *et al.*, 2011). Ao contrário, se o FC for liberado em sua maior parte após um longo período, os produtos de degradação da matriz exerceriam maior interferência em sua atividade.

Além disso, deseja-se que o FC, no caso do presente o EGF, seja liberado lentamente da matriz, para auxiliar no processo de diferenciação *in vitro* das CTMs, o qual dura normalmente em torno de três semanas. Conforme trabalho realizado por Jiang e colaboradores (2012), *scaffolds* com fibras orientadas contendo ácido retinóico incorporado, cuja liberação ocorreu de forma lenta e controlada, foram capazes de induzir a neuro-diferenciação das CTMs, aumentando a expressão protéica e gênica de diversos marcadores neurais. A liberação controlada também é importante pois, caso o AR fosse liberado de maneira rápida, ele ficaria muito concentrado no meio podendo causar citotoxicidade (Jiang *et al.*, 2012). Dessa forma, a forma de liberação do EGF com o sistema proposto foi adequada.

Em relação aos ensaios celulares, foram utilizadas CTMs obtidas a partir da polpa de dentes decíduos humanos devido a perspectivas futuras do grupo de pesquisa na sua utilização com foco na neuro-diferenciação e ET neurais, em modelos animais de lesão raquimedular e do nervo periférico. Desse modo, estudos prévios de avaliação da interação dessas células com as matrizes desenvolvidas foram realizados através de ensaios de adesão, viabilidade, citotoxicidade, proliferação e diferenciação neural.

No presente estudo, observou-se a morfologia das CTMs cultivadas nos *scaffolds* através da marcação de DAPI (marcador nuclear) e faloidina (marcador dos filamentos de actina). Os resultados demonstram que as CTMs cultivadas sobre as matrizes AC e AE apresentaram aumento do rearranjo do citoesqueleto com extensos prolongamentos e alongamento dos núcleos ao longo do eixo da matriz (figura 4 B e C). Porém, quando cultivadas diretamente nos poços das placas de cultura, as células mostraram morfologia típica de fibroblasto e estavam dispostas sem qualquer alinhamento no poço, havendo células em todas as direções. Ainda, as células estavam em maior número nesse grupo quando comparadas com as CTMs que foram cultivadas sobre as matrizes AC e AE (figura 4A). Esse comportamento também foi observado em células cultivadas em estrutura 3D, com componentes naturais da MEC (Hakkien *et al.*, 2011; Larsen *et al.*, 2006). Tal achado sugere que as nanofibras poderiam fornecer uma

arquitetura que melhor mimetizaria fisicamente a MEC, em comparação com os poços de cultivo, especialmente quando o foco do estudo é a neurodiferenciação. Além disso, no presente trabalho, a presença do EGF nas matrizes de nanofibras não modificou a morfologia das células, quando comparadas com matrizes sem esse FC incorporado.

O rearranjo do citoesqueleto e alongamento dos núcleos podem desempenhar um papel importante na criação da transdução de sinal para a diferenciação celular. As células geram tensão mecânica no seu citoesqueleto de actina e exercem forças de tração sobre a adesão à MEC. A mudança no equilíbrio de forças entre as células e a MEC podem alterar a forma da célula e induzi-las ao crescimento e diferenciação. O mecanismo preciso pelo qual a mudança das formas celulares influencia a expressão genética, o ciclo celular e, conseqüentemente, a diferenciação celular ocorre, permanece obscuro (Maniotis *et al.*, 1997). No entanto, sabe-se que essas forças mecânicas, transferidas para o núcleo através dos filamentos intermediários de actina durante mudanças na forma das células, podem reorganizar o centrômero do cromossomo através da deformação do núcleo, podendo afetar a estrutura celular e fenótipos das CTMs (Dalby *et al.*, 2003; Yim *et al.*, 2007; Maniotis *et al.*, 1997).

Uma característica essencial para a aplicação bem sucedida de biomateriais na ET é que esses sejam capazes de promover a adesão celular. A adesão celular à matriz é fundamental para a sobrevivência dessas células, visto que a ausência de contato induz mecanismos relacionados à morte celular programada (Greifer *et al.*, 2001, Streuli, 2009). O espalhamento das células estimula a sua proliferação através da adsorção de proteínas da MEC elaboradas pelas células na superfície das matrizes. Essa etapa é crucial para a subseqüente proliferação e diferenciação celular (Zhang e Kohn, 2012). Portanto, a acomodação e comportamento das células são fortemente afetadas pela estrutura e topografia das matrizes (Andrews *et al.*, 2007).

Em relação aos resultados obtidos com os ensaios de adesão celular, um importante achado foi o fato que as células aderiram significativamente mais quando foram cultivadas nas matrizes AE quando comparadas às matrizes AC. Como os parâmetros físico-químicos analisados tais como o diâmetro das fibras e a taxa de degradação foram semelhantes, essa diferença provavelmente pode ser atribuída à presença do FC, visto que tais fatores desempenham um papel importante no comportamento celular. A adesão, a proliferação e a diferenciação celular são, em grande parte, ditadas pela presença de FC solúveis na MEC (Zhang e Kohn, 2012).

Nesse sentido, o EGF presente nas matrizes pode ter aumentado a bioatividade e, conseqüentemente, favorecido a adesão celular nas mesmas.

Apesar do EGF ser amplamente utilizado em meio de cultura, ainda são poucos os estudos mostrando sua funcionalidade quando incorporado em matrizes. Os trabalhos existentes também mostram resultados contraditórios devido ao fato de adotarem técnicas de incorporação e utilizarem biomateriais diferentes. Apesar dessa fato, Rajam e colaboradores (2011) mostraram que o EGF incorporado em nanopartículas de quitosana melhorou a adesão de fibroblastos (Rajam *et al.*, 2011), corroborando com os resultados encontrados nesse presente estudo.

Além disso, a figura 1 (artigo) revela que o alinhamento compacta as nanofibras nos dois grupos de matrizes restando pouco espaço entre elas e reduzindo a quantidade e tamanho de poros interconectados. Esse fato poderia contribuir para a diminuição da adesão das CTMs nas matrizes AC em comparação com o grupo CT. Porém, essa condição parece ser revertida quando o EGF foi adicionado às matrizes.

Várias características dos *scaffolds* influenciam a adesão e viabilidade celular, incluindo as propriedades físicas, tais como a rugosidade e a rigidez, assim como as propriedades químicas e estruturais (Zhang e Kohn, 2012). Existem diferentes métodos utilizados para verificar a viabilidade das células, entre eles o ensaio do sal de tretazolium (MTT), o qual foi utilizado no presente estudo. Este ensaio colorimétrico baseia-se na medida da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais que reduzem o MTT a formazan, formando coloração púrpura (Saad *et al.*, 2006).

O metabolismo celular para as CTMs cultivadas nos poços e nos *scaffolds* AC e AE não apresentou diferença estatística quando avaliado durante 6, 24 e 48 horas, porém foi maior no grupo controle no tempo de 72 horas. Ainda, o número de células metabolicamente ativas, quando as CTMs foram cultivadas nos *scaffolds* AC e AE não apresentou diferença entre os períodos analisados, indicando que a viabilidade dessas células se manteve constante nesse intervalo de tempo. A expectativa inicial dos resultados para os dois grupos de matrizes era de que o metabolismo celular aumentasse na mesma proporção do grupo controle. Porém esse resultado não foi observado. Soma-se a isso o fato de que nos tempos 48 e 72 horas observou-se que após a adição de DMSO, os *scaffolds* AC e AE apresentavam alguns pontos (precipitados) em cor púrpura, indicando que ainda existiam cristais de formazan insolúveis impregnados nessas matrizes. Essa observação técnica é importante na interpretação dos resultados, visto que, eventualmente, estes tenham sido comprometidos por uma interferência na

leitura da absorvência final. Quando os resultados de degradabilidade foram analisados, observou-se que nos tempos de 48 e 72 horas (Figura 2) (artigo) o processo de degradabilidade das matrizes já havia sido iniciado. Quando o DMSO foi adicionado, esse processo intensificou-se, sendo que as matrizes sofreram ainda mais degradação, contribuindo para a formação do precipitado de formazan, no teste de MTT. Isso sugere que essa metodologia poderia não ser a mais adequada para a avaliação da viabilidade de células cultivadas sobre matrizes, em períodos superiores a 48 horas. No entanto, em estudos *in vivo*, esse fenômeno provavelmente não aconteceria porque a matriz se degradaria aos poucos e seria absorvida pelo organismo. Além disso, tendo em vista que a taxa de degradação é mínima, nos primeiros intervalos de tempo analisados, 6 e 24 horas, a viabilidade de todos os grupos analisados foi similar. Portanto, o MTT não se mostrou um teste adequado para a avaliação da viabilidade celular, apesar de ser amplamente utilizado. Portanto, sugere-se que o uso de outros testes alternativos, como o WST e medidas de viabilidade celular indiretas, como testes de proliferação celular, poderiam ser mais apropriados para essa avaliação nos *scaffolds* produzidos.

Frente aos resultados encontrados com o MTT, realizou-se um teste específico para avaliar a proliferação celular em que não houvesse esse tipo de interferência. Desse modo, optou-se pela técnica de imuno-histoquímica utilizando-se o marcador Ki67, proteína expressa durante diversas fases do ciclo celular das CTMs, para a avaliação do índice de proliferação celular. Os resultados obtidos sugerem que as CTMs cultivadas diretamente nas placas de cultura e nos *scaffolds* AC e AE possuem taxa de proliferação semelhante nos dois tempos analisados. Ainda, observou-se uma tendência de redução na porcentagem de células positivas para Ki67 das CTMs cultivadas nos *scaffolds* AE do 4º para o 7º dia.

Especula-se que o EGF, quando incluído em meio de cultivo celular, seja capaz de induzir respostas mitogênicas e desempenhar um papel na regulação da proliferação e sobrevivência das CTMs. Porém, esse FC também facilita a diferenciação das CTMs em diversas linhagens, como a neural (Arthur *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2010). Nesse processo, as células cessam sua proliferação, começam a sofrer alterações em sua morfologia, caracterizando o início da diferenciação e, posteriormente, sofrem alterações na expressão de genes e proteínas (Arthur *et al.*, 2008). Portanto, uma hipótese sobre a tendência na diminuição da proliferação das CTMs cultivadas nos *scaffolds* AE seria a possibilidade de que a quantidade de EGF liberada da matriz esteja iniciando o processo de diferenciação neural em detrimento ao processo de proliferação.

No entanto, a quantidade de EGF liberada provavelmente não parece suficiente para produzir uma redução significativa na taxa de proliferação celular, visto que não foi suficiente para que uma diferença estatística fosse observada. No entanto, cabe destacar que durante a regeneração tecidual utilizando-se CTMs há a ação parácrina das mesmas com liberação de fatores de crescimento, dentre eles o EGF. Segundo Parekkadan e Milwid (2010), 10^6 CTMs *in vitro* produzem aproximadamente 100 pg de FC em 24 horas, ou seja, nesse período cada célula libera cerca de 0,1 fg de FC (Parekkadan e Milwid, 2010). Portanto, considerando os fatos anteriormente citados, a quantidade de EGF incorporado na matriz é superior a produzida por 10^6 CTMs, porém, quando a concentração de EGF presente na matriz somada à liberação de EGF das próprias CTMs deve ser suficiente para atingir um resultado fisiológico. Uma hipótese é que se a análise fosse realizada por mais tempo, ou mesmo na sua utilização *in vivo* - onde a degradação do polímero é mais rápida, a quantidade de EGF seria maior, resultando em um efeito mais pronunciado. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Jiang e colaboradores (2011), os quais observaram, através da marcação com BrdU, uma redução na proliferação celular das CTMs cultivadas em matrizes contendo ácido retinóico, quando comparadas com as placas de cultura. Ainda, essas células apresentaram expressão diminuída de marcadores mesenquimais e aumentada de marcadores neurais (Jiang *et al.*, 2011). Ressalta-se, com isso, que os resultados de similaridade nas taxas de proliferação entre os diferentes grupos analisados obtidos nesse estudo estão de acordo com a hipótese apresentada para a ineficiência do teste de MTT nos tempos de 48 e 72 horas.

Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro* são testes preditivos utilizados para uma variedade de biomateriais. No presente estudo, a citotoxicidade celular foi avaliada através da dosagem da enzima LDH na qual sua atividade se dá pela ação catalítica na qual ocorre a conversão de piruvato à lactato. Trata-se de uma enzima intracelular e sua presença no meio extracelular pode ser indicativa de dano celular. O aumento da concentração dessa enzima é proporcional ao aumento da morte celular (Goldberg *et al.*, 2010).

Embora o EGF seja amplamente utilizado em diversos estudos envolvendo o cultivo de diferentes tipos celulares, havia necessidade de avaliar se o processo para obter as matrizes incorporadas com esse FC poderia ser prejudicial para as CTMs. Os resultados indicaram que, em todos os períodos analisados, as dosagens de LDH foram semelhantes para os grupos de matrizes AC, AE e controle, mas significativamente

inferiores ao grupo Triton 1%, o controle positivo, que representa a liberação máxima de LDH, ou seja, a morte total. Portanto, é possível afirmar que ambas as matrizes produzidas não possuem potencial citotóxico.

O EGF, em doses farmacológicas, possui efeitos citoprotetores que podem ser extremamente úteis para a prevenção ou terapia de patologias. Porém, evidências sugerem que, em altas concentrações, esse FC pode participar na promoção de malignidade celular. Em células de mamíferos, o EGF mostrou potencializar a transformação química e viral, induzindo alterações citogenéticas e respostas proliferativas, incluindo o aumento do crescimento de células de tumores gliais *in vitro* (Plata-Salamán, 1991). Ainda, estudos pré-clínicos mostraram que a administração sistêmica de EGF, em concentrações maiores que as fisiológicas, induz, a longo prazo, hiperplasia epitelial (Berlanga-Acosta *et al.*, 2009). Por outro lado, através dos resultados obtidos nesse trabalho, observa-se que a quantidade presente de EGF nas matrizes produzidas parece desempenhar uma atividade adequada às células, corroborando para a biocompatibilidade do biomaterial produzido.

Em relação à neuro-diferenciação, os resultados encontrados no presente estudo mostraram que as CTMs cultivadas nas matrizes foram receptivas à diferenciação neural utilizando o meio de diferenciação ao longo de um período de 3 semanas. Esse dado está de acordo com outros trabalhos que examinaram o potencial de diferenciação neural das SHEDs (Arthur *et al.*, 2008; Miura *et al.*, 2003). As alterações de forma nas células induzidas à diferenciação foram graduais ao longo dos 21 dias de tratamento. Essas células apresentaram retração dos seus processos citoplasmáticos, formando células esféricas, morfológicamente semelhantes a neurônios, bem como diminuíram a sua taxa de proliferação, conforme observado na figura 9. Por outro lado, um maior número de SHEDs foi observado no grupo controle, não induzidas ao processo de diferenciação, e mantiveram a sua aparência mesenquimal, não mostrando qualquer morfologia similar a neurônios. Com o intuito de mostrar que a redução na taxa de proliferação das CTMs submetidas ao protocolo de diferenciação neural não é resultado de morte celular, Arthur e colaboradores (2008) avaliaram a morte celular em trabalho comparando dois meios diferentes de diferenciação neural das CTMs. Através da visualização por azul de tripan, esses autores contaram o número de células positivas, em relação a células vivas em cada sobrenadante a cada troca de meio, mostrando que a morte celular no grupo controle e no diferenciado foi semelhante (Arthur *et al.*, 2008). Dessa forma, como no presente estudo foi utilizado protocolo de diferenciação similar

ao desses autores, pode-se constatar que a redução da proliferação das células quando induzidas a diferenciação neural não foi resultado de morte celular.

Apesar de não ser possível observar a morfologia das SHEDs cultivadas sobre as matrizes por microscopia de contraste de fase, devido ao biomaterial ser muito compacto, acredita-se que essas células apresentaram morfologia semelhante a neurônios, assim como as SHEDs diferenciadas diretamente nas placas. Desse modo, foram realizadas análises de imunofluorescência, a fim de identificar marcadores neurais e também para a visualização da morfologia dessas células cultivadas nos *scaffolds*.

As SHEDs, diferenciadas ou não, expressaram marcadores de neurônios imaturo, intermediário e maturo, bem como de astrócito, sendo esses, respectivamente, nestina, β III-tubulina, NFM e GFAP. Esses resultados confirmando o achado de Miura e colaboradores (2003) em que esse tipo de CTMs expressa constitutivamente algumas proteínas presentes na neurogênese (Miura *et al.*, 2003). O potencial intrínseco de diferenciação neuronal que as SHEDs provavelmente possuem pode ser devido à origem dessas células, pois elas são células mesenquimais de origem da crista neural, contribuindo para formação de alguns tipos celulares do sistema nervoso como neurônios e células da glia (Arthur *et al.*, 2008; Miura *et al.*, 2003).

No presente estudo, enquanto a expressão protéica de nestina e NFM detectada foi baixa para o grupo controle, a expressão desse marcador aumentou três semanas após a indução da diferenciação. Porém, as CTMs cultivadas nas matrizes AC e AE também apresentaram aumento de nestina e NFM mesmo quando essas células não foram diferenciadas. Os NFM são uma das três proteínas que compõem a estrutura do citoesqueleto de neurônios sendo utilizados como marcador de neurônios maduros da diferenciação neural (Lariviere e Julien, 2004). Os resultados desse estudo foram similares aos encontrados por outro trabalho em que as CTMs diferenciadas cultivadas nas matrizes de nanofibras alinhadas, produzidas por *electrospinning*, aumentaram a expressão de MAP2, também considerado marcador de neurônio maduro (Jiang *et al.*, 2012). Outro grupo de pesquisadores observou que as CTMs, quando cultivadas em suportes com fibras alinhados, apresentou fraca expressão de nestina. Porém, as matrizes não foram desenvolvidas pela técnica de *electrospinning* e a expressão proteica de nestina não foi quantificada (Yim *et al.*, 2007).

A diferenciação neuronal precoce no presente trabalho foi investigada através da expressão de β III-tubulina que é expressa durante o desenvolvimento inicial do cérebro

e é *down-regulated* conforme o cérebro se desenvolve na idade adulta. Além disso, essa proteína, a qual é um marcador de neurônio imaturo, auxilia na estabilidade dos microtúbulos e no transporte axonal, bem como de proteínas de canais de sódio e potássio dependentes de voltagem (Jiang e Oblinger, 1992). GFAP é a principal proteína de filamento intermediário em astrócitos maduros, mas também um componente importante do citoesqueleto de astrócitos durante o desenvolvimento neural (Middeldorp e Hol, 2011). No presente trabalho, a expressão de β III-tubulina e GFAP aumentou significativamente nos grupos diferenciados controle e nas matrizes AC e AE quando comparada com o grupo controle não diferenciado. Esses resultados são similares aos achados por outros autores em que CTMs, também derivadas da pulpa de dentes decíduos, aumentam a expressão β III-tubulina e GFAP após o processo de diferenciação neural (Miura *et al.*, 2003, Arthur *et al.*, 2008). Além disso, os resultados desse estudo também corroboraram com os dados referentes à expressão da β -III tubulina encontrados por Jiang e colaboradores (2012), porém diferiram em relação à expressão de GFAP. Esses autores mostraram que as CTMs diferenciadas, cultivadas nas matrizes de nanofibras alinhadas, aumentaram sua marcação de β -III tubulina e diminuíram a expressão de GFAP em relação às CTMs do grupo controle (Jiang *et al.*, 2012). Porém, as matrizes alinhadas produzidas por esses autores mantiveram a expressão gênica de GFAP.

Coletivamente, os resultados de imunofluorescência do presente trabalho mostraram que as SHEDs não diferenciadas, cultivadas nas matrizes AC e AE, foram capazes de se diferenciarem em precursores neurais e neurônios maduros de maneira semelhante ao grupo tratado com meio de diferenciação. Além disso, as SHEDs diferenciadas cultivadas nas matrizes AC e AE, produzidas no presente trabalho, foram capazes de se diferenciarem não somente em neurônios imaturos, mas também em astrócito, de maneira semelhante às SHEDs diferenciadas diretamente na placa de cultura. Ainda, observou-se uma tendência de aumento da expressão de β III-tubulina e GFAP para as CTMs cultivadas nas matrizes AC e AE não diferenciadas, em relação ao grupo controle. Especula-se que a topografia da matriz seja capaz de induzir a diferenciação das CTMs em diversas linhagens, como a neural (Rodrigues *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012). Esses resultados podem estar relacionados com a mudança da morfologia das CTMs quando são cultivadas sobre as matrizes com nanofibras alinhadas. Essas células apresentaram aumento do rearranjo do citoesqueleto com extensos prolongamentos, bem como alongamento dos núcleos ao longo do eixo da

matriz, conforme observado pela Fig. 4B e C. Essa mudança na morfologia celular pode desempenhar um papel importante na criação da transdução de sinal para a diferenciação. As células geram tensão mecânica no seu citoesqueleto de actina e exercem forças de tração que podem alterar a forma da célula e induzi-las à diferenciação. Porém, o mecanismo exato pelo qual a mudança das formas celulares influenciam a expressão genética e a diferenciação celular não é bem compreendido (Maniotis *et al.*, 1997). Portanto, uma hipótese sobre a tendência de aumento da expressão de β III-tubulina e GFAP para as CTMs cultivadas nas matrizes AC e AE não diferenciadas seria a possibilidade de que a topografia da matriz esteja iniciando o processo de diferenciação neural. No entanto, a topografia da matriz e a quantidade de EGF liberada provavelmente não parecem ter sido suficientes para produzir um aumento da expressão de β III-tubulina e GFAP, visto que não foi suficiente para que uma diferença estatística fosse observada. Ainda, o EGF presente nas matrizes de nanofibras parece não ter tido um efeito muito pronunciado, tanto quando as CTMs cultivadas foram diferenciadas quanto não diferenciadas. Esse dado mostra que a topografia da matriz prevaleceu em relação à presença do EGF na indução neural. Logo, corroborando com os achados anteriormente citados da literatura, a topografia da matriz das matrizes AC e AE produzidas no presente trabalho, nesse caso o alinhamento das nanofibras, pode por si só induzir a um aumento significativo de nestina e NFM, sugerindo a diferenciação das CTMs em precursores neuronais e neurônios maduros.

Neurônios funcionais expressam diferentes tipos de canais iônicos dependentes da voltagem que são necessários para a geração e propagação de potenciais de ação, estes incluem canais para K^+ , Na^+ e Ca^{2+} (Kandel *et al.*, 2000). No presente estudo, somente os canais funcionais de Na^+ foram analisados para confirmar que as CTMs, diferenciadas ou não diferenciadas e cultivadas nos *scaffolds*, diferenciaram-se em neurônios funcionais. Na maioria das células analisadas de todos os grupos, exceto no grupo controle, foi possível verificar que rapidamente os canais de sódio foram ativados, pelos quais passaram corrente para dentro das células, e foram registrados deslocamentos negativos. Depois, como os canais para sódio dependentes de voltagem se inativaram rapidamente, e os canais de potássio se ativaram tardiamente, as correntes dependentes de voltagem para potássio para fora apareceram como deflexões positivas. Essa corrente de entrada foi totalmente bloqueada quando se substituiu o Na^+ na solução de banho por cloreto de n-metil-D-glucamina (NMDG). Ao repor o Na^+ nessa solução, a corrente foi novamente observada. Esses dados confirmam a natureza iônica dessas

correntes de entrada, sendo estas correntes dependentes de voltagem para Na^+ (Nav). Não foi realizado um teste para confirmar a natureza iônica das correntes de saída das células, porém o seu traçado observado foi consistente com aqueles encontrados nas correntes dependentes de voltagem para K^+ .

Não há trabalhos na literatura que tenham avaliado a expressão de canais dependentes da voltagem para Na^+ em CTMs diferenciadas na linhagem neural e cultivadas sobre *scaffolds*. Existem raros trabalhos que avaliam a expressão desses canais em outros tipos celulares, como CTs neurais, cultivados em *scaffolds*. Ma e colaboradores (2004) avaliaram a expressão de canais de Na^+ dependentes de voltagem em que CT neurais foram cultivadas em *scaffolds* de gel de colágeno. Os resultados mostraram que poucas células indiferenciadas cultivadas nessas matrizes expressaram Nav, apesar dessas células já apresentarem morfologia e expressão de marcadores característicos de células neurais, como β III-tubulina. Com o processo de diferenciação, uma maior população de células expressaram Nav, sendo essas suficientes para gerar potenciais de ação espontâneos (Ma *et al.*, 2004). Logo, os resultados desse presente estudo corroboraram com os encontrados por Ma e colaboradores (2004), mostrando que a maioria das CTMs quando diferenciadas sobre os *scaffolds* AC e AE apresentaram Nav. Porém, os *scaffolds* com nanofibras alinhadas, produzidos no presente trabalho também, foram eficientes em diferenciar as CTMs em neurônios funcionalmente ativos mesmo quando essas células não eram tratadas com o meio de diferenciação neural.

Ainda, as CTMs cultivadas nos *scaffolds* com nanofibras alinhadas (AC e AE) produzidos nesse trabalho também apresentaram mais Nav quando comparadas com o grupo controle. Além disso, a maioria das CTMs cultivadas nas matrizes AC e AE, diferenciadas ou não, foram capazes de expressar Nav apresentando maiores valores de condutância máxima, comparados ao grupo controle. Esses dados sugerem que a topografia da matriz pode por si só induzir a diferenciação das CTMs em neurônios funcionalmente ativos mesmo quando essas células não eram tratadas com o meio de diferenciação neural. Apesar da média da condutância máxima das CTMs não diferenciadas cultivadas nas matrizes AE ter sido menor que as dos demais grupos, exceto o grupo controle, essa diferença não foi estatisticamente significativa. É importante salientar que uma em três células analisadas não diferenciadas cultivadas nas matrizes AE apresentaram Nav com dimensão semelhante aos demais grupos. Além disso, esses valores possivelmente se assemelhariam aos demais grupos se fosse aumentado o

número de células analisadas. Ainda, a presença de canais de Na^+ dependentes de voltagem, bem como a sua dimensão e as propriedades das Nav de todos os grupos analisados, exceto no grupo controle, foram consistentes com os relatados por células neuronais (Kandel *et al.*, 2000). Por outro lado, apenas uma única célula do grupo controle expressou Nav e esta não apresentou dimensão característica de célula neural. Esses dados confirmam que as CTMs desse grupo não se diferenciaram na linhagem neural mantendo suas características de célula mesenquimal.

Canais para Na^+ dependentes da voltagem são necessários para o disparo de potenciais de ação em neurônios (Kandel *et al.*, 2000). Essas correntes podem ser usadas como um marcador eletrofisiológico a indicar a diferenciação de CTs embrionárias em neurônios funcionais (Biella *et al.*, 2007). Esses autores demonstraram a existência de uma correlação entre a excitabilidade celular e canais para Na^+ durante a diferenciação neural. As CTs neurais cultivadas em meio de indução neural exibiram maior porcentagem de ativação de Nav com maior duração. Além disso, essas mudanças nas Nav foram associadas com a capacidade de diferenciação dessas células em gerar potenciais de ação (Biella *et al.*, 2007). Por fim, pode-se observar que há uma correlação direta com o aumento dos marcadores neuronais (nestina, β III-tubulina e NFM) com a presença e valores da condutância máxima das Nav, comprovando a diferenciação das CTMs nos scaffolds AC e AE em neurônios funcionalmente ativos. Estes resultados demonstram a importância do alinhamento das nanofibras na diferenciação neural, mostrando a sua vantagem para o uso na ET neural.

5. CONCLUSÃO

Uma das estratégias para promover a regeneração do SNC é o transplante de CTMs. Porém, tendo em vista que essa alternativa requer uma adequada via de aplicação, o presente trabalho procurou desenvolver, através da combinação de matrizes de nanofibras alinhadas e FC, um *scaffold* que auxiliasse no suporte e diferenciação neural das CTMs.

As matrizes AC e AE produzidas apresentaram morfologia semelhante com nanofibras na escala nanométrica fisicamente semelhante à MEC das células, sendo apropriadas para a cultivo celular quando aplicadas na ET. Ambas as matrizes apresentaram uma rápida degradabilidade sendo consideradas boas candidatas à regeneração de tecidos que necessitam uma rápida taxa de regeneração, como no caso do neural. O perfil de liberação do EGF foi adequando apresentando uma liberação inicial elevada nos primeiros três dias, porém relativamente constante e mais lenta até o final do período avaliado.

Em relação aos ensaios celulares, as células utilizadas no presente estudo foram isoladas a partir de dentes decíduos humanos, expandidas e caracterizadas como CTMs. Quando essas células foram cultivadas nos *scaffolds* AC e AE mostraram-se mais alongadas e alinhadas comparadas com as CTMs cultivadas no poço de cultura.

Um importante achado foi o fato que as células aderiram mais quando foram cultivadas nas matrizes AE quando comparadas às matrizes AC. Como os parâmetros físico-químicos analisados foram semelhantes, esse efeito provavelmente está relacionado a presença do EGF no *scaffold*. A viabilidade e a proliferação das CTMs cultivadas nos *scaffolds* AC e AE foram similares. Observou-se uma tendência na diminuição da proliferação das CTMs cultivadas nos *scaffolds* AE que poderia estar relacionada com quantidade de EGF liberada da matriz e possibilidade de estar iniciando o processo de diferenciação neural. Além disso, os *scaffolds* AC e AE produzidos não foram tóxicos para as CTMs.

Esse presente trabalho também mostrou que as CTMs cultivadas nas matrizes foram receptivas à diferenciação neural. A expressão de nestina e NFM foi semelhante em todos os grupos analisados e muito maior que o grupo controle. A expressão de β III-tubulin e GFAP foi semelhante em todos os grupos diferenciados e muito maior que o grupo controle. A maioria das CTMs cultivadas nas matrizes AC e AE, induzidas ou não a diferenciação neural, apresentaram Nav e o valor de condutância máxima destas

foi similar para todos os grupos analisados, exceto no grupo controle. Esses resultados mostram que as matrizes de nanofibras orientadas induzem à diferenciação neural das CTMs em neurônios funcionais tanto na ausência como na presença de EGF incorporado. Por fim, observou-se que há uma correlação direta com o aumento dos marcadores neuronais (nestina, β III-tubulina e NFM) com a presença e valores da condutância máxima das Nav, comprovando a diferenciação das CTMs nos scaffolds AC e AE em neurônios funcionalmente ativos.

Os resultados obtidos sugerem que a utilização da nanotecnologia como ferramenta associada com o uso das CTMs é uma estratégia que pode ser utilizada na área de regeneração neural. As matrizes produzidas nesse trabalho pela técnica de *electrospinning* são capazes de estimular a diferenciação neural das CTMs em neurônios funcionais, tanto na ausência como na presença de EGF incorporado. As matrizes AE melhoraram a adesão celular das CTMs quando comparados com os *scaffolds* sem o EGF, sendo preferencialmente utilizadas para a ET neurais.

Como perspectivas, mais estudos de eletrofisiologia devem ser realizados para aumentar o número de células analisadas. Ensaio de expressão gênica nas células cultivados nos *scaffolds* devem ser realizados para complementar os dados obtidos para a diferenciação das CTMs.

Portanto, as matrizes produzidas nesse estudo auxiliaram a ampliar os conhecimentos a respeito da interação entre a diferenciação celular e o biomaterial e, em um futuro próximo, podem contribuir para a regeneração tecidual e em modelos animais de lesão raquimedular e do nervo periférico.

6. REFERÊNCIAS

Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S.A., Gronthos, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 26:1787-1795, 2008.

Aguirre, A., Gallo, V. Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. *Neuron Glia Biol*. 3:209-220, 2007.

Aguirre, A., Dupree, J.L., Mangin, J.M., Gallo, V. A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat. Neurosci*. 10:990–1002, 2007.

Andrews, K. D.; Hunt, J. A.; Black, R. A., Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. *Biomaterials*. 28:1014-1026, 2007.

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

Barrie, A., Chiergatti, E., Miloso, M., Benfenati, F., Valtorta, F. Epidermal growth factor-mediated inhibition of neurotransmitter glutamate release from rat forebrain synaptosomes. *Mol Pharmacol*. 49:399-403, 1996.

Barry, F.P., Murphy, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:568-584, 2004.

Benoit, B.O., Savarese, T., Joly, M., Engstrom, C.M., Pang, L., Reilly, J., Recht, L.D., Ross, A.H., Quesenberry, P.J. Neurotrophin channeling of neural progenitor cell differentiation. *J Neurobiol*. 46:265-280, 2001.

Bernardi, L., Luisi, S.B., Fernandes, R., Dalberto, T.P., Valentim, L., Bogo Chies, J.A., Medeiros Fossati, A.C., Pranke, P. The isolation of stem cells from human

deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod.* 37:973-979, 2011.

Bhardwaj, N., Kundu, S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* 28:325-347, 2010.

Berlanga-Acosta, J., Gavilondo-Cowley, J., López-Saura P., González-López T., Castro-Santana, M.D., López-Mola, E., Guillén-Nieto, G., Herrera-Martinez, L. Epidermal growth factor in clinical practice—a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int Wound J.* 6:331-346, 2009.

Bertram, J.P., Rauch, M.F., Chang, K., Lavik, E.B. Using polymer chemistry to modulate the delivery of neurotrophic factors from degradable microspheres: delivery of BDNF. *Pharm Res.* 27:82-91, 2010.

Biella, G., Di Febo, F., Goffredo, D., Moiana, A., Taglietti, V., Conti, L., Cattaneo, E., Toselli, M. Differentiating embryonic stem-derived neural stem cells show a maturation-dependent pattern of voltage-gated sodium current expression and graded action potentials. *Neuroscience.* 149:38-52, 2007.

Buonanno, A., Fischbach, G.D. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 287-296, 2001.

Caplan, A.I., Dennis, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 98:1076-1084, 2006.

Carrancio, S., López-holgado, N., Sánchez-guijo, F.M., Villarón, E., Barbado, V., Tabera, S., Díez-campelo, M., Blanco, J., San miguel, J.F., Del cañizo, M.C. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol.* 36:1014-1021, 2008.

Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., Bierling, P., Hernigou, P., Layrolle, P., Rouard, H. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials.* 43:1-9, 2009.

Chew, S.Y., Mi, R., Hoke, A., Leong, K.W. Aligned protein-polymer composite fibers enhance nerve regeneration: a potential tissue-engineering platform. *Adv Funct Mater.* 17:1288-1296, 2007.

Chew, S.Y., Wen, J., Yim, E.K., Leong, K.W. Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. *Biomacromolecules*, 6:2017-2024, 2005.

Cho, Y.I., Choi, J.S., Jeong, S.Y., Yoo, H.S. Nerve growth factor (NGF)-conjugated electrospun nanostructures with topographical cues for neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 6:4725-4733, 2010.

Craig, C.G., Tropepe, V., Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Weiss, S., van der Kooy, D. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci.* 16:2649-2658, 1996.

Dalby, M.J., Riehle, M.O., Yarwood, S.J., Wilkinson, C.D., Curtis, A.S. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography, *Exp. Cell Res.* 284:274-282, 2003.

Dang, J.M., Leong, K.W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 58:487-499, 2006.

Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., Atyabi, F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine.* 6:877-895, 2011.

Dutta, R.C., Dutta, A.K. Comprehension of ECM-cell dynamics: a prerequisite for tissue regeneration. *Biotechnol Adv.* 28:764-769, 2010.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, Dj., Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytherapy.* 8:315-317, 2006.

Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslowc, M., Axelssona, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-a review. *Int J Pharm.* 415:34-52, 2011.

Goldberg E, Eddy EM, Duan C, Odet F. LDHC: the ultimate testis-specific gene. *J Androl.* 31:86-94, 2010.

Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells.* 27:2032-2043, 2009.

Govindasamy, V., Abdullah, A.N., Ronald, V.S., Musa, S., Ab Aziz, Z.A., Zain, R.B., Totey, S., Bhonde, R.R., Abu Kasim, N.H. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod.* 36: 1504-1515, 2010.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805, 2001.

Gümüşderelioğlu M, Dalkıranoğlu S, Aydın RS, Cakmak S. A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix. *J Biomed Mater Res A.* 98:461-472, 2011.

Han, Q., Sun, W., Lin, H., Zhao, W., Gao, Y., Zhao, Y., Chen, B., Xiao, Z., Hu, W., Li, Y., Yang, B., Dai, J. Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen-binding brain-derived neurotrophic factor improve the recovery of spinal cord injury in rats. *Tissue Eng Part A.* 15:2927-2935, 2009.

Helfer, V.E., Crestani, T., Quintiliano, K., Pilger, D.A., Pranke, P. Isolation and neurogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human deciduous teeth pulp. In 10th International Congress on Cell Biology, Rio de Janeiro, Brazil, July, 2012.

Huang, E.J., Reichardt, L. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24:677-736, 2001.

Huang, G.T., Gronthos, S., Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 88:792-806, 2009.

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

Ji, W., Sun, Y., Yang, F., van den Beucken, J.J., Fan, M., Chen, Z., Jansen, J.A. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharm Res.* 28:1259-1272, 2011.

Jiang, Y.Q., Oblinger, M.M. Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development. *J Cell Sci,* 103:643-651, 1992.

Jiang, X., Cao, H.Q., Shi, L.Y., Ng, S.Y., Stanton, L.W., Chew, S.Y. Nanofiber topography and sustained biochemical signaling enhance human mesenchymal stem cell neural commitment. *Acta Biomater.* 8:1290-1302, 2012.

Jin, G., Prabhakaran, M.P., Ramakrishna, S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomater.* 7:3113-3122, 2011.

Kandel, E.R., Schwartz, T.M., Jessell, T.M. *Principles of Neural Sciences.* 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

Király, M., Porcsalmy, B., Pataki, A., Kádár, K., Jelítai, M., Molnár, B., Hermann, P., Gera, I., Grimm, W.D., Ganss, B., Zsembery, A., Varga, G. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem Int.* 55:323-332, 2009.

Király, M., Kádár, K., Horváthy, D.B., Nardai, P., Rác, G.Z., Lacza, Z., Varga, G., Gerber, G. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem Int.* 59:371-381, 2011.

Khang, G., Kim, H.L., Hong, M., Lee, D. Neurogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells onto β -mercaptoethanol-loaded PLGA film. *Cell Tissue Res.* 347:713-724, 2012.

Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 16:2027-2033, 1996.

Lariviere, R.C, Julien, J.P. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol.* 58:131-48, 2004.

Liao, Y., Zhang, L., Gao, Y., Zhu, Z.T., Fong, H. Preparation, characterization, and encapsulation/release studies of a composite nanofiber mat electrospun from an emulsion containing poly(lactic-co-glycolic acid). *Polymer.* 49:5294-5299, 2008.

Lim, S.H., Mao, H.Q. Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 61:1084-1096, 2009.

Lim, S.H., Liu, X.Y., Song, H., Yarema, K.J., Mao, H.Q. The effect of nanofiber-guided cell alignment on the preferential differentiation of neural stem cells. *Biomaterials.* 31:9031-9039, 2010.

Lindvall, O., Kokaia, Z. Recovery and rehabilitation in stroke: Stem cells. *Stroke.* 35:2691-2694, 2004.

Lu, Y., Jiang, H., Tu, K., Wang, L. Mild immobilization of diverse macromolecular bioactive agents onto multifunctional fibrous membranes prepared by coaxial electrospinning. *Acta Biomater.* 5:1562-1574, 2009.

Lu, P., Blesch, A., Tuszynski, M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res.* 77:174-191, 2004.

Luisi, S.B., Barbachan, J.J., Chies, J.A., Filho, M.S. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture. *J Endod.* 33:833-835, 2007.

Ma, W., Fitzgerald, W., Liu, Q.Y., O'Shaughnessy, T.J., Maric, D., Lin, H.J., Alkon, D.L., Barker, J.L. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. *Exp Neurol*, 190:276-288, 2004.

Maniotis, A., Chen, C.S., Ingber, D.E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:849-854, 1997.

Meng, J., Han, Z., Kong, H, Qi, X., Wang, C., Xie, S., Xu, H. Electrospun aligned nanofibrous composite of MWCNT/polyurethane to enhance vascular endothelium cells proliferation and function. *J Biomed Mater Res A.* 95:312-320, 2010.

Middeldorp, J., Hol, E.M. GFAP in health an disease. *Prog Neurobiol.* 93:421-443, 2011.

Middleton, J.C., Tipton, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 21:2335-2346, 2000.

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 USA.* 100:5807-5812, 2003.

Morscheck, C., Völlner, F., Saugspier, M., Brandl, C., Reichert, T.E., Driemel, O., Schmalz, G. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 14:433-440, 2010.

Nardi, N., Meirelles, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 174:249-282, 2006.

Navarro, M., Aparicio, C., Charles-Harris, M., Ginebra, M.P., Engel, E., Planell, J.A. Development of a biodegradable composite scaffold for bone tissue engineering: physico-chemical, topographical, mechanical, degradation and biological properties *Adv Polym Science.* 200:209-231, 2006.

Parekkadan, B., Milwid, J.M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng.* 12:87-117, 2010.

Plata-Salamán, C.R. Epidermal Growth Factor and the Nervous System. *Peptides.* 12:653-663, 1991.

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

Quaglia, F. Bioinspired tissue engineering: The great promise of protein delivery Technologies. *Int J Pharm.* 364:281-297, 2008.

Rajam, M., Pulavendran, S., Rose, C., Mandal, A.B. Chitosan nanoparticles as a dual growth factor delivery system for tissue engineering applications. *Int J Pharm* 410:145-152, 2011.

Rodrigues, M., Griffith, L.G., Wells, A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 26:1-32, 2010.

Sadan, O., Shemesh, N., Cohen, Y., Melamed, E., Offen, D. Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases. *Isr Med Assoc J.* 11:201-204, 2009

Sahoo, S., Ang, L.T., Goh, J.C., Toh, S.L. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 93:1539-1550, 2010.

Santos, A., Wada, M. Polímeros Bioreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 17:308-317, 2007.

Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N.M., Fogaça, L.L., Cerqueira, A., Carvalho, M.D., Jazedje, T., Okamoto, O.K., Muotri, A.R., Zatz, M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 26:146-150, 2008.

Shanbhag, M.S., Lathia, J.D., Mughal, M.R., Francis, N.L., Pashos, N., Mattson, M.P., Wheatley, M.A. Neural Progenitor Cells Grown on Hydrogel Surfaces Respond to the Product of the Transgene of Encapsulated Genetically Engineered Fibroblasts. *Biomacromolecules*. 22:138-156, 2010.

Shin, S.H., Purevdorj, O., Castano, O., Planell, J.A., Kim, H.W. A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration. *J Tissue Eng*. 3:1-11, 2012.

Streuli, C.H. Integrins and cell-fate determination. *J Cell Sci*. 122:171-177, 2009.

Tayalia, P., Mooney, D.J. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv Mater*. 21:3269-3285, 2009.

Teng, Y.D., Lavik, E.B., Qu, X., Park, K.I., Ourednik, J., Zurakowski, D. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seed with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:3025-3029, 2002.

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

Tıǧlı RS, Kazaroǧlu NM, Mav İ Ş B, Gümüşderel İ Oǧlu M. Cellular Behavior on Epidermal Growth Factor (EGF)-Immobilized PCL/Gelatin Nanofibrous Scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2010 [Epub ahead of print].

Venugopal, J.R., Prabhakaran, M.P., Mukherjee, S., Ravichandran, R., Dan, K., Ramakrishna, S. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *J R Soc Interface.* 9:1-19, 2012.

Vindigni, V., Michelotto, L., Lancerotto, L., Puppa, A.D., D'avella, D., Abatangelo, G., Cortivo, R., Zavan, B. Isolation method for a stem cell population with neural potential from skin and adipose tissue. *Neurol Res.* 0:1-7, 2010.

Yamada, M., Ikeuchi, T., Hatanaka, H. The neurotrophic action and signaling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol.* 51:19-37, 1997.

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

Yim, E.K., Pang, S.W., Leong, K.W. Synthetic Nanostructures Inducing Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Neuronal Lineage. *Exp Cell Res.* 313:1820-1829, 2007.

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

Wang, Y., Zhao, Z., Zhao, B., Qi, H.X., Peng, J., Zhang, L., Xu, W.J., Hu, P., Lu, S.B. Biocompatibility evaluation of electrospun aligned poly(propylene carbonate) nanofibrous scaffolds with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Chin Med J.* 124:2361-2366, 2011.

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 Biomater.* 6:2970-2978, 2010.

Wong, R.W., Guillaud, L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:147-156, 2004.

Zhang, N., Yan, H., Wen, X. Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Res Ver.* 49:48-64, 2005.

Zhang, N., Kohn, D.H. Using Polymeric Materials to Control Stem Cell Behavior for Tissue Regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 96:63-81, 2012.

Ziabari, M.V., Haghi, A.K. Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 26:53-62, 2009.

Zuk, P.A, Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211-228, 2001.

7. ANEXOS

7.1. Anexo I – Caracterização das SHEDs como células-tronco mesenquimais

Análise morfológica das culturas celulares

Durante o cultivo celular *in vitro*, a presença das células aderentes e a sua confluência foram periodicamente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Olympus.

Perfil Imunofenotípico

O perfil imunofenotípico das culturas de ADSCs foi realizado mediante o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS. As células foram dissociadas utilizando-se Tripsina/EDTA e incubadas com anticorpos monoclonais específicos. Para isso, as células foram contadas em câmara de Neubauer, ressuspendidas em tampão PBS 1x na concentração de 10^6 células/mL e incubadas (100 μ L/tubo) com anticorpos anti-CD14, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD146, anti-CD184, anti-Stro-1 e anti-HLA-DR (Becton Dickinson, San Diego, CA) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). Após a incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz, sobre refrigeração a 4°C, as células foram lavadas em PBS 1x para remover o excesso de anticorpos não ligados. Controles isotípicos apropriados foram utilizados e a exclusão de células mortas foi realizada através da incubação com o corante 7-Aminoactinomycin D (7AAD). Um total de 10.000 eventos foi analisado. As análises foram realizadas no citômetro fluxo FACSAria III (Becton Dickinson) e analisadas no software FACSDiva, versão 6.0. Os gráficos foram gerados no programa WinMDI, versão 2.8.

Tabela 1: Perfil imunofenotípico das SHEDs analisadas por citometria de fluxo. Expressão em percentual de cada marcador (n=3).

Marcador	Expressão (%)			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média
CD29	95,5	99,0	100,0	98,2
CD73	99,0	99,0	99,8	99,3
C90	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

Diferenciação celular *in vitro*

Na quinta passagem celular, as células foram avaliadas quanto à sua capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, através de meios indutores específicos descritos por Meirelles e colaboradores (2006), conforme detalhado a seguir. Os meios foram renovados a cada três dias, utilizando-se células não submetidas à diferenciação como controle negativo de diferenciação. As mesmas eram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de gentamicina.

Diferenciação adipogênica

As células foram cultivadas por 2 semanas em meio IMDM contendo 20% de plasma humano, dexametasona (10^{-7} M), insulina (2,5 µg/ml), indometacina (5µM), rosiglitazona (5µM) e heparina sódica (10 unidades/mL). Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora e lavadas três vezes com água desionizada. Os adipócitos foram observados ao microscópio após coloração com o corante Oil Red O.

Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em meio de diferenciação durante 30 dias. O meio indutor utilizado foi o DMEM suplementado com 15 mM Hepes, 6,25 µg/mL de insulina, 10 ng/mL TGF-β1 e 50 nM da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavadas com água desionizada. A condrogênese foi demonstrada pela coloração com *Alcian Blue*.

Diferenciação osteogênica

As ADSCs foram cultivadas por 3 a 4 semanas em meio DMEM contendo soro fetal bovino (10%), dexametasona (10^{-8} M), ácido ascórbico 2-fosfato (5 µg/ml) e β-glicerofosfato (10mM). Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavadas com água desionizada. A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S.

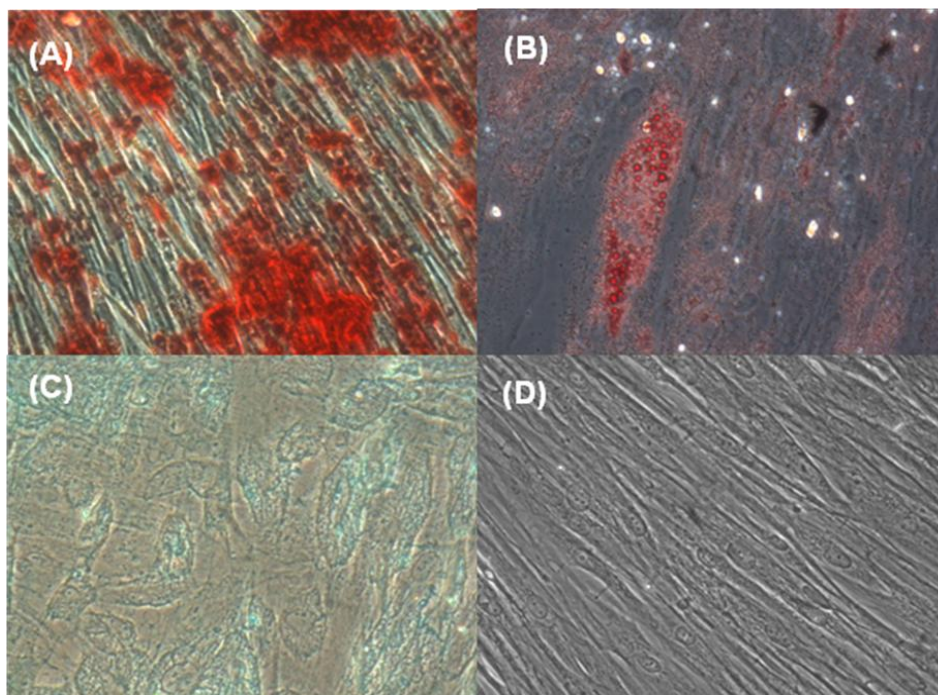


Figura 2: Diferenciação das CTMs nas linhagens (A) osteogênica, (B) adipogênica e (C) condrogênica, coradas com *Alizarin Red*, *Oil Red* e *Alcian Blue* respectivamente; (D) controle (CTMs não diferenciadas). Aumento de 400 x.

7.2. Anexo II – Fotografias do aparato de ES e das matrizes produzidas

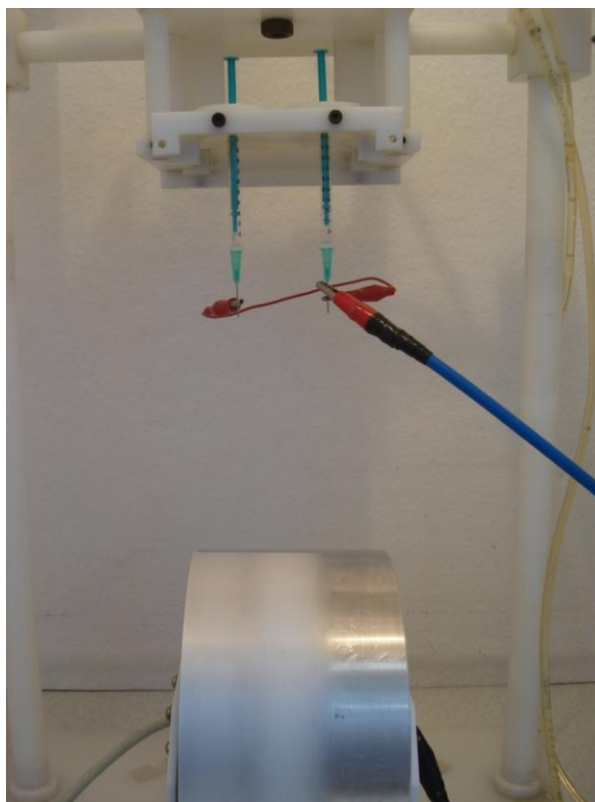


Figura 3- Fotografia do aparato de ES, podendo-se visualizar as duas seringas preenchidas com solução polimérica e conectadas aos eletrodos. Abaixo, a base rotatória para coleta das matrizes de nanofibras alinhadas.

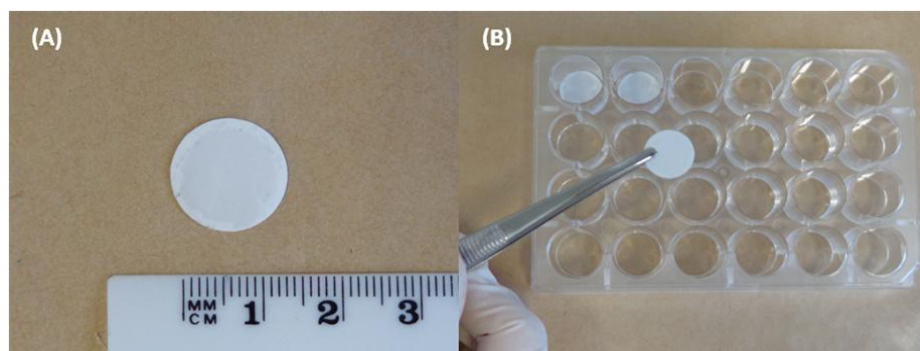
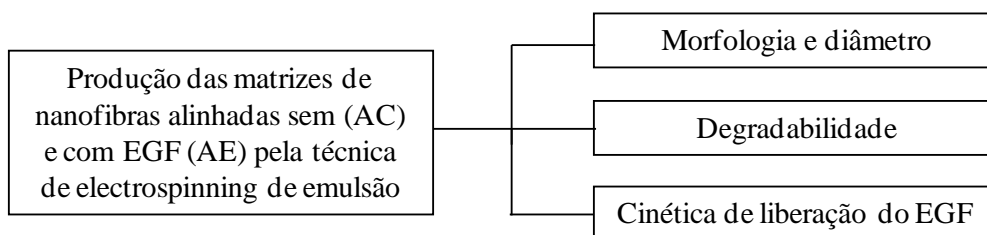


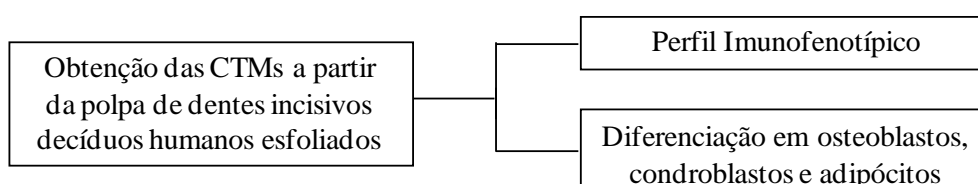
Figura 4: Matrizes de nanofibras produzidas por ES fixadas em lamínulas de vidro (A) e colocadas em placas de cultura de 24 poços (B) para posterior cultivo das CTMs.

7.3. Anexo III – Representação esquemática da metodologia do presente trabalho.

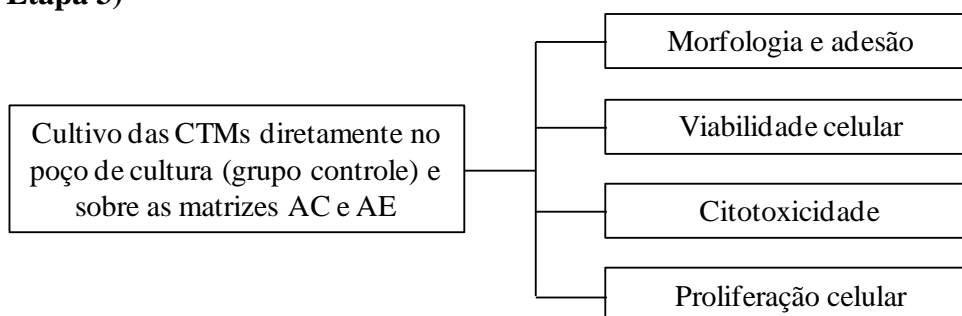
Etapa 1)



Etapa 2)



Etapa 3)



Etapa 4)

