

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Uso da bioengenharia para produzir substitutos cutâneos, por meio do cultivo de  
células-tronco e queratinócitos em matrizes nanoestruturadas produzidas por  
*electrospinning***

Tese de Doutorado

**DANIELA STEFFENS**

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke

Co-orientadora: Dra. Monica B. Mathor

Porto Alegre, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Uso da bioengenharia para produzir substitutos cutâneos, por meio do cultivo de células-tronco e queratinócitos em matrizes nanoestruturadas produzidas por *electrospinning***

Tese de Doutorado

**DANIELA STEFFENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas - Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke

Co-orientadora: Dra. Monica Beatriz Mathor

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Patricia Pranke, por todos esses anos me proporcionando novos conhecimentos, oportunidades e responsabilidades. És um exemplo de dedicação e perseverança no que acreditas.

À minha co-orientadora, Dra. Monica B. Mathor, por ter me introduzido ao “mundo dos queratinócitos”! Agradeço pela acolhida em seu laboratório em São Paulo e pelas sempre valiosas discussões científicas.

À Neide, bioterista do Biotério do IPEN, pela ajuda com o manuseio dos animais.

À profa. Dra. Paula Rigon, pela solicitude e ajuda com a análise histológica dos experimentos com animais.

Aos colegas de laboratório, sempre presentes, tornando os dias mais divertidos e construtivos. Vocês foram certamente as pessoas que acompanharam mais “de perto” todo o desenvolvimento dessa tese.

À minha querida bolsista, Bruna Santi, pela ajuda na primeira etapa desse trabalho, principalmente enquanto eu estava em São Paulo. Tua ajuda foi de grande valia!

À Dayane Piffer Luco, a sulista que foi muito mais que uma colega de laboratório em São Paulo, tornando-se uma grande amiga. Obrigada por ter tornado os dias insanos de trabalho mais leves, e as noites mais divertidas.

Às VIP’s e às “Dilis” pela amizade sem igual, pelas inúmeras mensagens diárias, em qualquer horário do dia e da noite, que de alguma forma sempre alegam o meu dia-a-dia.

À Simone, pela competência no seu trabalho e pela habitual solicitude e sorriso no rosto.

Ao meu esposo, Gustavo Vergani, por sempre estar ao meu lado, apoiando e até mesmo trabalhando comigo ☺. É tão bom dividir sonhos e realidades contigo!

À minha família... pai, mãe, Guilherme e Silvia, por sempre torcerem e acreditarem em mim. Por não deixarem desanimar quando o peso da “sem fim” jornada me abatia ...

À UFRGS e ao PPG Ciências Biológicas – Fisiologia, pelo ensino e pesquisa de excelência, proporcionando experiências e docentes únicos e de muito prestígio.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

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

A Deus, por tudo.

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

## RESUMO

A engenharia de tecidos (ET) é uma ferramenta importante para a regeneração da pele. Os tratamentos disponíveis não são suficientes para evitar a formação de cicatriz e promover a cura do paciente. Portanto, o presente estudo teve por objetivo produzir um substituto cutâneo usando o polímero Poli-D,L-ácido láctico (PDLLA) para produzir o biomaterial. Para esta proposta, biomateriais foram construídos pela técnica de *electrospinning* e divididos em 3 grupos: 1) PDLLA, 2) PDLLA/NaOH (*scaffolds* de PDLLA cuja superfície foi hidrolisada com uma solução de NaOH a 0,75 M) e 3) PDLLA/Lam (*scaffolds* também hidrolisados com NaOH e com a ligação covalente da proteína laminina). Os biomateriais foram construídos com dois diâmetros diferentes de fibras, com a menor na parte superior das matrizes. Esses biomateriais foram caracterizados quanto à morfologia, o diâmetro da fibra, o tamanho dos poros, à degradabilidade e às suas características de hidrofiliicidade. A ligação da laminina também foi investigada. Para as análises biológicas, as células-tronco mesenquimais (CTMs) foram então semeadas na parte inferior do *scaffold* e, após 24 horas, os queratinócitos da pele foram semeados na superfície oposta. Os grupos foram avaliados quanto à adesão de células no dia da semeadura e nos dias 7, 14 e 21 para análise da viabilidade celular. A partir do dia 7, os *scaffolds* foram submetidos a um sistema de cultura ar/líquido. Por fim, experimentos *in vivo* também foram realizados utilizando camundongos *nude* como modelo animal de queimadura. Seis grupos foram testados: (1) grupo lesão, onde os animais foram lesionados e uma gaze foi utilizada como cobertura (n=4); (2) PDLLA/Lam, *scaffold* hidrolisado com a ligação da laminina, sem células; (3) PDLLA sem células, (4) PDLLA/Lam com células; (5) PDLLA com células (n=6/grupo) e (6) animais saudáveis (n=4). Todos os animais receberam o mesmo padrão de defeito de 1cm<sup>2</sup>, realizado no dorso dos animais, com exceção do grupo 6. Após a cirurgia, os animais foram acompanhados por um período de 9 dias. As fotografias foram obtidas no dia da cirurgia e no dia da eutanásia. Após esse período, metade da lesão foi utilizada para análise de histologia e a outra metade para a análise de expressão gênica. Como resultados, os *scaffolds* apresentaram-se com fibras bem formadas e aleatoriamente distribuídas. A hidrólise não afetou substancialmente a estrutura das fibras, mas foi suficiente para a ligação da laminina. O diâmetro das fibras grossas variou de acordo com o *scaffold*, ficando entre 3,197 a 4,622 µm. O tamanho dos poros também variou de acordo com o biomaterial, ficando de 19,182 a 27,732 µm. As fibras finas apresentaram diâmetro médio de 574 nm e tamanho médio de poro de 3,444 µm. O biomaterial de PDLLA/Lam mostrou as características mais hidrofílicas entre os três grupos analisados. Matrizes de PDLLA

apresentaram peso molecular de 105-87 Da no 14º dia de análise. As matrizes de PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam apresentaram peso molecular de cerca de 40-50 Da, resultante do processo de hidrólise. A ligação da laminina foi confirmada por ensaio de imunofluorescência. Em geral, em termos de análise biológica, o grupo de PDLLA/Lam apresentou os melhores resultados para a adesão e viabilidade celular. A presença de ambos os tipos de células foi observada por meio da análise histológica em todos os grupos de *scaffolds* (ou biomateriais), até 21 dias de cultivo. Além disso, observou-se claramente que as células ocuparam toda a estrutura das matrizes, em todos os grupos estudados. Após 9 dias de experimentos *in vivo*, não houve diferença estatística no tamanho do defeito entre os grupos, embora os grupos com o biomaterial PDLLA/Lam tenham tido uma tendência ao menor tamanho de lesão, assim como o grupo PDLLA/Lam apresentou o melhor aspecto visual da ferida. A análise da expressão gênica para os grupos de biomateriais mostrou aumento considerável da expressão de TGF $\beta$ 1, aumento de VEGF e balanço (ou equilíbrio) da razão BAX/Bcl-2, quando comparado ao grupo controle lesão. A análise histológica mostrou tecidos bem formados nos grupos onde biomateriais e biomateriais com células foram utilizados. Em alguns animais do grupo biomateriais com células, a epiderme foi formada em toda a extensão da ferida. Não houve formação de anexos de pele em nenhum dos animais testados. Em conclusão, os biomateriais, principalmente os grupos PDLLA e PDLLA/Lam, mostraram bons resultados para a co-cultura das células, com boa adesão celular e a presença de células viáveis. Esses biomateriais foram capazes de proporcionar o suporte para o crescimento das células, o que indica que eles podem ser biomateriais adequados para utilização na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: engenharia de tecidos, pele, queratinócitos, células-tronco, *scaffolds*, *electrospinning*.

## ABSTRACT

Tissue engineering (TE) is an important tool for skin regeneration. Currently available treatments are insufficient for preventing scar formation and promoting healing of the patient. Therefore, the current study has aimed to produce a cutaneous substitute using Poly- D,L-lactic acid (PDLLA) polymer to produce the biomaterial. For this proposal, scaffolds were constructed by the electrospinning technique and divided into 3 groups: 1) PDLLA, 2) PDLLA/NaOH (PDLLA scaffolds hydrolyzed with a solution of NaOH 0.75M) and 3) PDLLA/Lam (also hydrolyzed with NaOH and in which the protein laminin was linked by covalent binding). They were constructed with 2 different fiber diameters, with the smallest at the top of the scaffold. These scaffolds were characterized by morphology, fiber diameter, pore size, degradability and their hydrophilicity features. Laminin linkage was also investigated. For biological analyses, mesenchymal stem cells were then seeded onto the bottom of the scaffolds and, after 24 hours, skin keratinocytes were seeded on the other side. The groups were evaluated for cell adhesion on the day of the seeding and on days 7, 14 and 21 for cell viability analysis. From day 7, the scaffolds were submitted to an air/liquid system culture. Finally, *in vivo* experiments were performed using *nude* mice as burn animal models. Six groups were tested: (1) animals injured without scaffolds (lesion group) in which gauze was used as a cover (n=4); (2) PDLLA/Lam, a hydrolyzed scaffold with the binding of laminin, without cells; (3) PDLLA without cells, (4) PDLLA/Lam with cells (n=6/group); (5) PDLLA with cells and (6) healthy animals (n=4). All the animals had a 1 cm<sup>2</sup> defect performed on their backs, removing all the skin, with the exception of group 6. The scaffolds (or biomaterials) were implanted in the mice with burn imitation skin defects for up to 9 days. Photos were taken on the day of surgery and on the day of euthanasia. Two parts of the defect were taken for histology and gene expression analyses. The results showed scaffolds presenting well formed and randomly distributed fibers. The hydrolysis did not substantially affect the structure of the fibers but it was sufficient for laminin linkage. The fiber diameter varied for each biomaterial, being from 3.197 to 4.622  $\mu\text{m}$  for the largest fibers. The pore size also varied according to the scaffold, being from 19.182 to 27.732  $\mu\text{m}$ . The smallest fibers showed a diameter of 574 nm and a pore size of 3.444  $\mu\text{m}$ . The PDLLA/Lam scaffolds demonstrated the greatest hydrophilic characteristics of the three groups. The molecular weight of the PDLLA matrices was approximately 105-87 Da on the 14<sup>th</sup> day of analysis. The PDLLA/NaOH and PDLLA/Lam scaffolds had a molecular weight of approximately 40-50

Da, as a result of the hydrolysis process. The linkage of the laminin was confirmed by immunofluorescence assay. In general, in terms of the biological analysis, the PDLLA/Lam group showed the best results for cell adhesion and viability tests. The presence of both types of cells was observed through histological analysis in the evaluation of all the groups up to 21 days of cultivation. Moreover, it was clearly observed that the cells occupied all the structure of the scaffolds in all the groups. After 9 days of *in vivo* experiments, defect size did not show statistical difference among the groups, although the groups with the PDLLA/Lam biomaterial had the lowest lesion size and the PDLLA/Lam group presented the best visual aspect of the wound. Gene expression analysis showed considerable increase of TGF $\beta$ 1 expression, increased VEGF and balance of the BAX/Bcl-2 ratio, when compared to the lesion group. Histological analysis showed well-formed tissue in the groups where the biomaterials and biomaterials plus cells were used. In some animals in which biomaterials and cells were used, the epidermis was formed throughout the length of the wound. There was no formation of skin annexus in any of the animals tested. In conclusion, the PDLLA scaffolds, mainly the PDLLA/Lam groups, showed good results for the co-cultivation of the cells, with good cell adhesion and presence of viable cells. These biomaterials were capable of providing support for the growth of the cells, indicating that they can be suitable biomaterials for use in tissue engineering.

Keywords: tissue engineering, skin, keratinocytes, stem cells, scaffolds, electrospinning.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**2D** bidimensional

**3D** tridimensional

**7AAD** 7-Amino Actinomicina D

**AsAP** *Ascorbic acid 2-phosphate* - Ácido ascórbico-2 fosfato

**BSA** Albumina bovina sérica

**cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementar

**CEUA** Comissão de Ética no Uso de Animais

**CTMs** Células-tronco mesenquimais

**DAPI** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DMEM** Dulbecco's modified Eagle's medium

**EDC** *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide* - Dimetilaminopropil carbodiimida

**EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EGF** *Epidermal growth factor* - Fator de crescimento epidermal

**ES** *Electrospinning*

**ET** Engenharia de Tecidos

**FGFs** *Fibroblast growth factor* - Fatores de crescimento de fibroblastos

**FGF-7** *Fibroblast growth factor 7* - Fator de crescimento de fibroblastos 7

**GPC** *Gel permeation chromatography* - Cromatografia de permeação em gel

**HGF** *Hepatocyte growth factor* - Fator de crescimento de hepatócitos

**IMDM** Iscove's Modified Dusbecco's medium

**IPEN** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

**K** queratinócitos

**KGF** *Keratinocyte growth factor* - Fator de crescimento de queratinócitos

**MEC** Matriz extracelular

**MEV** Microscopia eletrônica de varredura

**Mw** Massa molecular ponderal

**NHS** *N*-hidroxisuccinimida

**PBS** *Phosphate buffer solution* - Solução tampão de fosfato

**PDGF** *Platelet-derived growth factor* - Fator de crescimento derivado de plaquetas

**PDLLA** Poli-D,L-ácido lático

**PDLLA/Lam** Matriz de PDLLA com a incorporação da proteína laminina

**PDLLA/NaOH** Matriz de PDLLA, cuja superfície foi realizada hidrólise

**RNA** *Ribonucleic acid* - Ácido ribonucleico

**RGD** Arginylglycylaspartic acid - sequência de aminoácidos - arginina-glicina-ácido aspártico

**SDS** *Sodium dodecyl sulfate* - Dodecil sulfato de sódio

**SMAD** Via de sinalização para a produção de determinadas proteínas

**TE** *Tissue engineering* – Engenharia de Tecidos

**TGF- $\beta$ 1** *Transforming growth factor  $\beta$ 1* - Fator de crescimento transformador  $\beta$ 1

**THF** Tetrahydrofurano

**VEGF** *Vascular endothelial growth factor* – Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Tabela obtida de artigo científico, citando os principais substitutos cutâneos comercialmente disponíveis (Mohd Hilmi e Halim, 2015). .....	23
<b>Figura 2:</b> Esquema da técnica de <i>electrospinning</i> adaptado de <a href="http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-wendorff/research">http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-wendorff/research</a> . .....	27
<b>Figura 3:</b> Estrutura da proteína laminina-332 e os possíveis ligantes das diferentes cadeias. Figura adaptada de Sugawara e colaboradores, 2008. ....	31
<b>Figura 4:</b> Ilustração da estrutura do polímero Poli-D,L-ácido láctico. ....	33
<b>Figura 5:</b> Exemplificação do sistema de cultura ar-líquido. ....	42
<b>Figura 6:</b> Fotografia da lesão realizada nos animais para implante do biomaterial. ...	46
<b>Figura 7:</b> A) Fibras finas em magnificação de 1.000x. B) Fibras grossas em magnificação de 1.000x. C) Fibras finas e grossas (seta, ao fundo da imagem) justapostas em 10.000x de magnificação. ....	50
<b>Figura 8:</b> Medidas de ângulo de contato. Não houve formação de gota na matriz que foi tratada com NaOH 1 M no tempo de 60 minutos. ....	51
<b>Figura 9:</b> Efeitos do tratamento da solução de NaOH 0,75M sobre os <i>scaffolds</i> : A) Grupo controle (não submetido à hidrólise), B) 15 minutos, C) 30 minutos e D) 60 minutos de tratamento. ....	52
<b>Figura 10:</b> A) Imagens de microscopia confocal das matrizes de PDLLA/Lam. A laminina foi revelada por imunofluorescência. B) Controle negativo (o anticorpo primário foi omitido). 100x de magnificação. ....	52
<b>Figura 11:</b> Verificação da ligação da laminina após lavagem com solução de SDS 20%. A) A laminina foi covalentemente ligada às fibras. B) <i>Scaffolds</i> em que a laminina foi adsorvida na superfície das fibras. ....	53

<b>Figura 12:</b> A) Matrizes de PDLLA; B) Matrizes de PDLLA hidrolizadas com NaOH 0,75M por 15 minutos; C) Matrizes de PDLLA hidrolizadas com NaOH 0,75 M por 15 minutos com a ligação covalente da laminina. ....	53
<b>Figura 13:</b> Medida do ângulo de contato com água realizada nos três diferentes grupos de <i>scaffolds</i> estudados, PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam, respectivamente. ...	54
<b>Figura 14:</b> Peso molecular das matrizes de PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam. ....	55
<b>Figura 15:</b> Fotografias de diferenciação celular. A) Diferenciação adipogênica, B) Diferenciação osteogênica, C) Diferenciação condrogênica e D) Controle – células não submetidas a protocolos de diferenciação. A escala corresponde a 100 µm. ....	56
<b>Figura 16:</b> Teste de adesão celular avaliado nos dias em que as CTMs e os queratinócitos foram semeados. As diferentes letras referem-se às diferenças estatísticas encontradas entre os grupos analisados. ....	57
<b>Figura 17:</b> Ensaio de viabilidade celular avaliado em 7, 14 e 21 dias após a semeadura celular. Os resultados são apresentados como média±erro padrão. As letras acima das barras correspondem a comparações dos diversos grupos com o grupo controle; letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos. O símbolo “#” corresponde a comparações realizadas entre os grupos de biomateriais. As comparações foram feitas em cada dia de análise. ....	58
<b>Figura 18:</b> Fotografias das análises histológicas das matrizes de PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam, onde as CTMs e os queratinócitos foram co-cultivados. Os <i>scaffolds</i> foram corados com hematoxilina e eosina e as fotos obtidas em aumento de 20x. ...	59
<b>Figura 19:</b> Fotografias de análises por fluorescência mostrando o co-cultivo de CTMs (coradas em vermelho com o reagente Mini-26) e queratinócitos. No controle negativo foram semeadas CTMs, sem marcação com o corante Mini-26, e queratinócitos. O núcleo de todas as células aparece em azul devido à coloração com DAPI. ....	60
<b>Figura 20:</b> Análise de microscopia confocal das CTMs após 7 dias da semeadura nos <i>scaffolds</i> . A) Matriz de PDLLA e B) Matriz de PDLLA/Lam. ....	61

**Figura 21:** Análise de microscopia confocal dos queratinócitos após 7 dias da semeadura nos *scaffolds*. A) Matriz de PDLLA e B) Matriz de PDLLA/Lam. .... 61

**Figura 22:** Gráfico do tamanho médio de lesão após 9 dias da cirurgia com remoção total de pele..... 62

**Figura 23:** Fotos das lesões cutâneas dos animais 9 dias após a cirurgia. A) Controle lesão, B) PDLLA/Lam, C) PDLLA, D) PDLLA/Lam + células e E) PDLLA + células. A barra de escala corresponde a 1 cm. .... 63

**Figura 24:** Fotos do leito das lesões cutâneas após 9 dias da cirurgia. A) Controle lesão, B) PDLLA/Lam, C) PDLLA, D) PDLLA/Lam + células e E) PDLLA + células. A barra de escala corresponde a 1 cm. .... 64

**Figura 25:** Expressão gênica dos diferentes grupos testados para os genes Bcl-2, VEGF, TGF $\beta$ 1, Colla1, SDF-1 e BAX. # refere-se à comparação com o grupo controle lesão. As letras referem-se às comparações feitas entre os demais grupos, para o mesmo gene em questão..... 66

**Figura 26:** Fotomicrografias da análise histológica dos tecidos referente aos experimentos *in vivo*. As figuras A e B referem-se ao grupo controle lesão. A) Aspecto da lesão após 9 dias de experimento, com a derme desorganizada e ausência de epiderme; B) Infiltrado inflamatório presente no leito da lesão. As figuras C-E correspondem ao grupo PDLLA/Lam. C) Região próxima à borda da lesão onde se pode observar a derme e a epiderme bem formadas; D) Aumento da mesma região da figura C, onde a epiderme é evidenciada em maior destaque, com a presença de estrato córneo; E) Região central da lesão, com a derme parcialmente formada e a epiderme em formação, onde se pode observar de modo bem evidente a presença de tecido de granulação. As figuras F-H referem-se ao grupo PDLLA. F) Região próxima à borda da lesão, podendo ser visualizada derme e epiderme bem formadas; G) Região central da lesão, com tecido de granulação proeminente, podendo ser observadas células inflamatórias; H) Visualização de parte do *scaffold* não degradado sobre a lesão cutânea. As figuras I-K correspondem ao grupo PDLLA/Lam + células. I) Figura de parte da região central da lesão onde podem ser visualizadas derme e epiderme bem formadas, com algum tecido de granulação sobre as mesmas e com a presença de infiltrado inflamatório; J) Figura de região central onde pode ser visualizada a formação da epiderme, já com a parte dérmica bem formada; K) Região central da lesão onde derme, e principalmente epiderme,

estão em formação. As figuras L-N referem-se ao grupo PDLLA + células. L) Imagem obtida da região central da lesão, já com a derme e a epiderme bem formadas; M) Presença de grande infiltrado inflamatório na região adjacente à lesão; N) Região central da lesão, com derme formada e epiderme em formação. As figuras O e P correspondem ao grupo controle sadio. O) Aspecto da pele sadia, com presença de epiderme, da derme e de seus anexos, assim como do tecido muscular; P) Detalhe em maior aumento da fotomicrografia O, onde são visualizados os folículos pilosos, as glândulas sebáceas, bem como a epiderme com estrato córneo, a derme e, mais abaixo, o tecido muscular. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . .....69

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 1:** Artigo “Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute”, aceito para publicação pela revista *Regenerative Medicine*.

**Anexo 2:** Produção científica realizada durante o período do doutorado.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1 A Pele.....	18
1.2 Queimaduras .....	19
1.2.1 As fases da cicatrização das feridas.....	20
1.2.2 Substitutos cutâneos disponíveis.....	22
1.3 Engenharia de Tecidos (ET) .....	24
1.4 Biomateriais .....	25
1.5 Electrospinning (ES).....	26
1.6 Biologia celular.....	28
1.6.1 Células-tronco .....	28
1.6.2 Queratinócitos .....	29
1.7 Substâncias bioativas .....	30
1.7.1 Laminina.....	30
1.8 Desenvolvimento de biomateriais para fins de regeneração cutânea.....	31
2. OBJETIVOS .....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 - Produção e funcionalização de <i>scaffolds</i> .....	35
3.1.1 – Hidrólise da superfície das matrizes.....	35
3.1.2 – Ligação da proteína laminina nas matrizes .....	36
3.2 - Obtenção e cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs).....	37
3.2.1 - Obtenção de células de polpa de dentes decíduos .....	37
3.3 - Caracterização das células-tronco mesenquimais .....	38
3.3.1 - Análise morfológica das culturas celulares.....	38
3.3.2 - Análise imunofenotípica das células cultivadas .....	38
3.3.3 - Diferenciação celular <i>in vitro</i> .....	38



3.4 - Obtenção de queratinócitos .....	39
3.5 - Propriedades químicas das matrizes .....	40
3.5.1 - Morfologia .....	40
3.5.2 - Diâmetro das fibras .....	40
3.5.3 - Ângulo de Contato .....	41
3.5.4 – Tamanho de poro.....	41
3.5.5 - Degradabilidade .....	41
3.6 - Propriedades biológicas das matrizes de nanofibras .....	42
3.6.1 – Ensaio de adesão e viabilidade celular .....	43
3.6.2 - Análise histológica.....	43
3.6.3 – Verificação do co-cultivo de células-tronco mesenquimais e queratinócitos .....	44
3.7 - Experimentos <i>in vivo</i> .....	44
3.7.1 - Incorporação das células nos <i>scaffolds</i> para implante nos modelos animais.....	44
3.7.2 - Avaliação da capacidade das células-tronco mesenquimais e dos queratinócitos integrados em matrizes de fibras promoverem a regeneração de pele em modelo animal de defeito cutâneo.....	45
3.7.3 - Verificação da expressão gênica.....	48
3.8 - Análise Estatística .....	49
4. RESULTADOS .....	50
4.1 Análises físico-químicas dos biomateriais.....	50
4.2 Análises biológicas dos biomateriais .....	55
4.3 Experimentação <i>in vivo</i> .....	60
5. DISCUSSÃO .....	70
6. CONCLUSÕES .....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A Pele

A pele é o maior órgão imunologicamente competente do corpo. Esse tecido é formado basicamente por duas camadas: a epiderme e a derme. Essas camadas variam em sua espessura, força e flexibilidade e, dessa forma, proporcionam à pele uma grande variedade de funções (Burd, Ayyappan e Huang, 2009).

A epiderme é a camada mais externa da pele, compacta e praticamente impermeável, formando a primeira barreira física contra agentes externos. A mesma é composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, de origem ectodérmica e formada por quatro tipos celulares distintos: os queratinócitos, considerados as células mais importantes da epiderme, somando 80% das células que compõem este epitélio; os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, formando 13% da população celular da epiderme; as células de Langerhans, responsáveis pelo sistema de imunovigilância cutâneo, representando 4% do número total de células da epiderme e ainda as células de Merkel, receptoras para o tato, correspondendo a 3% da população celular epidérmica. A epiderme não possui sistema de irrigação sanguínea direta, sendo nutrida pela permeação dos nutrientes procedentes da derme, por capilaridade (Peyrefitte, Martini e Chivot, 1998; Harris, 2009; Mohd Hilmi e Halim, 2015).

A derme, derivada da mesoderme, é constituída por uma espessa camada de tecido conjuntivo composto por grandes quantidades de elastina e colágeno, sobre a qual se apoia a epiderme. Nela encontram-se algumas fibras elásticas e reticulares, bem como muitas fibras colágenas, onde estão presentes os vasos sanguíneos e linfáticos, além de numerosas terminações nervosas. Algumas das principais funções da derme resumem-se em servir como tecido de sustentação para a epiderme, manter a homeostase, promover flexibilidade e fornecer proteção contra traumas mecânicos. Na derme são encontradas células endoteliais, células musculares lisas, mastócitos, fibroblastos e demais células do sistema imunológico, assim como uma grande porção de matriz extracelular. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese de diferentes macromoléculas que compõe a matriz extracelular e também possuem uma intensa atividade durante o processo de cicatrização (Peyrefitte, Martini e Chivot, 1998; Gamonal, 2002; Supp e Boyce, 2005; Mohd Hilmi e Halim, 2015).

A hipoderme não é uma parte da pele, mas encontra-se abaixo da derme e é equivalente à fáscia subcutânea. Essa camada contém tecido adiposo disposto em lóbulos que estão separados por septos de tecido conjuntivo (Mohd Hilmi e Halim, 2015).

Os anexos da pele são os folículos pilosos e pêlos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, unhas e glândulas mamárias (Mohd Hilmi e Halim, 2015).

Por fim, a pele é rica em terminações nervosas que permitem que a mesma seja uma interface tátil entre o corpo e o meio ambiente, além de permitir a sensibilidade à dor e às temperaturas extremas, entre outros sentidos (Burd, Ayyappan e Huang, 2009).

Uma vez que a pele serve como uma barreira protetora do nosso organismo ao mundo externo, qualquer lesão causada a ela deve ser rápida e eficientemente reparada.

## **1.2 Queimaduras**

Na queimadura, as altas temperaturas dilatam os vasos e fazem com que os líquidos contidos neles saiam, formando bolhas. Essas bolhas podem resultar em feridas, vulneráveis a infecções. A gravidade das queimaduras é definida pela extensão do dano ocorrido na vítima (Leite, 2001).

Conforme o aumento da profundidade da lesão, a natureza da cicatrização altera-se. Em queimaduras profundas, danos à derme envolvem a desnaturação de colágeno. O colágeno desnaturado precisa ser retirado para que nova re-epitelização ocorra. Esse processo é feito através de degradação enzimática e fagocitose, aumentando a resposta inflamatória. Dessa forma, a cura leva um tempo maior. A inflamação inicia uma cascata de eventos, com leucócitos polimorfonucleares sendo atraídos para o local, ocasionando proteólise e fagocitose. Os macrófagos ativados pelos polimorfonucleares também liberam citocinas, recrutando fibroblastos para iniciar o processo de reposição do colágeno perdido (Sun, Sibrashvili e Khavari, 2014). Os fibroblastos envolvidos no reparo do tecido possuem a capacidade de produzir grandes quantidades de colágeno, porém não possuem a capacidade de organizar essas fibras de colágeno. O resultado final do reparo da derme é a deposição desorganizada de colágeno, o que fisicamente aparece como uma cicatrização tecidual. Dentre as afecções cicatriciais destacam-se as cicatrizes hipertróficas e os quelóides. As cicatrizes hipertróficas consistem em cicatrizes elevadas, tensas e confinadas às margens da lesão original, podendo ter regressão espontânea. Por outro lado, os quelóides são cicatrizes elevadas, brilhantes, pruriginosas ou dolorosas, de origem dérmica e que ultrapassam os limites da lesão original, adentrando tecidos normais adjacentes. Eles tendem a crescer ao

longo do tempo e não possuem regressão espontânea. A duração da re-epitelização e da incidência de cicatrizes aumenta com o aumento da profundidade da lesão (Ferreira e D'Assumpção, 2006; Burd, Ayyappan e Huang, 2009).

As lesões por queimaduras ocorrem anualmente em mais de 11 milhões de pessoas em todo o mundo. O tempo para o fechamento da ferida está estreitamente relacionado com a susceptibilidade a infecções, duração da dor, tempo de internação hospitalar e incidência de cicatriz (Sun, Sivrashvili e Khavari, 2014).

Segundo dados do DATASUS, entre novembro de 2014 e novembro de 2015 ocorreram 2.014 internações hospitalares causadas por queimaduras e corrosões no Brasil. O valor total gasto nessas internações foi de R\$ 4.660.787,18. Do total de internações, 45 resultaram em óbito (Datusus, 2015).

Nesse sentido, o enxerto de pele tem sido usado para o tratamento de vítimas de queimaduras extensas e profundas, de segundo e terceiro grau. No entanto, esse tipo de tratamento geralmente resulta em contração da cicatriz, sendo esse efeito principalmente problemático em crianças devido ao seu crescimento corporal (Fujimori *et al.*, 2006). Dessa forma, embora a taxa de mortalidade por queimaduras seja relativamente baixa, a morbidade é extremamente alta. Uma pesquisa prospectiva realizada com pacientes queimados, onde os dados foram coletados de 12 em 12 meses, até 60 meses após a queimadura mostrou que 40% dos pacientes (88 de 221) ainda apresentavam dor, 24 meses após o acidente. Os pesquisadores observaram que a dor estava diretamente relacionada com a área lesada na época da queimadura e inversamente relacionada com a qualidade de vida do paciente (Elliott *et al.*, 2015).

Principalmente nas grandes queimaduras e feridas crônicas, os tratamentos disponíveis são insuficientes para prevenir a formação de cicatrizes e promover a cura do paciente (Middelkoop *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2007). Por isso, a regeneração de pele é um importante campo para a engenharia tecidual (Middelkoop *et al.*, 2004; Fujimori *et al.*, 2006; Sun, Sivrashvili e Khavari, 2014).

### **1.2.1 As fases da cicatrização das feridas**

A cicatrização de feridas pode ser dividida em 3 fases principais: 1) fase inflamatória, 2) fase proliferativa e 3) fase de remodelação. As fases da cicatrização são discutidas a seguir (Cotran, 1999; Burd, Ayyappan e Huang, 2009; Sun, Sivrashvili e Khavari, 2014).

Imediatamente após a lesão de pele, várias respostas fisiológicas são acionadas com o intuito de parar a perda de sangue. Células locais de músculo liso vascular contraem os vasos

para reduzir o fluxo sanguíneo. As plaquetas e os fatores da cascata de coagulação formam um coágulo de fibrina hemostática, que também serve como suporte para a migração de células, incluindo queratinócitos, leucócitos e fibroblastos, para dentro da ferida.

A fase inflamatória inicia-se poucas horas após a lesão e é alimentada por mediadores derivados de plaquetas, subprodutos bacterianos e quimioatraentes secretados localmente. Os neutrófilos infiltram-se primeiro no local da lesão, fagocitando as bactérias e degradando as proteínas danificadas da matriz extracelular. Os monócitos chegam ao local dentro de 24 horas e transformam-se em macrófagos para destruir microrganismos, remover restos de tecido, destruir neutrófilos restantes e pavimentar o caminho para a angiogênese e a formação do tecido de granulação.

Os macrófagos podem também ajudar na transição para a fase proliferativa, um processo pelo qual as células recentemente atraídas ao leito da lesão preenchem o defeito da ferida, através da secreção de uma série de fatores de crescimento e quimiocinas, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de transformação do crescimento  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF $\alpha$  e TGF $\beta$ ), os quais induzem a migração e proliferação de células e a formação da matriz extracelular. Reservatórios de células-tronco encontrados na base de folículos pilosos, istmo e epiderme interfoliculares dão origem a queratinócitos que proliferam e migram para atingir a cobertura da ferida sendo, em seguida, submetidos à estratificação e diferenciação para reconstruir a barreira epidérmica. Em conjunto com a reparação epidérmica, a angiogênese inicia-se estimulada por vários fatores de crescimento, incluindo o VEGF e FGF-2. A mistura de vasos sanguíneos recentemente formados com fibroblastos, macrófagos e proteínas da matriz extracelular forma o "tecido de granulação", um material macio e de cor rosada que aparece na base de uma ferida de cicatrização. Perto do final da fase proliferativa, fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos contráteis, ricos em actina, que contraem em conjunto os bordos da ferida.

A fase de remodelação envolve uma transição da derme, da predominância de colágeno do tipo III para a de colágeno do tipo I, em conjunto com a remoção de células das fases anteriores. A remodelação do colágeno envolve metaloproteinases de matriz (MMPs) e a síntese alterada de colágeno que então produz uma cicatriz. A resistência à tração da pele aumenta durante essa fase, recuperando cerca de 40% da sua força original após um mês e aproximadamente 70% após um ano.

Falhas no início, término ou na regulação de qualquer uma dessas fases da cicatrização das feridas resultam em cicatrização patológica, que se pode manifestar como granuloma

piogênico (crescimento excessivo de tecido de granulação), cicatrizes hipertróficas e quelóides ou úlceras crônicas (inflamação prolongada e incapacidade de reepitelização).

No caso de lesões mais profundas e maiores, algumas diferenças ocorrem na regeneração da ferida, tais como uma maior quantidade de fibrina, de debris necróticos e de exsudato, os quais estão presentes e precisam ser retirados. O tecido de granulação é formado em grandes quantidades e a contração ocorre em grandes extensões, podendo ocasionar contraturas que, por fim, podem dificultar a movimentação de articulações.

### **1.2.2 Substitutos cutâneos disponíveis**

De acordo com a literatura, os substitutos cutâneos têm sido referidos como peles 3D, pele reconstruída, equivalente cutâneo, pele artificial, cultura organotípica de pele, substituto cutâneo ou enxerto cutâneo (Supp e Boyce, 2005; Metcalfe e Ferguson, 2007; Sun, Siprashvili e Khavari, 2014; Mohd Hilmi e Halim, 2015).

Tais produtos estão em alta demanda para o tratamento de queimaduras e feridas, levando a indústria a investir grandes montantes financeiros na engenharia de tecidos para a pele. O principal objetivo dessa área é a de produzir produtos para a substituição cutânea, com aplicação na reparação de feridas, em especial nos casos de perda completas de pele (*full-thickness skin loss*), visando amenizar ou não ter a formação de cicatrizes após o ferimento (Sun, Siprashvili e Khavari, 2014). Esses equivalentes podem ser categorizados como epidérmicos, dérmicos ou compósitos, de acordo com a sua estrutura e o grau de semelhança funcional à pele normal. Substitutos de pele epidérmicos consistem classicamente de uma lâmina de queratinócitos autólogos, isolados a partir de um doador e expandidos *in vitro*. A geração de tais lâminas é demorada e dispendiosa e os produtos resultantes têm prazo de validade de no máximo 24 horas. No entanto, os enxertos epidérmicos autólogos salvam vidas e, por isso, inúmeras inovações em vários estágios de produção, incluindo a melhoria das técnicas de cultura de células, técnicas de diferenciação e fabricação de *scaffolds*, têm sido realizadas. As limitações abordadas por essa técnica são a dor, a formação de cicatriz na área doadora, a cicatrização de feridas prejudicada e a quantidade de material insuficiente para cobrir uma grande área lesada. No caso de aloenxerto, ainda pode ocorrer a rejeição auto-imune dentro de 3 a 4 semanas (Supp e Boyce, 2005; Sun, Siprashvili e Khavari, 2014; Mohd Hilmi e Halim, 2015). Em contraste, os produtos de substituição dérmica são, na sua grande maioria, acelulares e têm origem autóloga, alogênica, xenogênica ou sintética. Substitutos compósitos consistem geralmente de queratinócitos e fibroblastos alogênicos e têm a vantagem de liberar fatores de

crescimento, citocinas, promover a formação de matriz extracelular e outros elementos, juntamente com uma cobertura temporária da ferida. Os substitutos acelulares são mais fáceis de fabricar do que substitutos contendo células e facilmente incorporam-se nas feridas, sem ocorrer rejeição. No entanto, eles não proporcionam uma boa revascularização e, embora tenham um papel importante na cirurgia reconstrutiva, não possuem uma boa incorporação ao tecido dos pacientes. Assim como os substitutos epidérmicos alogênicos, os compósitos dérmicos celularizados alogênicos sofrem rejeição imunológica em 3 a 4 semanas (Metcalf e Ferguson, 2007; Sun, Siprashvili e Khavari, 2014; Mohd Hilmi e Halim, 2015).

Os produtos comerciais comumente utilizados são à base de colágeno, quitina e fibrina (Mohd Hilmi e Halim, 2015). Também existem os produtos manufaturados artificialmente, tais como poli-ácido láctico e poli-ácido glicólico, por exemplo (Metcalf e Ferguson, 2007). A figura 1 mostra os principais substitutos comerciais disponíveis.

**Table 1** Current skin replacement products

Brand	Cell and biomaterial	Wound type
Apligraf®, United States	Human keratinocytes and fibroblasts cultured on collagen	Full thickness
Biobrane®, United Kingdom	Silicone membrane attached to a nylon mesh	Partial thickness
CellerateRX®, United States	Gel containing 65% collagen	Superficial
Cryoskin®, United Kingdom	Keratinocytes cultured on silicone	Superficial
DermaGraft®, United States	Cryopreserved human fibroblasts from foreskin cultured on a polyglactin mesh scaffold	Full thickness
EpiDex®, Switzerland	HFSC cultured on silicone	Full thickness
EpiFix®, United States	Human amniotic membrane	Full thickness
Integra®, United States	Semi-permeable silicone membrane composed of bovine tendon collagen	Full thickness
MyDerm™, Malaysia	Human fibroblasts and keratinocytes cultured on fibrin-silk	Full thickness
OASIS™, United States	Porcine small intestinal submucosa	Full thickness
OrCel™, United States	Human keratinocytes and fibroblasts cultured on bovine collagen	Full thickness
PriMatrix, United States	Collagen from fetal bovine dermis	Full thickness
Transcyte™, United States	Human newborn fibroblasts cultured on nylon mesh	Full thickness

HFSC: Hair follicle stem cells.

**Figura 1:** Tabela obtida de artigo científico, citando os principais substitutos cutâneos comercialmente disponíveis (Mohd Hilmi e Halim, 2015).

Um dos substitutos cutâneos mais usados no mercado, aplicado em ambientes hospitalares, é o Integra®. No entanto, além de se tratar de um produto de origem xenogênica, o custo é um fator que dificulta a sua utilização, visto que 1 cm<sup>2</sup> de Integra® custa cerca de R\$ 72,00. Assim, o custo para tratar um único paciente, com extensa queimadura, pode ser de cerca de R\$ 300.000,00. Custo esse impraticável, na maioria dos casos, seja para o Sistema Único de Saúde, planos de saúde ou mesmo para o próprio paciente.

Assim, a necessidade de desenvolvimento de novos enxertos cutâneos ainda se faz necessária, uma vez que os atuais produtos disponíveis não são capazes de substituir a pele

danificada tão completamente quanto a pele nativa pode, a um preço acessível e sem deixar uma cicatriz.

### 1.3 Engenharia de Tecidos (ET)

A crescente tendência de aumento da expectativa de vida da população, assim como as sérias limitações na utilização de enxertos alogênicos, autólogos ou xenogênicos tem estimulado cientistas, ao redor do mundo, a deterem-se cada vez mais na busca de novas alternativas de substitutos cutâneos (Hench, 2000). Dessa forma, as pesquisas nessa área buscam aplicar os princípios do transplante de células e da bioengenharia para a construção de substitutos biológicos. Esses, por sua vez, são utilizados na tentativa de restaurar e manter as funções normais dos órgãos e tecidos até então doentes ou lesados.

Assim, o enfoque da engenharia de tecidos é reparar os tecidos perdidos ou danificados através do uso de fatores de crescimento, terapia celular e biomateriais que sirvam como suporte para o desenvolvimento das células (Venugopal *et al.*, 2012). Essa área engloba conhecimentos de campos diversos como a ciência dos materiais, a biologia celular, o transplante e a engenharia, unindo esforços a fim de desenvolver novos substitutos biológicos tridimensionais que mimetizem a arquitetura do tecido humano (Naderi, Matin e Bahrami, 2011).

A engenharia de tecidos (ET) já foi conceituada de diversas maneiras ao longo dos anos (Katari, Peloso e Orlando, 2014), ainda causando muita confusão quanto à utilização deste termo. Um dos conceitos mais populares foi definido por Daar e Greenwood (Daar e Greenwood, 2007), o qual propõe que “A engenharia tecidual comumente se utiliza da combinação de células, biomateriais e moléculas solúveis, a fim de estimular o crescimento celular e tissular”. Esses mesmos pesquisadores também conceituaram a medicina regenerativa (MR) como sendo uma área que engloba a ET, mas que também pode envolver a modificação genética de células, seguida pelo seu transplante sem necessariamente envolver o uso de biomateriais e de células-tronco como alvos farmacêuticos para fins terapêuticos. Nesse sentido, a medicina regenerativa vem como um termo mais amplo, abrangendo diversos campos, entre eles a ET. Ainda, avanços tecnológicos ocorridos na última década deixam claro que essas duas categorias, embora diferentes, estão intrinsecamente relacionadas. Dessa forma, há uma tendência crescente em combinar os dois termos e tratá-los como um termo único, em inglês já tendo sido designada a sigla “TERM” (“*Tissue Engineering and Regenerative Medicine*”) (Salgado *et al.*, 2013).



Deixando à parte essa polêmica, a expectativa atual é que o uso da engenharia de tecidos possibilite regenerar tecidos danificados por doenças como câncer, diabetes, lesões medulares, queimaduras, entre outras (Shields *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Steffens *et al.*, 2013; Braghirolli, Steffens e Pranke, 2014).

#### **1.4 Biomateriais**

No passado, a maior parte das pesquisas científicas focadas no crescimento celular utilizava-se de placas de Petri ou outras placas de cultivo celular, as quais proporcionam a chamada cultura bidimensional, também denominada 2D. Contudo, na natureza, as células vivem em um ambiente tridimensional, ou 3D, composto pela matriz extracelular (MEC) e, assim, originam os tecidos funcionais. Os sinais químicos e a micro- e nano-escala da MEC controlam e direcionam os processos-chaves das células, incluindo a sua adesão, proliferação, migração e diferenciação (Salmasi *et al.*, 2015). A MEC pode ser definida como o componente não-celular dos tecidos, que tem sido comparada à "cola" que liga as células em conjunto. Ela é reconhecida como um ambiente ativo, passando constantemente por mudanças na sua composição e estrutura, em resposta às ações de células vizinhas. Por conseguinte, a comunicação entre as células e a MEC é essencial para a compreensão de como a matriz extracelular e as células aprenderam a adaptar-se umas às outras (Kular, Basu e Sharma, 2014).

A fim de mimetizar a MEC, a engenharia de tecidos precisa de suportes tridimensionais (3D) para servir como substrato para a semeadura de células e como um suporte físico, orientando a formação do novo tecido.

Considerando-se o uso de células, não há dúvidas de que uma oferta suficiente de nutrientes e oxigênio para as células transplantadas é vital para a sua sobrevivência e manutenção. Ainda, sem um suprimento suficiente, apenas um pequeno número de células previamente semeadas ou mesmo migradas a partir do ambiente para os biomateriais sobreviverão. Em uma cultura convencional, como uma cultura estática em placas de cultivo, a taxa de crescimento inicial é alta, mas a proliferação cessa logo que as células atingem a confluência. A fim de superar as limitações de fornecimento de nutrientes e espaço físico, estruturas de materiais porosos (3D) estão sendo criadas devido à sua maior área de superfície para adesão e proliferação celular, em relação aos materiais 2D (Hosseinkhani *et al.*, 2014).

Os materiais 3D também são preferíveis pela possibilidade de formação de estruturas celulares que podem se assemelhar à estrutura e funções dos tecidos corporais. Além disso, a

difusão de oxigênio, nutrientes e fatores bioativos, através dessas estruturas, são suficientes para a sobrevivência de um grande número de células, por longos períodos de tempo (Polverini, 1995; Kim *et al.*, 2013).

Os biomateriais podem ser desenvolvidos com base em substâncias naturais ou sintéticas (Barbanti, S. H. , Zavaglia, C. A. C. e Duek, E. A. R., 2005; Boudriot *et al.*, 2005), além de poderem ser preparados utilizando-se diferentes técnicas tais como, *electrospinning*, prototipagem rápida, *foaming*, entre outros, gerando estruturas com morfologias porosas que facilitam o crescimento das células para a formação dos tecidos (Greiner e Wendorff, 2007; Agarwal, Wendorff e Greiner, 2009; Cunha *et al.*, 2011; Gauvin e Khademhosseini, 2011; Zanatta, Rudisile, *et al.*, 2012; Zanatta, Steffens, *et al.*, 2012; Salmasi *et al.*, 2015).

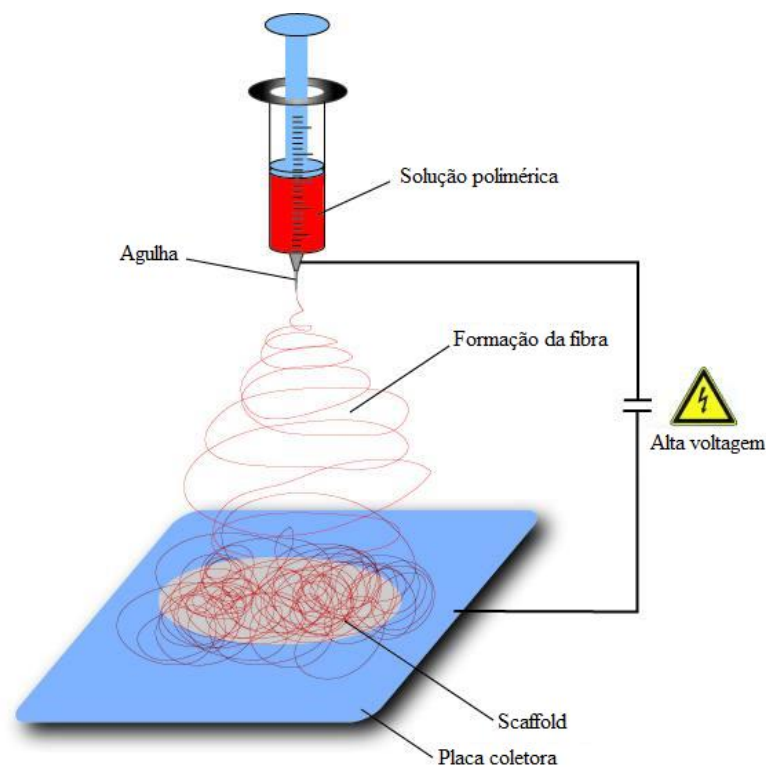
Idealmente, um *scaffold* (biomaterial) polimérico para uso na ET deve possuir as seguintes características: i) propriedades superficiais adequadas, para promover a adesão, proliferação e diferenciação celular; ii) biocompatibilidade; iii) altas porosidade e relação de área de superfície/volume, com rede de poros interconectados para o crescimento celular e fluxo de nutrientes e resíduos metabólicos; iv) propriedades mecânicas adequadas para uso *in vivo* (Hosseinkhani *et al.*, 2014; Ou e Hosseinkhani, 2014).

O sucesso de um biomaterial 3D depende de muitos parâmetros, que variam da nano a macro escala. A degradabilidade, as propriedades mecânicas e a qualidade da porosidade desses biomateriais são parâmetros importantes a serem analisados antes da escolha da matéria prima a ser utilizada na produção do biomaterial. Além disso, as propriedades de superfície, tais como a topografia, a energia de superfície, a quantidade de solventes residuais e a molhabilidade/hidrofobicidade são características importantes a serem determinadas para correlacioná-las com a resposta biológica dos biomateriais. Uma característica fundamental para o sucesso da aplicação de biomateriais na ET é que eles precisam promover a adesão e a viabilidade celular, uma vez que o comportamento das células é fortemente afetado pela estrutura dos biomateriais (Andrews, Hunt e Black, 2007). Dessa forma, ao se desenvolver um biomaterial, diversas análises físico-químicas e biológicas precisam ser realizadas.

### **1.5 Electrospinning (ES)**

Entre as técnicas utilizadas para construir biomateriais, a serem cultivados com células, o ES é uma das técnicas mais amplamente estudadas e que tem demonstrado os resultados mais promissores em termos de aplicações na bioengenharia para tecidos macios (Braghirolli, Steffens e Pranke, 2014).

O processo de *electrospinning* funciona pelo princípio eletrostático. Como pode ser observado na figura 2, o aparelho é composto basicamente por uma seringa com agulha, um eletrodo coletor (normalmente uma placa de metal), uma fonte de campo elétrico e uma bomba peristáltica. Para a realização do *electrospinning* se faz necessária a produção de uma solução polimérica a partir de polímeros e solventes. Essa solução a ser eletrofiada é impulsionada ao sistema através da agulha da seringa pela ação da bomba. Essa solução é então submetida a uma diferença de tensão elétrica presente entre a agulha e a placa metálica. A voltagem elétrica gerada causa uma deformação na gota polimérica, gerando um cone na ponta da agulha (cone de Taylor). Esse desequilíbrio gerado na solução pela aplicação da voltagem elétrica faz com que a solução polimérica forme fios que saem da seringa em direção à placa coletora. No caminho, o solvente na solução evapora-se e, no final do processo, filamentos sólidos contínuos são obtidos (Greiner e Wendorff, 2007).



**Figura 2:** Esquema da técnica de *electrospinning* adaptado de <http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-wendorff/research>.

Embora pareça, à primeira vista, um método fácil, o processo depende de uma multiplicidade de parâmetros moleculares, de processamento e técnicos, o que inclui: i) os parâmetros ambientais, tais como temperatura da solução e do ambiente, umidade e velocidade do ar na câmara de ES; ii) as propriedades da solução, tais como a elasticidade, viscosidade, condutividade e tensão superficial e iii) as variáveis técnicas, como a distância entre o eletrodo e a ponta da agulha, o potencial elétrico, a taxa de fluxo (velocidade da solução), o peso molecular dos polímeros escolhidos, a geometria da placa coletora, entre outros (Doshi e Reneker, 1995; Greiner e Wendorff, 2007).

O ES é uma técnica na qual diversos tipos de polímeros podem ser utilizados (Ou e Hosseinkhani, 2014) e pela qual podem ser obtidas fibras desde a ordem nanométrica até a micrométrica, alinhadas ou aleatoriamente distribuída (Braghirolli, Steffens e Pranke, 2014), dependendo da otimização dos parâmetros acima citados. Por essa técnica, são obtidos *scaffolds* que mimetizam muito intimamente a matriz extracelular dos tecidos em termos químicos e dimensionais (Agarwal, Wendorff e Greiner, 2009).

## **1.6 Biologia celular**

Como já mencionado, a ET utiliza-se da tríade, células, biomateriais e substâncias bioativas. As células têm uma função crucial neste sistema: a de sintetizar uma matriz extracelular adequada, permitindo a organização *in vitro* e o desenvolvimento do novo tecido. A escolha do tipo celular é muito importante e tem uma grande influência sobre o sucesso da engenharia de tecidos, sendo que as células devem ser escolhidas de acordo com o tecido a ser reparado (Agarwal, Wendorff e Greiner, 2009; Braghirolli, Steffens e Pranke, 2014; Alrefai *et al.*, 2015; Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, 2015; Lee, Kim e Choi, 2015).

### **1.6.1 Células-tronco**

As células-tronco são células primitivas encontradas em muitos organismos multicelulares e que possuem habilidades de auto-renovação e plasticidade. A auto-renovação é a capacidade que as células-tronco possuem de se manterem idênticas mesmo após numerosas divisões celulares. Já a plasticidade é a capacidade de diferenciação das células-tronco em diferentes tipos de células maduras. As células-tronco de mamíferos são classificadas com base na fonte de que derivam: células-tronco embrionárias, derivadas do embrião até a fase de blastocistos, e células-tronco adultas, encontradas em tecidos já

formados (Braghirolli, Steffens e Pranke, 2014; Hosseinkhani *et al.*, 2014; Mohd Hilmi e Halim, 2015).

As células-tronco adultas são uma classe de células indiferenciadas encontradas na maioria dos tecidos e possuem uma grande capacidade de auto-renovação, bem como diferenciação em diferentes tipos de células especializadas como, por exemplo, células sanguíneas, musculares, nervosas, etc (Caterson *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003; Romanov, Svintsitskaya e Smirnov, 2003; Ju *et al.*, 2005).

Dentre as células-tronco adultas, encontram-se as células-tronco mesenquimais (CTMs), ou também chamadas de células estromais mesenquimais, cuja função é a manutenção e reparação do tecido em que elas são encontradas. As CTMs são células multipotentes que exibem uma grande plasticidade e podem dar origem a tecido mesenquimal e não-mesenquimal (Silva Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006; Zheng *et al.*, 2013). A capacidade de diferenciação das CTMs em células especializadas de outros tecidos é conhecida como transdiferenciação (Hosseinkhani *et al.*, 2014).

Além disso, as CTMs apresentam atividade secretora intrínseca, sendo capazes de sintetizar e secretar grandes quantidades de fatores bioativos com efeitos imunomoduladores. As citocinas e/ou fatores de crescimento secretados pelas CTMs apresentam efeitos tróficos, contribuindo para a regeneração de feridas, a inibição da apoptose, a estimulação da angiogênese, bem como a mitose intrínseca de células-tronco dos tecidos ou a estimulação das células progenitoras. Esses efeitos contribuem para a criação de um microambiente regenerativo nas lesões de tecidos ou danos locais (Caplan, 2007; Sun, Siprashvili e Khavari, 2014). Logo, o uso combinado de CTMs e *scaffolds* é uma ferramenta promissora com aplicabilidade para a regeneração de muitos tipos de tecidos.

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

### **1.6.2 Queratinócitos**

Os queratinócitos são células diferenciadas do tecido epitelial, representando aproximadamente 80% das células epidérmicas.

Os queratinócitos possuem a habilidade de se diferenciar e migrar formando as camadas da epiderme. Essas células sofrem progressivas mudanças em sua morfologia e

conteúdo e, eventualmente, transformam-se de células poligonais vivas a células mortas e achatadas repletas de queratina (Standring, 2008). Devido à sua capacidade de diferenciação, essas células formam as quatro camadas da epiderme: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. O processo clássico de queratinização epidérmica apenas descreve os estágios finais de maturação, em que as células mortas preenchidas com queratina e outras proteínas, tais como involucrina, são formadas, originando a impermeabilidade característica da epiderme (Standring, 2008). Logo, a utilização dessas células pode ser um fator determinante para uma melhor cicatrização de lesões cutâneas provocadas por doenças ou acidentes, como já demonstrado em trabalhos utilizando derme alogênica (Herson *et al.*, 2001).

### **1.7 Substâncias bioativas**

Embora os biomateriais e a terapia celular conjuntamente já venham demonstrando bons resultados na engenharia de tecidos sabe-se que no ambiente celular natural diversas moléculas também estão presentes, desempenhando um papel significativo na função fisiológica dos tecidos e órgãos (Burdick e Vunjak-Novakovic, 2009; Gauvin e Khademhosseini, 2011).

A MEC é uma malha de fibras que variam de dezenas a milhares de nanômetros em diâmetro, formando um arcabouço celular com alta porosidade. Ela é composta por proteínas estruturais, incluindo colágeno, elastina e proteínas não-estruturais, como a fibronectina, laminina, tenascina, etc. Outros componentes importantes da MEC incluem as integrinas, fatores de crescimento e um grupo de metaloproteinases (Kular, Basu e Sharma, 2014).

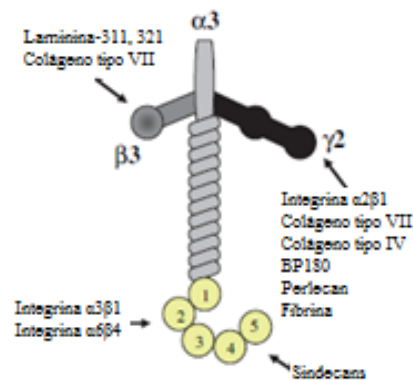
As células, nesse contexto, encontram-se em um ambiente tridimensional estruturalmente complexo, repleto de um conjunto de informações exclusivas para elas. Dessa forma, a mimetização dessas condições *in vitro* é necessária para um maior entendimento das funções celulares, assim como a sua utilização na construção e reparo de órgãos e tecidos danificados (Wheeldon *et al.*, 2011).

#### **1.7.1 Laminina**

As lamininas são moléculas glicoprotéicas compostas de 3 cadeias ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) ligadas por pontes de dissulfeto (Sugawara *et al.*, 2008). Essas proteínas encontram-se apenas em membranas basais e ligam-se a integrinas específicas, bem como a algumas glicoproteínas de células endoteliais, neurônios e células do músculo esquelético, influenciando o

reconhecimento e a diferenciação celular. Diversos estudos demonstram que essa molécula está relacionada não apenas na aderência celular, mas também no espalhamento, migração e estimulação da taxa de crescimento celular, da angiogênese, da cicatrização e do crescimento neuronal (Boccafoschi *et al.*, 2012; Hozumi *et al.*, 2012; Mammadov *et al.*, 2012).

Dentre as proteínas da família laminina, a laminina-332 (isoforma  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) (figura 3), também conhecida como laminina 5, é a principal proteína encontrada na membrana basal da pele (Chiang *et al.*, 2011), sendo fundamental para a migração de queratinócitos na recuperação de lesões cutâneas (Sugawara *et al.*, 2008; Domogatskaya, Rodin e Tryggvason, 2012). Já foi demonstrado anteriormente que a laminina 5 possui forte influência sobre a adesão dos queratinócitos à membrana basal por meio de complexos protéicos de hemidesmossomos (Ghohestani *et al.*, 2001).



**Figura 3:** Estrutura da proteína laminina-332 e os possíveis ligantes das diferentes cadeias. Figura adaptada de Sugawara e colaboradores, 2008.

### 1.8 Desenvolvimento de biomateriais para fins de regeneração cutânea

As interações entre as células individuais, células-vizinhas e a matriz extracelular são responsáveis pelo controle do ambiente celular (Grinnell, 2008). Dessa forma, as células que crescem em monocamadas bidimensionais não conseguem capturar a complexidade de um microambiente *in vivo* (Mazzoleni, Di Lorenzo e Steimberg, 2009). Logo, modelos em monocamadas bidimensionais não somente falham em reproduzir o ambiente complexo e dinâmico de tecidos *in vivo*, mas também podem levar a falsos achados por forçar as células a se adaptarem em uma superfície artificial, plana e rígida. Um crescente número de estudos relatam diferenças em fenótipo, sinalização celular, migração celular e resposta a fármacos

quando as mesmas células são cultivadas em condições bi e tridimensionais (Mazzoleni, Di Lorenzo e Steimberg, 2009).

Nesse sentido, o substituto cutâneo ideal deve seguir os seguintes pré-requisitos (Schulz, Tompkins e Burke, 2000; Metcalfe e Ferguson, 2007; Burd, Ayyappan e Huang, 2009):

- Proteger a ferida e controlar a perda de proteínas e eletrólitos;
- Provocar mínima resposta inflamatória, não ser tóxico e antigênico;
- Prevenir infecções locais e prover um ambiente que acelere a cura da lesão;
- Reduzir a dor e permitir a mobilização celular;
- Ser de fácil manuseio e aplicação ao local lesado;
- Possuir degradação controlada;
- Ser estéril;
- Provocar mínima cicatrização;
- Facilitar a angiogênese;
- Ser seguro em termos de transmissão viral;
- Bom custo-efetividade;
- Estar facilmente disponível.

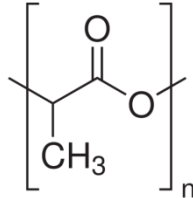
Embora vários substitutos de pele comerciais estejam disponíveis, descobertas sobre técnicas de fabricação de biomateriais e de reguladores de cicatrização de feridas ainda são necessárias, a fim de oferecer um tratamento eficaz para as lesões cutâneas, como no caso das queimaduras.

Logo, a utilização de um matriz, biocompatível e biodegradável, com células-tronco mesenquimais e queratinócitos, colocado na área da lesão, permitiria um maior contato e interação dessas células no local do dano tecidual, o que poderia ser importante para regenerar o tecido lesado, como no caso do defeito cutâneo (Teng *et al.*, 2002).

Na literatura científica, uma grande quantidade de células tem sido testada sobre as matrizes produzidas pelo processo de *electrospinning* (Hohmann *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003; Dersch, Greiner e Wendorff, 2004). Entre elas, células-tronco mesenquimais e neurais, queratinócitos, cardiomiócitos, condrócitos, células musculares lisas, osteoblastos, células endoteliais, entre outras. Com isso, objetiva-se a regeneração de tecidos tais como pele, ossos, cartilagem, sistema nervoso, bem como coração, vasos sanguíneos e tecido pulmonar (Shields *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Pranke *et al.*, 2005).



O polímero usado nesse projeto foi o Poli-D,L-ácido lático (PDLLA) (figura 4), um poliéster biodegradável e biocompatível, de estrutura amorfa (Wang, Chien e Yan, 2009). Já foi demonstrado anteriormente que o PDLLA, puro ou em mistura, suporta o crescimento de diversos tipos celulares (Roether *et al.*, 2002; Blaker *et al.*, 2003; Maquet *et al.*, 2004; Steffens *et al.*, 2013).



**Figura 4:** Ilustração da estrutura do polímero Poli-D,L-ácido lático.

A incorporação da proteína laminina-332 aos *scaffolds* de PDLLA (PDLLA/Lam), promete alcançar resultados positivos em termos de regeneração de pele *in vivo*.

Dessa forma, pretendeu-se por meio da construção de um substituto biocompatível e biodegradável, aliado às vantagens da proteína laminina e das células, como CTMs e queratinócitos, desenvolver um substituto cutâneo que futuramente seja capaz de regenerar lesões cutâneas de pacientes acometidos por queimaduras, por exemplo.

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo principal:**

Desenvolver um substituto para regeneração cutânea *in vivo*.

### **Objetivos específicos:**

- Produzir um biomaterial funcionalizado com a proteína laminina a ser usado como substituto cutâneo;
- Avaliar as propriedades físico-químicas do biomaterial desenvolvido;
- Cultivar células-tronco mesenquimais e queratinócitos nos biomateriais produzidos e avaliar as suas propriedades biológicas;
- Implantar o novo biomaterial produzido, cultivado ou não com células, em modelo animal de lesão de pele para promover a regeneração cutânea;
- Avaliar a resposta ao uso do novo biomaterial *in vivo* como um novo substituto de pele.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Produção e funcionalização de *scaffolds*

A construção de biomateriais (matrizes) poliméricos biodegradáveis para a adesão das células foi realizada pelo método de *electrospinning*. O biomaterial foi desenvolvido com dois diferentes diâmetros de fibras e, para tanto, duas soluções poliméricas foram utilizadas: 1) solução de PDLLA (peso molecular 75.000-120.000) (Sigma-Aldrich®) em clorofórmio (Nuclear), na concentração de 30% (m/V) e 2) solução de PDLLA (peso molecular 75.000-120.000) (Sigma-Aldrich®) em dimetilformamida (Dinâmica®) e tetrahidrofurano (Vetec) (1:1), na concentração de 25% (m/V). Ambas as soluções ficaram sob agitação, *overnight* e à temperatura ambiente. Para a execução do *electrospinning* (Instor), a distância entre a agulha e a placa coletora foi de aproximadamente 20 cm para ambas as soluções. Para a solução 1, utilizou-se agulha com diâmetro interno de 0,7 mm, fluxo de 1 mL/h e tensão elétrica de 20 kV. Já para a solução 2, utilizou-se agulha com diâmetro interno de 0,45 mm, fluxo de 1,25 mL/h e tensão elétrica de 20 kV. A temperatura para a fabricação dos *scaffolds* foi de aproximadamente 20°C. Para o desenvolvimento da bicamada de *scaffold*, as fibras da solução 2 foram formadas de modo a ficarem na superfície superior da matriz. Ainda, para a produção das matrizes, as fibras da solução 1 foram produzidas por 5 minutos, enquanto para a produção das fibras grossas, o tempo determinado de eletrofiação foi de aproximadamente uma hora.

Após a produção das matrizes, três grupos de *scaffolds* foram desenvolvidos: 1) PDLLA, conforme descrito acima, sem nenhuma alteração; 2) PDLLA/NaOH, matriz de PDLLA com posterior hidrólise da superfície das fibras e 3) PDLLA/Lam, matriz de PDLLA, com posterior hidrólise da superfície das fibras e ligação da proteína laminina.

Realizada a produção das matrizes pela técnica de *electrospinning*, os biomateriais foram mantidos em dessecador fechado à vácuo até o momento da realização da hidrólise e ligação da proteína laminina. Todos os procedimentos foram realizados no laboratório de Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

A espessura dos biomateriais foi aferida por meio da utilização de micrômetro digital (Mitutoyo).

##### 3.1.1 – Hidrólise da superfície das matrizes

Para a hidrólise da superfície dos biomateriais, três diferentes concentrações de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) foram testadas, 0,5 M, 0,75 M e 1 M, em quatro

diferentes tempos de imersão, 10, 15, 30 e 60 minutos para cada concentração. Os *scaffolds* foram imersos em solução de NaOH e, após o tempo determinado, a solução foi retirada. Posteriormente, quatro lavagens sucessivas com água Milli-Q foram realizadas (Kim *et al.*, 2010; Zander *et al.*, 2012). Em seguida, os *scaffolds* foram secos em estufa a vácuo, por 24 horas, à temperatura de 40°C.

### 3.1.2 – Ligação da proteína laminina nas matrizes

Após a realização da hidrólise e secagem das matrizes, solução de etil (dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich®) e de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich®) a uma concentração de 5 mg/mL (m/V) em água destilada foi colocada sobre as mesmas. Para isso, foram utilizados 500 µL da solução de EDC/NHS por matriz em poços de placas de 24 poços. Essa solução foi deixada por um período de 60 minutos à temperatura ambiente em contato com as matrizes. A seguir, 500 µL da solução de laminina (Laminina 332, BioLamina®) 10 µg/mL em solução tampão de fosfato (PBS) foi adicionada aos *scaffolds* (Rho *et al.*, 2006; Boccafosci *et al.*, 2012). A solução de laminina foi mantida por 24 horas a 4°C. Paralelamente, foi estudado um outro grupo de adsorção onde, após a hidrólise das matrizes, a solução de laminina foi adicionada sob as mesmas condições dos grupos anteriores, porém sem a adição da solução de EDC/NHS. Transcorridas 24 horas de incubação, retirou-se a solução de laminina dos grupos e foram realizadas duas lavagens com PBS.

#### 3.1.2.1 – Detecção da incorporação da proteína laminina

A detecção da incorporação da laminina foi realizada através de imunofluorescência. Para isso, inicialmente, uma solução de albumina sérica bovina (BSA) 3% (m/V) (Sigma-Aldrich®) em PBS foi adicionada às matrizes, por uma hora, à temperatura ambiente, a fim de eliminar a ligação inespecífica do anticorpo primário. Após a retirada dessa solução, o anticorpo monoclonal anti-laminina (Sigma-Aldrich®) diluído na solução de BSA (1:200) foi adicionado e mantido em contato com as matrizes, *overnight*, à 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário Alexa-Fluor® 568 (Invitrogen®), diluído em solução tampão de PBS (1:1.000) durante 1 hora à temperatura ambiente, protegido da luz (Kim *et al.*, 2010). Após procedidas duas lavagens com PBS, a microscopia confocal foi utilizada para a observação da incorporação da proteína.

Para verificar a ligação covalente da laminina nas fibras, a lavagem das mesmas foi realizada com solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% (Sigma-Aldrich®) em PBS. As matrizes foram deixadas sob agitação em agitador de microplacas por 30 minutos, à

temperatura ambiente e com proteção da luz (Zander *et al.*, 2012). A verificação da manutenção da ligação das proteínas às matrizes foi realizada por microscopia confocal (Olympus FV1000), no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

As amostras foram preparadas em triplicata para ambos os testes e repetidas ao menos 2 vezes.

### **3.2 - Obtenção e cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs)**

#### **3.2.1 - Obtenção de células de polpa de dentes decíduos humanos**

Os dentes decíduos humanos utilizados nos experimentos foram obtidos da Faculdade de Odontologia da UFRGS, após assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente ou responsável e aprovação no Comitê de Ética (CAAE nº 28783914.9.0000.5347). Em seguida, os dentes foram levados para o laboratório de Células-tronco da Faculdade de Farmácia para continuação dos experimentos.

Para o isolamento das células, a polpa foi separada cuidadosamente do tecido dentário, com o auxílio de uma colher de dentina, no fluxo laminar. Na sequência, a manipulação do tecido pulpar removido foi realizada semelhante ao processamento descrito por Bernardi e colaboradores (Bernardi *et al.*, 2011). Resumidamente, a polpa dos dentes foi mantida em contato com a solução de colagenase a 0,2% (Gibco®) por 60 minutos e, em seguida, após a centrifugação a 800g por 10 minutos, a suspensão de células resultante foi semeada em 1 poço de uma placa de cultivo de 12 poços, em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich®), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco).

A cultura foi mantida em incubadora umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 72 h, quando as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas de meio subsequentes foram realizadas a cada 3-4 dias.

Após a subconfluência, a cultura primária foi lavada uma vez com PBS. Uma solução de 0,25% de tripsina em solução de Hank's (Sigma-Aldrich®) foi utilizada e as células foram incubadas por no máximo 10 min, a 37°C. As células foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas para novas garrafas de cultivo celular. Passagens celulares subsequentes foram realizadas de forma semelhante. As passagens (sub-culturas) foram realizadas quando a cultura atingiu uma confluência de, pelo menos, 90%.

### **3.3 - Caracterização das células-tronco mesenquimais**

#### **3.3.1 - Análise morfológica das culturas celulares**

A presença das células aderentes e a sua confluência foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Olympus, durante as culturas de células-tronco.

#### **3.3.2 - Análise imunofenotípica das células cultivadas**

As CTMs foram caracterizadas imunofenotipicamente através da presença de marcadores de células mesenquimais e ausência de células hematopoéticas, através de citometria de fluxo. As CTMs foram analisadas na quinta passagem da cultura celular.

Os anticorpos utilizados foram os específicos para identificar os marcadores de CTMs, tais como CD29, CD44, CD73, CD90 e STRO-1, bem como confirmação da ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas, como CD14, CD34, CD45 CD184 e HLA-DR. A presença das moléculas foi avaliada utilizando-se 2 µL de anticorpo monoclonal anti-humano (Pharmlingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) para cada uma das moléculas. O 7AAD (7-Amino Actinomycin D) (Molecular Probes, Eugene) foi utilizado como critério de exclusão, para permitir a avaliação apenas de células vivas.

Após a incubação com os anticorpos durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. O 7AAD foi utilizado a uma concentração final de 1 µg/mL em PBS e incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Aria III (BD Biosciences), no laboratório do Instituto de Pesquisa com Células-tronco, localizado no Instituto de Ciências Básicas e da Saúde da UFRGS. O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos PE (do inglês *phycoerythrin* - ficoeritrina) e FITC (do inglês *fluorescein isothiocyanate* - isotiocianato de fluoresceína). A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se em torno de 10.000 eventos de cada amostra, e a análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva versão 6.0 (BD Biosciences).

#### **3.3.3 - Diferenciação celular *in vitro***

A diferenciação em tipos celulares mesenquimais, necessária para confirmação da identidade da população obtida, foi testada a partir da quinta passagem. Ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados seguindo protocolos

já descritos por Meirelles e Nardi (Silva Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006) e Secco e colaboradores (Secco *et al.*, 2008).

### **3.3.3.1 - Diferenciação osteogênica**

Para a diferenciação osteogênica, realizou-se o cultivo celular por 3 a 4 semanas em meio contendo soro fetal bovino (10%), dexametasona ( $10^{-8}$  M), ácido ascórbico 2-fosfato (5  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $\beta$ -glicerofosfato (10 mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S em pH 4,2.

### **3.3.3.2 - Diferenciação adipogênica**

Para a diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais, realizou-se o cultivo celular por 3 a 4 semanas em meio IMDM contendo 20% de plasma humano, dexametasona ( $10^{-7}$  M), insulina (2,5  $\mu\text{g/mL}$ ), indometacina (5 $\mu\text{M}$ ), rosiglitazona (5 $\mu\text{M}$ ) e heparina sódica (10 unidades/mL). Os adipócitos foram discernidos por observação ao microscópio com contraste de fase e/ou por coloração com o corante Oil Red O.

### **3.3.3.3 - Diferenciação condrogênica**

Para a diferenciação condrogênica, as células aderentes foram cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias. O meio foi constituído de DMEM e suplementado com 15 mM HEPES, 6,25  $\mu\text{g/mL}$  de insulina, 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 e 50 nM da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (ASAP). A condrogênese foi demonstrada pela coloração com *Alcian Blue*.

Todos os meios de cultivo foram trocados a cada 3-4 dias e as células foram fixadas com 4% paraformaldeído, sendo após realizada a coloração específica.

## **3.4 - Obtenção de queratinócitos**

As suspensões de células foram obtidas a partir de fragmentos de pele provenientes de cirurgias de retirada de excesso de mama realizadas no Hospital das Clínicas em São Paulo. A coleta somente foi realizada após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente e aprovação do projeto no Comitê de Ética (CAAE nº 28783914.9.0000.5347). Esses fragmentos foram desprovidos de tecido subcutâneo para a separação de células, utilizando uma série enzimática de tripsina e solução de EDTA (0,05%/0,02%) (Gibco). Esse procedimento foi realizado no laboratório de cultivo celular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

As células foram plaqueadas a uma densidade de  $5 \times 10^6$  células, em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. As culturas celulares foram mantidas inicialmente com uma mistura de 60% de DMEM (Gibco), 30% de Ham F12 (Gibco) e 10% de soro fetal de bovino (Hyclone), suplementado com 4 mM de L-glutamina (Gibco), 0,18 mM de adenina (Sigma Aldrich), insulina 5 µg/mL (Sigma Aldrich), 0,4 µg de hidrocortisona/mL (Sigma Aldrich), 0,1 nM de toxina da cólera (Sigma Aldrich), 2 nM de tri-iodotironina (Sigma) e 100 UI/mL de penicilina com 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). As garrafas de cultura foram mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37 °C. Na primeira mudança de meio, o mesmo foi ainda suplementado com 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma Aldrich) e depois trocado a cada 48 horas.

Como camada de sustentação, foram utilizados os fibroblastos da linhagem CCL-92 irradiados a 60Gy, obtidos da ATCC. Ao atingir o número de células adequadas, as células foram soltas da garrafa de cultivo por tratamento enzimático com tripsina a 0,05%, em solução de EDTA 0,02% (Gibco), para serem utilizadas nos experimentos (Rheinwald e Green, 1974; Tanikawa *et al.*, 2010). Para os experimentos, foram utilizados queratinócitos a partir do isolamento até a terceira passagem.

### **3.5 - Propriedades químicas das matrizes**

#### **3.5.1 - Morfologia**

A morfologia das matrizes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV modelo JEOL - JSM 6060), no CME-UFRGS. Para isso, as fibras foram inicialmente coletadas sobre lamínulas de vidro e, em seguida, metalizadas com deposição de platina. Para a visualização em MEV, as lamínulas já metalizadas foram dispostas sobre *stubs* e as fotografias obtidas em diversos aumentos.

As imagens por MEV foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 kV e faixa de magnificação de 300 a 20.000 vezes. Para tal análise, foram analisadas 3 fotomicrografias de 3 amostras diferentes de cada tipo de material.

#### **3.5.2 - Diâmetro das fibras**

Foram analisadas 3 fotomicrografias de cada grupo, sendo que cada uma das amostras de um mesmo grupo foi produzida em diferentes dias e submetida aos mesmos parâmetros durante o *electrospinning*. Os diâmetros das fibras foram avaliados por meio da leitura de 60 fibras em diferentes campos de uma mesma amostra, utilizando três amostras produzidas em



dias diferentes e, posteriormente, analisadas pelo software *ImageJ 1.38x*. A média obtida foi definida como o diâmetro médio característico de cada amostra.

### **3.5.3 - Ângulo de Contato**

A análise de ângulo de contato foi realizada em duas amostras para cada concentração de NaOH (0,5M, 0,75M e 1M) nos diferentes tempos de imersão (10, 15, 30 e 60 minutos). Para essa medida, uma gota de água foi instilada sobre a superfície dos *scaffolds*, em três locais diferentes, para cada amostra e, em seguida, uma imagem foi obtida. Para o grupo de NaOH 0,75M e 15 minutos, a imagem foi obtida em dois momentos diferentes: 0 e 30 segundos. A medida dos ângulos de contato foi realizada no equipamento Krüss – DSA30, no Instituto de Química da UFRGS. O resultado foi obtido pela média das medidas de 3 amostras para cada tipo de material, com 3 medidas de ângulo de contato em cada amostra. Os resultados foram apresentados como média±desvio padrão.

### **3.5.4 – Tamanho de poro**

O tamanho de poro foi determinado usando-se as imagens de MEV seguindo os achados de Hussain e colaboradores (Hussain *et al.*, 2010). Nesse estudo, esses pesquisadores determinaram que em média o diâmetro do poro das matrizes produzidas por *electrospinning* é 6 vezes maior que o diâmetro das fibras dessa matriz (Hussain *et al.*, 2010).

### **3.5.5 - Degradabilidade**

As amostras das matrizes foram deixadas sob agitação a 100 rpm, à 37°C, em PBS, durante períodos de 0 (matriz não submetida ao teste de degradabilidade), 7, 14, 30 e 60 dias, com trocas da solução a cada 3-4 dias.

Após os períodos supracitados, os biomateriais foram secos usando calor seco a 37°C e, em seguida, realizada a determinação da massa molecular ponderal (Mw) do polímero por meio da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC), em um cromatógrafo Viscotek VE 2001, equipado com detector de índice de refração e calibrado com padrões de poliestireno, no Instituto de Química da UFRGS. Para as análises, pelo menos 10 mg de cada amostra foram dissolvidas em 2 mL de tetrahydrofurano (THF) e filtrada antes de ser injetada no equipamento. As análises foram realizadas em duas amostras diferentes para cada período de incubação e os resultados apresentados através do cálculo da média dos dados obtidos.

### 3.6 - Propriedades biológicas das matrizes de nanofibras

Para a realização dos testes descritos a seguir, as matrizes poliméricas foram utilizadas afixadas em lamínulas de vidro com 1,5 cm de diâmetro. As lamínulas foram distribuídas em poços de placas de cultivos celulares de 24 poços e previamente esterilizadas por luz ultravioleta (524 nm), por 120 minutos, em capela de fluxo laminar. Em todos os casos, a esterilização ocorreu antes da incorporação da laminina.

As CTMs e os queratinócitos foram co-cultivados em todos os grupos de *scaffolds*. Inicialmente, 100.000 CTMs em 100  $\mu$ L de meio de cultura foram cultivadas na parte inferior dos *scaffolds* (lado com fibras mais grossas), dispostos em poços de placas de 24 poços. Após 24 horas, 100.000 queratinócitos em em 100  $\mu$ L de meio de cultura foram cultivados no outro lado dos *scaffolds*, o lado superior (lado com fibras mais finas). Utilizou-se um anel de aço inoxidável com 1 cm de diâmetro sobre a região central das matrizes, a fim de assegurar que as células fossem semeadas na mesma região em ambos os lados dos biomateriais. Também foram utilizados anéis de borracha, circundando as matrizes poliméricas para garantir a sua aderência ao fundo da placa de cultivo e também impedir o extravazamento de meio para a região das bordas dos *scaffolds*.

Após o cultivo padrão durante 7 dias, os biomateriais com CTMs e queratinócitos em proliferação foram levantados para uma interface ar-líquido, estabelecida com redes de aço inoxidável. Dessa forma, meio de cultura suficiente foi adicionado aos poços para manter as matrizes em contato com o meio e os queratinócitos expostos ao ar (figura 5). O cultivo celular foi continuado durante um período adicional de 14 dias.



**Figura 5:** Exemplificação do sistema de cultura ar-líquido.

Cinco diferentes culturas primárias de cada tipo de células foram utilizadas nos experimentos e os mesmos foram realizados em triplicata.

### 3.6.1 – Ensaios de adesão e viabilidade celular

A adesão e a viabilidade celular foram realizadas utilizando-se o reagente WST-8 (Sigma-Aldrich®), no laboratório de cultivo celular do IPEN. O reagente WST-8 foi adicionado no momento da análise e deixado em contato com as células durante 1 hora, de acordo com as instruções do fabricante. Após isso, a leitura por espectrofotometria foi realizada com a solução analisada, em 460 nm, em leitor de placas (Spectramax®). Um grupo controle, que consistiu de células cultivadas diretamente nos poços de cultivo, também foi avaliado pelo ensaio de WST-8. A adesão celular foi avaliada 6 horas após a semeadura dos queratinócitos de pele sobre os *scaffolds*. Onze diferentes culturas de CTMs e queratinócitos foram utilizadas para essa análise, conforme descrito a seguir: 1) controle de CTMs, o qual consistiu de CTMs cultivadas diretamente nos poços da placa de cultivo 24 horas antes da cultura dos queratinócitos; 2) controle de queratinócitos (K), consistindo de queratinócitos cultivados diretamente nos poços da placa de cultivo; 3) PDLLA + CTMs, 4) PDLLA/NaOH + CTMs, 5) PDLLA/Lam + CTMs, que consistiu nos *scaffolds* onde as CTMs foram cultivadas um dia antes do cultivo de queratinócitos; 6) PDLLA + K, 7) PDLLA/NaOH + K, 8) PDLLA/Lam + K, composto pelos biomateriais em que somente os queratinócitos foram cultivados; 9) PDLLA + CTMs + K, 10) PDLLA/NaOH + CTMs + K, 11) PDLLA/Lam + CTMs + K, que consistiu nos biomateriais onde as CTMs foram semeadas e, após 24 horas, os queratinócitos foram cultivados no outro lado das matrizes.

A viabilidade celular foi avaliada 7, 14 e 21 dias após o processo de semeadura dos queratinócitos para os seguintes grupos: 1) controle de CTMs, 2) controle de K, 3) PDLLA + CTMs + K, 4) PDLLA/NaOH + CTMs + K e 5) PDLLA/Lam + CTMs + K.

A fim de assegurar a análise das células que estavam somente aderidas aos *scaffolds*, excluindo resultados de células que ocasionalmente estivessem aderidas aos poços de cultura, os biomateriais foram transfeitos para outra placa de cultura no momento da realização do teste de WST-8.

### 3.6.2 - Análise histológica

Para verificação da disposição das células nos biomateriais, após os 21 dias de cultivo, as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, *overnight* e lavadas com PBS. Em

seguida, elas foram coradas com hematoxilina/eosina e criopreservadas em sacarose 15% (m/V), por 24 horas e, após, em sacarose 30% (m/V), até o processamento para a análise histológica (Tanikawa *et al.*, 2010). As secções foram realizadas em criostato (Leica) com uma espessura de 30 micrometros. As lâminas foram então montadas e as fotografias foram obtidas com ampliação de 20 vezes utilizando-se o microscópio ótico Nikon Eclipse Ti-S, no laboratório do IPCT na UFRGS.

A análise histológica foi realizada em todos os experimentos celulares realizados (n=5), em triplicata.

### **3.6.3 – Verificação do co-cultivo de células-tronco mesenquimais e queratinócitos**

Para verificar a presença de CTMs e queratinócitos nos biomateriais, as CTMs isoladamente foram previamente coradas com o corante Mini-26 (Cell PKH26 Red Fluorescent Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling – Sigma Aldrich). Após 3 dias, o mesmo procedimento descrito acima foi realizado para a co-cultura de CTMs e queratinócitos. Transcorridos 7, 14 e 21 dias, as matrizes com as células foram fixadas em formalina a 10% e coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich®). Depois disso, os biomateriais com as células foram criopreservados em sacarose 15% (m/V), por 24 horas e, após, em sacarose 30% (m/V) por, pelo menos, 24 horas. As secções foram realizadas em criostato (Leica) com espessura de 30 micrometros. Por fim, as lâminas foram montadas e as fotografias foram obtidas com ampliação de 20 vezes utilizando o microscópio ótico Nikon Eclipse Ti-S, no laboratório do IPCT na UFRGS. Esse teste foi realizado uma única vez, em triplicata.

## **3.7 - Experimentos *in vivo***

### **3.7.1 - Incorporação das células nos *scaffolds* para implante nos modelos animais**

Para os experimentos *in vivo*, o cultivo celular foi realizado por 7 dias, em imersão em meio de cultura, seguindo o mesmo esquema de co-cultivo celular previamente descrito.

A utilização de células humanas em biomateriais para posterior aplicação em camundongos foi aprovada pela Plataforma Brasil (Nº CAAE 28783914.9.0000.5347, aprovado em 15/05/2014). A experimentação animal também foi aprovada pelo CEUA IPEN-São Paulo (No. 131/14, aprovado em 28/01/2014).

#### **3.7.1.1 – Verificação da incorporação das células nos *scaffolds***

Para verificar a presença e a morfologia das diferentes células nos *scaffolds* no momento da aplicação nos animais, as amostras foram avaliadas por microscopia confocal.

Para isso, 3 amostras de biomateriais de PDLA e 3 amostras de biomateriais de PDLA/Lam foram fixadas com paraformaldeído por 1 hora, à temperatura ambiente. Após, uma solução de PBS/Triton (0,1%) (Invitrogen®) foi deixada em contato com os biomateriais por 30 minutos. Em seguida, solução de faloidina/rodamina (200µg/mL) em PBS/triton foi adicionada aos poços contendo os biomateriais, por 40 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Depois da solução ser retirada, o corante DAPI foi adicionado para a marcação dos núcleos celulares, por 1 minuto, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Sucessivas lavagens foram realizadas e os biomateriais contendo células marcadas foram mantidos refrigerados e ao abrigo da luz, até a realização das análises.

### **3.7.2 - Avaliação da capacidade das células-tronco mesenquimais e dos queratinócitos integrados em matrizes de fibras promoverem a regeneração de pele em modelo animal de defeito cutâneo**

Para o experimento *in vivo* foram utilizados 28 camundongos *nude*, com idade média de dez semanas e peso médio de 30 gramas. Os camundongos foram obtidos do biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em São Paulo.

No período pré-cirúrgico, os animais foram acondicionados durante 7 dias em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais por caixa), sendo alimentados com ração e tendo livre acesso à água, com ciclos diurnos e noturnos (12h/12h) e temperatura de 22±2°C. As gaiolas utilizadas possuíam medidas de 30x20x13 cm e eram limpas semanalmente.

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com quetamina (1,16 g/10 mL) e xilasina (2,3 g/100 mL), associadas e diluídas em soro fisiológico (1 mL de quetamina + 1 mL de xilasina para 8 mL de soro fisiológico). Foram utilizadas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, de quetamina e xilazina por animal (recomendado pelo *Institutional Animal Care and Use Committees – IACUC, USA*), via intraperitoneal e, após, em condições de anestesia, um defeito no dorso de 1.0 x 1.0 cm foi produzido através da excisão com tesoura cirúrgica, removendo a pele até a fáscia muscular, sob condições e observância das técnicas cirúrgicas (severidade moderada, segundo CEUA-UFRGS). Esse defeito cutâneo simula uma queimadura de terceiro grau (figura 6).



**Figura 6:** Fotografia da lesão realizada nos animais para implante do biomaterial.

O defeito cutâneo foi imediatamente recoberto pelas matrizes produzidas pela técnica de *electrospinning*. O tamanho da matriz utilizada correspondeu ao defeito cutâneo realizado de 1,0 cm x 1,0 cm, com aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de espessura. Os *scaffolds* foram fixados à pele normal adjacente com sutura, utilizando-se fio mononylon 6-0, modelo descrito por Leonardi e colaboradores (Leonardi *et al.*, 2012). Nenhum curativo adicional foi utilizado sobre o enxerto, visto que o próprio *scaffold* com as células já funciona com uma barreira, protegendo a ferida (Powell, Supp e Boyce, 2008; Leonardi *et al.*, 2012; Akinbingol *et al.*, 2013).

Para os experimentos, os animais foram alojados no biotério do IPEN. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas separadas, seguindo as mesmas condições citadas anteriormente, em relação a ciclos diurnos e noturnos e acesso à ração e água.

Além disso, os animais receberam uma solução salina contendo o analgésico tramadol na concentração de 10 mg/kg, via subcutânea, logo após o implante dos *scaffolds* e a cada 12 horas após a cirurgia, durante um dia.

Decorrido um período de 9 dias, os animais foram eutanasiados por meio de indução anestésica, utilizando os mesmos anestésicos e diluições citadas anteriormente, porém em dose 3 vezes superior à anestésica. Todos os animais foram igualmente submetidos ao mesmo padrão de eutanásia (grau de severidade – sem recuperação). A eutanásia foi realizada por técnico treinado e em local separado dos demais animais.

## Grupos

Os seguintes grupos foram estudados, compreendendo 6 animais por grupo, com exceção do grupo 1 e 6, onde somente 4 animais foram utilizados.

**Grupo 1:** Lesão: animais com lesão, onde gaze cirúrgica foi utilizada como material de cobertura;

**Grupo 2:** Controle Laminina: animais onde o *scaffold* de PDLLA/Lam foi implantado, sem células;

**Grupo 3:** Controle PDLLA: animais onde o *scaffold* de PDLLA foi implantado, sem células;

**Grupo 4:** Teste Laminina: animais onde o *scaffold* de PDLLA/Lam foi implantado, com células (CTMs e queratinócitos);

**Grupo 5:** Teste PDLLA: animais onde o *scaffold* de PDLLA foi implantado, com células (CTMs e queratinócitos).

**Grupo 6:** Controle sadio: 4 animais pertencentes a outros grupos foram aleatoriamente selecionados e a pele destes foi retirada em locais onde não havia lesão cutânea, também no dorso do animal. Utilizados somente para os testes de histologia e expressão gênica.

O número de replicatas que será utilizada para experimentação animal foi baseado em dados da literatura (Guthrie *et al.*, 2012; Michael *et al.*, 2013). Em geral, na literatura científica, esse número é usado para verificar variações de resultados de histologia e imunohistoquímica entre os animais, onde análise estatística nem sempre são aplicadas.

### 3.7.3 – Análise da regeneração cutânea

Após a eutanásia, todos os animais foram fotografados à uma distância padronizada (câmera Sony) e por meio do *software ImageJ* 1.38x foi realizada a medida de tamanho da lesão dos animais, ainda com a crosta sobre a ferida em processo de regeneração.

Além disso, um fragmento contendo a transição pele-enxerto e enxerto foi removido de cada animal. Uma parte do fragmento foi fixada em formalina 10% tamponado (pH=7,4), por 24 horas. Em seguida, consecutivamente, a peça biológica permaneceu por 24 horas em solução de sacarose 15% e, após, em solução de sacarose 30%, até o congelamento em solução de congelamento para criostato, com trocas de sacarose a cada 2 dias. A outra metade do material biológico foi imediatamente colocada em TRIzol® (Life Technologies) e congelada a -80°C até a extração de RNA.

No dia da eutanásia, um fragmento de pele sadia, retirada do dorso de animais dos demais grupos, também foi coletado, perfazendo o grupo controle sadio (Grupo 6) (4 animais). Esse fragmento foi processado conforme descrito no parágrafo anterior.

A partir de cada peça fixada em formalina 10%, 2 lâminas foram confeccionadas, cada uma com cinco secções de quinze micrometros obtidas no criostato. Ambas peças biológicas foram coradas com hematoxilina-eosina para a avaliação histológica, no laboratório do IPCT-UFRGS.

#### **3.7.4 - Verificação da expressão gênica**

O RNA total para todos os grupos analisados foi extraído usando o reagente TRizol® (Invitrogen), após os 9 dias de experimentação animal. A seguir, todas as amostras de RNA foram quantificadas e a sua pureza analisada por meio de espectrofotometria (Nanodrop). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a síntese do cDNA, as eficiências de reação para todos os *primers* utilizados foram determinadas, otimizando os parâmetros de modo que as eficiências ficassem entre 95 e 105%. Para a determinação de GAPDH e Col1a, utilizou-se 10 µL de mix de SYBR *green*, 1 µL de mix de *primer*, 0,5 µL de ROX, 1 µL de BSA, 6,5 µL de água e 1 µL de cDNA, totalizando 20 µL por reação. Para os outros *primers*, utilizou-se 10 µL de mix de SYBR *green*, 0,8 µL de mix de *primer*, 0,5 µL de ROX, 1 µL de BSA, 6,7 µL de água e 1 µL de cDNA, totalizando 20 µL por reação. A análise foi realizada em equipamento StepOnePlus (Life Technologies). As condições de reação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Curva de *melting* foi realizada para todas as reações a fim de assegurar a homogeneidade do produto amplificado. A análise de expressão gênica foi realizada no laboratório do IPCT-UFRGS

O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como gene normalizador de todos os genes alvos. Dessa forma, os resultados foram expressos como expressão gênica relativa dos grupos e as reações foram realizadas em triplicata.

A quantificação relativa de mRNA foi determinado pelo método  $\Delta\Delta C_T$ . Os *primers* foram desenhados para os alvos em camundongo (*Mus musculus*) e estão descritos na Quadro 1.



Quadro 1: *Primers* utilizados para o PCR em tempo real.

<b>Primer</b>	<b>Sequência <i>Forward</i></b>	<b>Sequência <i>Reverse</i></b>
<b>GAPDH</b> (Utikal <i>et al.</i> , 2009)	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<b>Col1a1</b> (Song, Zhu e Li, 2013)	GGTCTTGGTGGTTTTGTATTCG	AACAGTCGCTTCACCTACAGC
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b> (Sultan <i>et al.</i> , 2012)	TATTTGGAGCCTGGACACAC	CTTGCGACCCACGTAGTAGA
<b>SDF-1</b> (Sultan <i>et al.</i> , 2012)	GTCTAAGCAGCGATGGGTTC	GAATAAGAAAGCACACGCTGC
<b>VEGF</b> (Qiang <i>et al.</i> , 2014)	TGTACCTCCACCATGCCAAGT	TGGAAGATGTCCACCAGGGT
<b>BAX</b> (Rekha e Selvakumar, 2014)	CACAGCGTGGTGGTACCTTA	TCTTCTGTACGGCGGTCTCT
<b>Bcl-2</b> (Rekha e Selvakumar, 2014)	TCGCAGAGATGTCCAGTCAG	ATGCCGGTTCAGGTACTIONCAG

### 3.8 - Análise Estatística

Inicialmente, todos os dados obtidos foram analisados quanto à sua normalidade a fim de verificar a necessidade de testes paramétricos ou não-paramétricos para as comparações.

Para as análises de adesão celular, tamanho da lesão *in vivo*, expressão gênica e testes físico-químicos (quando aplicável) foi realizado o teste *one-way* ANOVA, seguido pelo *post hoc* Tukey. Já para os testes de viabilidade celular, teste de medidas repetidas seguido por *post hoc* Tukey foi utilizado.

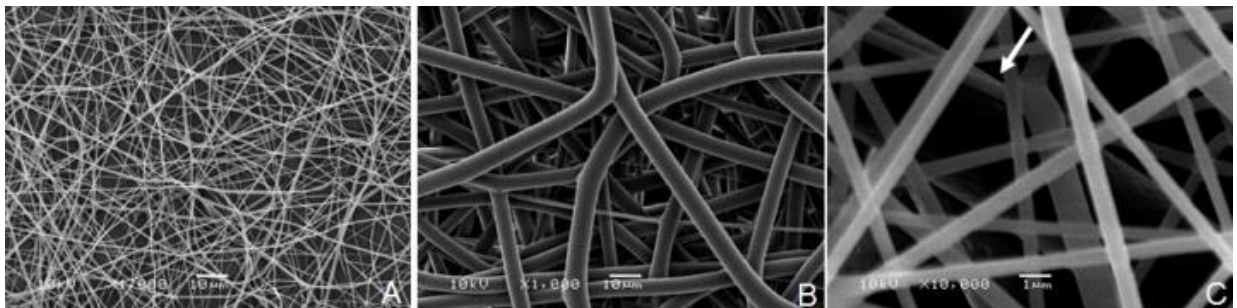
O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 16.0 – SPSS, Chicago, IL, USA) e o nível de significância adotado no estudo foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análises físico-químicas dos biomateriais

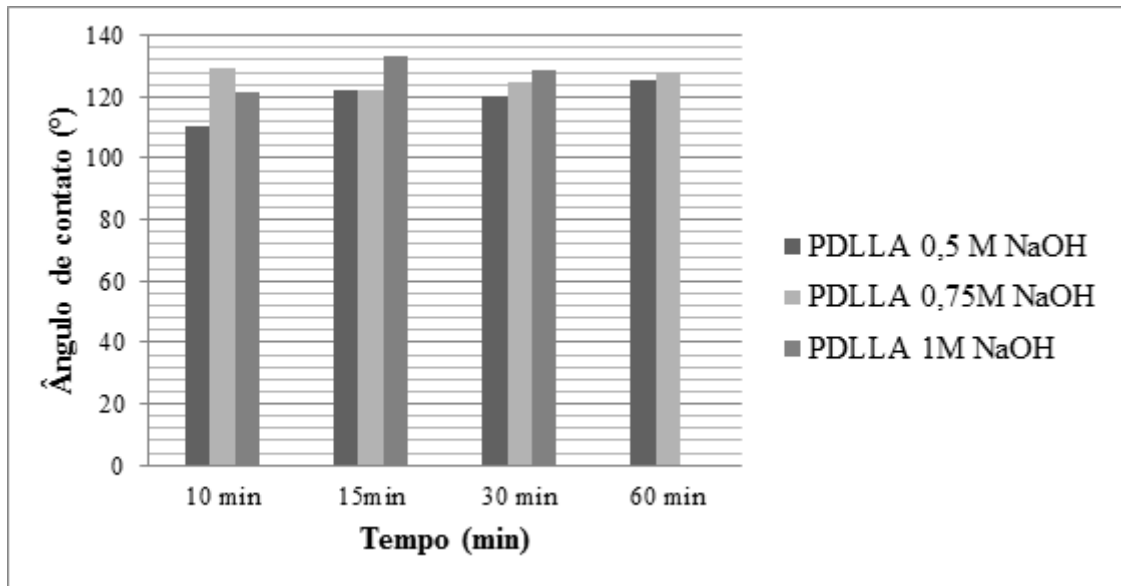
Os *scaffolds* desenvolvidos apresentaram fibras bem formadas e aleatoriamente distribuídas quando observadas em microscópio eletrônico de varredura (figura 7). Na figura 7A pode-se observar as fibras finas, enquanto que na figura 7B observam-se as fibras grossas. Ainda, é possível visualizar na figura 7C ambos os tipos de fibras (finas e grossas) justapostas, demonstrando a construção do biomaterial com fibras de dois diâmetros diferentes.

As matrizes obtidas resultaram em aproximadamente 150 a 200  $\mu\text{m}$  de espessura.



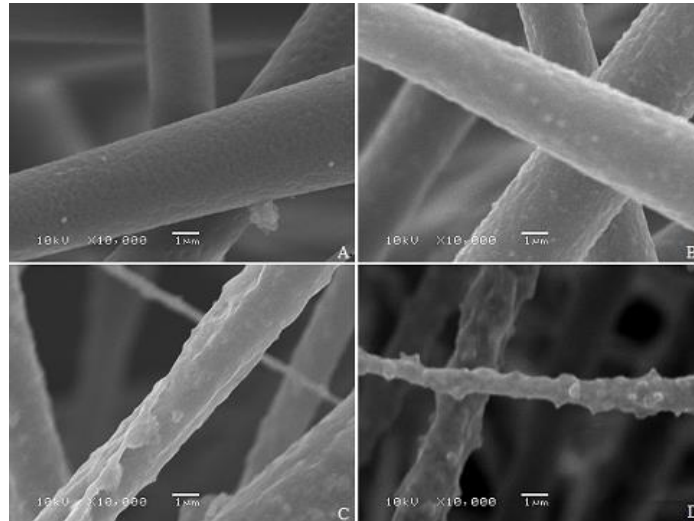
**Figura 7:** A) Fibras finas em magnificação de 1.000x. B) Fibras grossas em magnificação de 1.000x. C) Fibras finas e grossas (seta, ao fundo da imagem) justapostas em 10.000x de magnificação.

Seguindo o desenvolvimento dos biomateriais, a hidrólise da superfície das fibras das matrizes foi testada em diferentes concentrações de solução de NaOH e em diferentes tempos. Nesse sentido, foram realizadas as análises de hidrofobicidade das matrizes após a hidrólise. A medida de ângulo de contato do grupo controle, não exposto a tratamento com solução de NaOH, foi de  $130,83^\circ$ . Com relação às outras concentrações e períodos de tempos, todas as matrizes ficaram com ângulos entre  $110$  e  $133^\circ$ , como pode ser observado na figura 8. Não houve diferença estatística entre as matrizes ( $p=0,247$ ). O grupo testado com NaOH 1M 60 minutos apresentou-se visualmente deteriorado pela ação da solução alcalina e não houve formação de gota na sua superfície quando submetido ao teste com goniômetro.



**Figura 8:** Medidas de ângulo de contato. Não houve formação de gota na matriz que foi tratada com NaOH 1 M no tempo de 60 minutos.

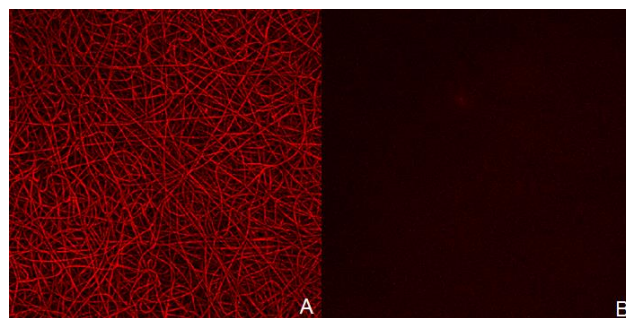
Para verificação da morfologia das matrizes submetidas ao tratamento alcalino, análises de MEV foram realizadas. Na figura 9 estão demonstradas as matrizes tratadas com NaOH 0,75M. Essas matrizes foram selecionadas para observação por microscopia eletrônica de varredura por visualmente apresentarem a melhor molhabilidade e menor deterioração. As matrizes tratadas por 10 minutos, ao serem observadas pela MEV, não apresentaram alterações quando comparadas ao grupo sem tratamento, entretanto visualmente também não apresentaram molhabilidade aparente (dados não mostrados). Como pode ser observado na figura 9, quinze minutos de tratamento com solução alcalina não afetaram substancialmente a estrutura das fibras. O contrário ocorreu com os tratamentos por 30 e 60 minutos, onde houve uma diminuição do diâmetro das fibras, assim como perceptível deterioração das mesmas. Além disso, 60 minutos de tratamento alcalino afetaram visualmente a estrutura dos *scaffolds*, com ruptura de algumas partes das matrizes.



**Figura 9:** Efeitos do tratamento da solução de NaOH 0,75M sobre os *scaffolds*: A) Grupo controle (não submetido à hidrólise), B) 15 minutos, C) 30 minutos e D) 60 minutos de tratamento.

Para os demais testes realizados a partir desse momento, a hidrólise das matrizes foi realizada com a solução de NaOH 0,75M por 15 minutos.

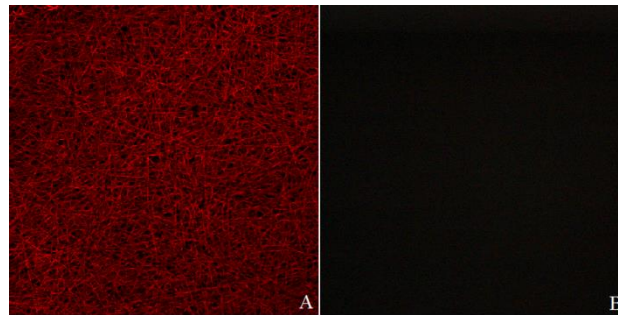
Com relação à ligação da proteína laminina, quinze minutos de hidrólise foram suficientes para permitir a ligação da mesma, o que foi confirmado pelo ensaio de imunofluorescência (Figura 10).



**Figura 10:** A) Imagens de microscopia confocal das matrizes de PDLLA/Lam. A laminina foi revelada por imunofluorescência. B) Controle negativo (o anticorpo primário foi omitido). 100x de magnificação.

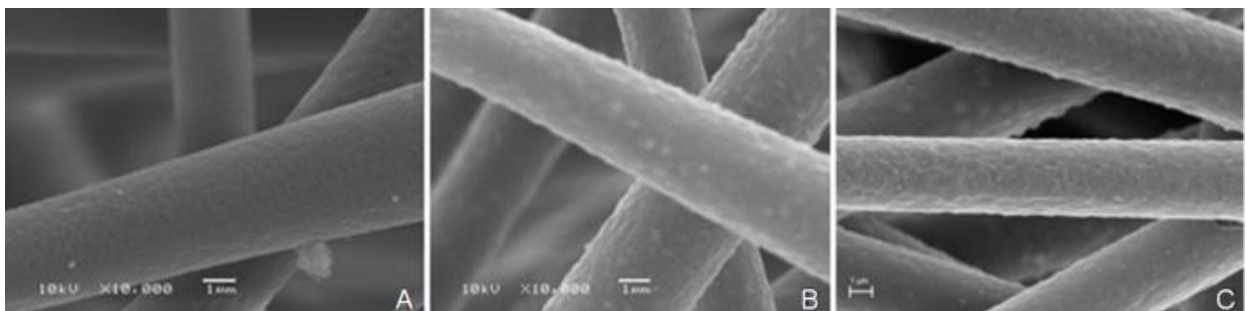
Ainda, a fim de excluir a possibilidade de somente ter ocorrido a adsorção da laminina à superfície das fibras das matrizes, as mesmas foram lavadas com solução de SDS 20%. As

matrizes onde ocorreu a ligação covalente da proteína e matrizes onde a proteína foi somente adsorvida foram testadas para confirmação da ligação química. A figura 11 confirmou a ligação covalente da proteína à superfície das fibras, visto que, após a lavagem, ainda foi possível observar a emissão de fluorescência (figura 11A). Por outro lado, na matriz onde somente ocorreu a adsorção da laminina, a emissão de fluorescência não foi mais visível, demonstrando a remoção da proteína (figura 11B).



**Figura 11:** Verificação da ligação da laminina após lavagem com solução de SDS 20%. A) A laminina foi covalentemente ligada às fibras. B) *Scaffolds* em que a laminina foi adsorvida na superfície das fibras.

O diâmetro das fibras grossas foi verificado para os 3 grupos de *scaffolds* (PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam) através das fotografias de MEV, usando o *software* Image J.

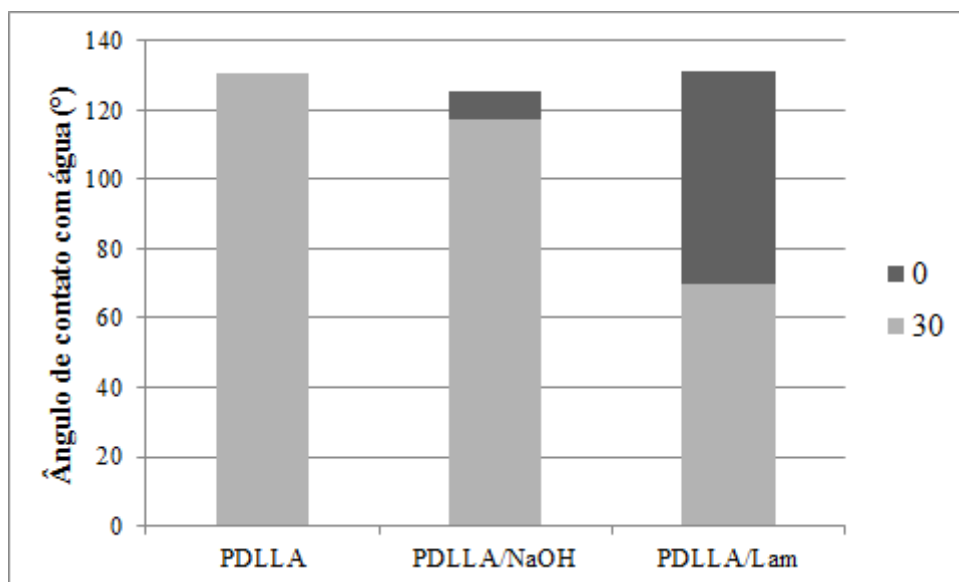


**Figura 12:** A) Matrizes de PDLLA; B) Matrizes de PDLLA hidrolizadas com NaOH 0,75M por 15 minutos; C) Matrizes de PDLLA hidrolizadas com NaOH 0,75 M por 15 minutos com a ligação covalente da laminina.

O diâmetro médio das fibras de PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam foi de  $3,411 \pm 0,177 \mu\text{m}$ ,  $3,197 \pm 0,113 \mu\text{m}$  e  $4,622 \pm 0,144 \mu\text{m}$ , respectivamente. O tamanho dos poros

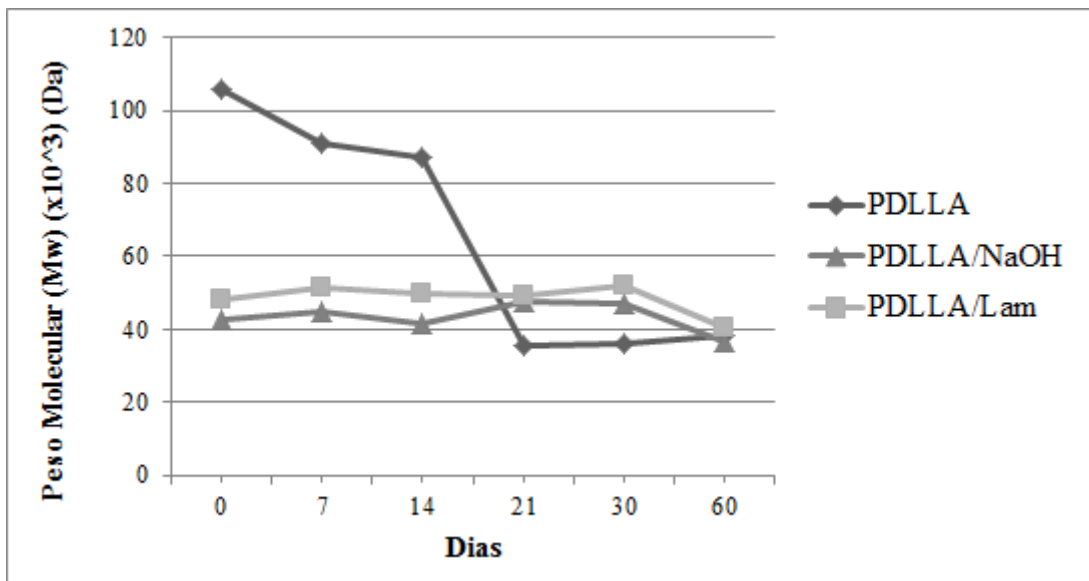
para os *scaffolds* de PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam foi de 20,466, 19,182 e 27,732  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os *scaffolds* de PDLLA/Lam apresentaram diferença estatística em comparação aos outros grupos em termos de diâmetro de fibras ( $p < 0,001$ ). As fibras da parte superior do *scaffold*, ou seja, as fibras finas apresentaram diâmetro médio de 574 nm, com tamanho de poro de 3,444  $\mu\text{m}$ . Como pode ser observado na Figura 12, a ligação da proteína laminina não alterou a morfologia da superfície das fibras.

Também foram analisados os ângulos de contato instilando-se uma gota de água nos *scaffolds* já padronizados quanto à concentração de NaOH e quanto ao tempo de hidrólise, bem como após a ligação da proteína laminina. Assim, os *scaffolds* de PDLLA apresentaram ângulo de contato de  $130,83^\circ$  em todos os períodos observados (0 e 30 segundos). A hidrólise da superfície das matrizes de PDLLA com solução alcalina (grupo PDLLA/NaOH) resultou em um ângulo de contato de  $117^\circ$  após 30 segundos de análise. Nas matrizes de PDLLA/Lam, o ângulo de contato diminuiu substancialmente, sendo  $69,9^\circ$  após 30 segundos (Figura 13). Não houve diferença estatística no tempo 0 de análise (medida realizada no momento em que a gota foi instilada sobre a superfície dos biomateriais). Após 30 segundos da instilação da gota nos *scaffolds* do grupo PDLLA/Lam, o resultado das medidas de ângulo de contato foi estatisticamente diferente dos demais grupos ( $p < 0,001$ ), mostrando maior molhabilidade/hidrofilicidade.



**Figura 13:** Medida do ângulo de contato com água realizada nos três diferentes grupos de *scaffolds* estudados, PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam, respectivamente.

Quanto às análises de degradabilidade, as matrizes de PDLLA degradaram vagarosamente durante os primeiros 14 dias de análise, partindo de um peso molecular médio de 105 Da para 97 Da. No dia 21 de análise, o peso molecular diminuiu para 36 Da, mantendo esse perfil pelo restante dos dias de análise. Por outro lado, os *scaffolds* de PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam apresentaram peso molecular de 40-50 Da desde o início da avaliação (0 dias) até o fim do período de análise (60 dias) (Figura 14).



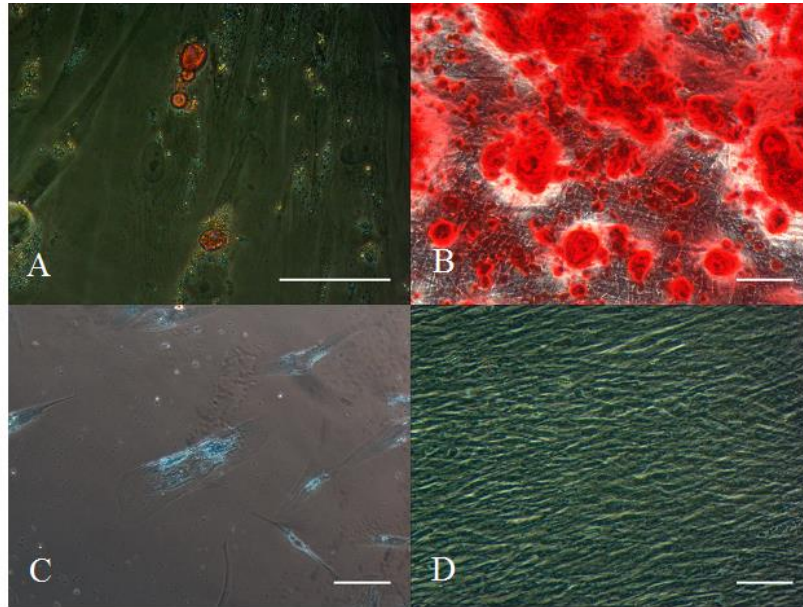
**Figura 14:** Peso molecular das matrizes de PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam.

#### 4.2 Análises biológicas dos biomateriais

Com relação aos pré-requisitos para classificação das células como CTMs, as mesmas foram rotineiramente acompanhadas em microscópio ótico para avaliação de sua morfologia fibroblastóide e capacidade de aderência ao plástico da placa de cultivo. Além disso, as mesmas diferenciaram-se com os meios adipogênico, osteogênico e condrogênico, como pode ser observado na figura 15.

A análise imunofenotípica de 3 culturas primárias mostrou resultados altamente positivos para os marcadores de CTMs. Já os marcadores de células hematopoéticas apresentaram baixa expressividade, como pode ser visto na Tabela 1.





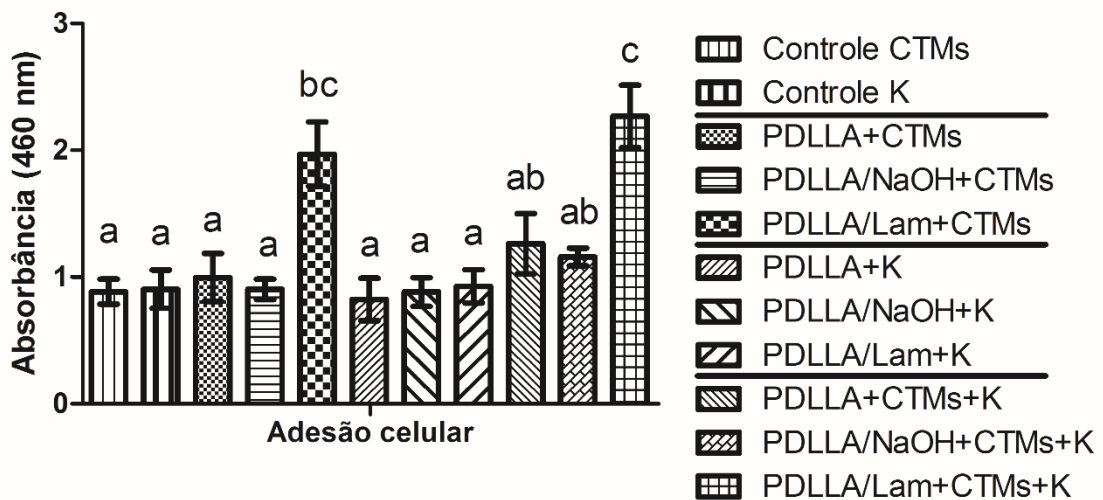
**Figura 15:** Fotografias de diferenciação celular. A) Diferenciação adipogênica, B) Diferenciação osteogênica, C) Diferenciação condrogênica e D) Controle – células não submetidas a protocolos de diferenciação. A escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 1:** Média de expressão imunofenotípica (n=3) de marcadores de células mesenquimais e não-mesenquimais.

Marcadores	CD90	CD29	CD44	CD73	CD14	CD34	HLA-DR	STRO-1	CD45	CD184
Porcentagem (%)	100	88,2	76	92,7	0,2	0	0,1	1,9	0	0

Com relação às análises biológicas, a adesão celular foi testada em 11 diferentes grupos, tendo sido melhor nos *scaffolds* de PDLLA/Lam, com exceção do grupo 8 (PDLLA/Lam+K), quando comparado aos demais grupos (figura 16). O grupo PDLLA/Lam+CTMs+K demonstrou a melhor adesão celular. Houve diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,001$ ).



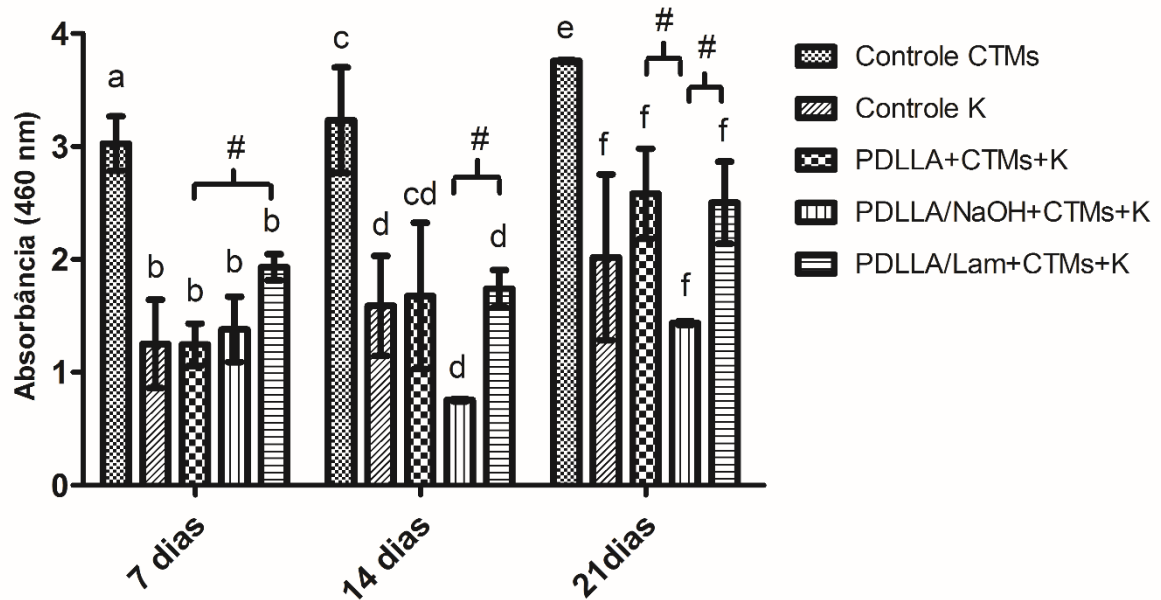


**Figura 16:** Teste de adesão celular avaliado nos dias em que as CTMs e os queratinócitos foram semeados. As diferentes letras referem-se às diferenças estatísticas encontradas entre os grupos analisados.

A análise de viabilidade celular foi realizada em 7, 14 e 21 dias após a semeadura dos queratinócitos. No dia 7, de cultivo celular, a absorbância para o grupo 3 (PDLLA + CTMs + K) foi de  $1,148 \pm 0,411$ , para o grupo 4 (PDLLA/NaOH + CTMs + K) foi de  $1,380 \pm 0,501$  e para o grupo 5 (PDLLA/Lam + CTMs + K) foi de  $1,990 \pm 0,255$ . No dia 14, a absorbância para os grupos 3, 4 e 5 foi de  $1,032 \pm 0,169$ ,  $0,755 \pm 0,016$  e  $1,636 \pm 0,313$ , respectivamente. No dia 21, a absorbância para o ensaio de viabilidade celular foi de  $2,204 \pm 0,317$ ,  $1,437 \pm 0,024$  and  $2,811 \pm 0,477$ , respectivamente para os grupos 3, 4 e 5. O grupo controle CTMs (grupo 1) apresentou a maior absorbância (entre 3 e 4 para todos os dias analisados) quando comparado aos outros grupos, representando um maior número de células nos poços das placas plásticas (figura 17).

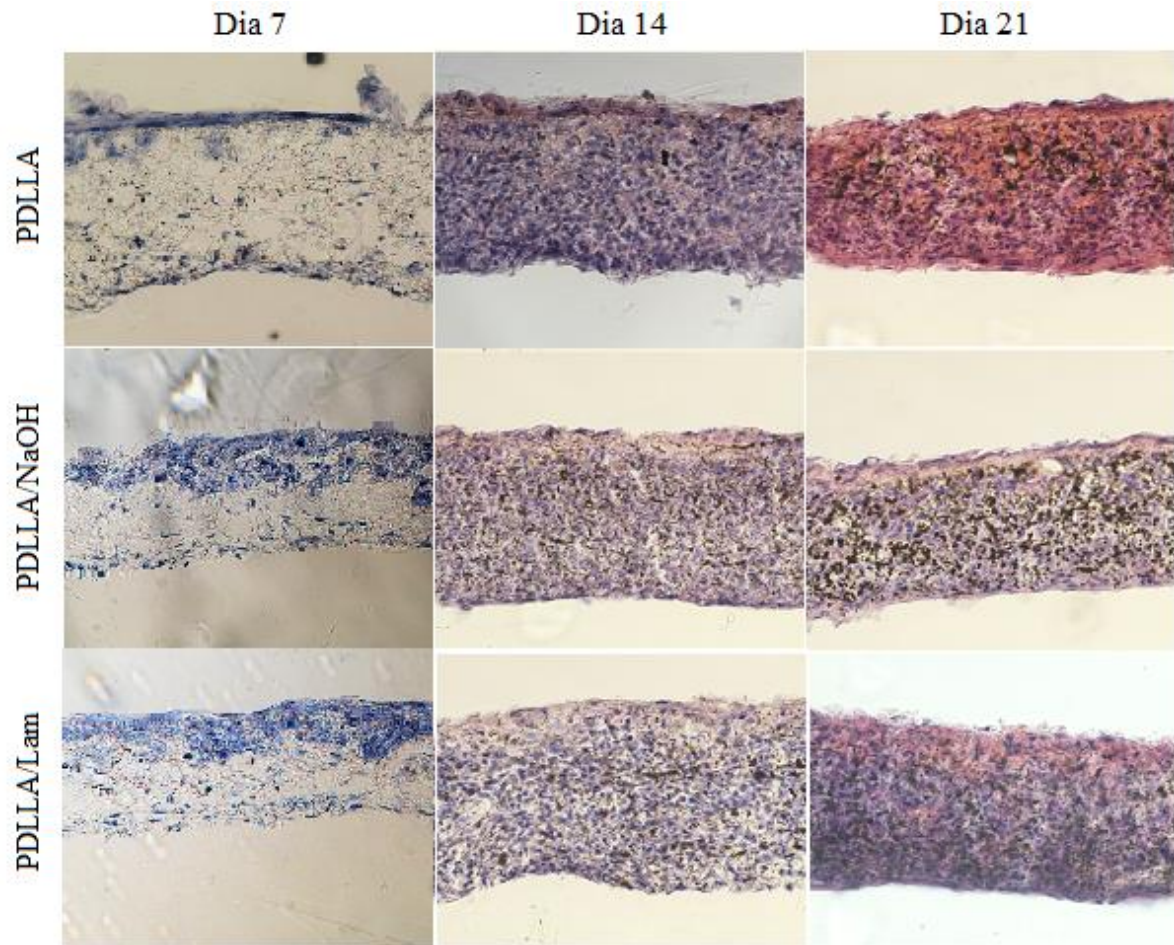
Para a análise estatística, uma comparação foi realizada entre os grupos em cada dia de análise em termos de viabilidade celular. No dia 7, quando a comparação foi realizada somente entre os grupos com *scaffolds* onde foram semeadas as células-tronco mesenquimais e os queratinócitos, o grupo 3 foi estatisticamente diferente do grupo 5 ( $p < 0,001$ ). No dia 14, o grupo PDLLA/Lam+CTMs+K foi melhor que o grupo PDLLA/NaOH+CTMs+K ( $p < 0,001$ ). No dia 21, os grupos 3 e 5 foram similares entre si ( $p = 1,000$ ), mas mostraram-se diferentes do grupo 4. Em todos os dias de análise, o grupo 1 (somente CTMs) teve a melhor absorbância ( $p < 0,001$ ) para todas as comparações, com exceção do dia 14, em que o grupo 3 não mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo 1 ( $p = 0,245$ ). O grupo 2 (somente

queratinócitos semeados nos poços de cultura) foi comparável aos grupos com *scaffolds* e células, em termos de absorvância, em todos os dias de análise.

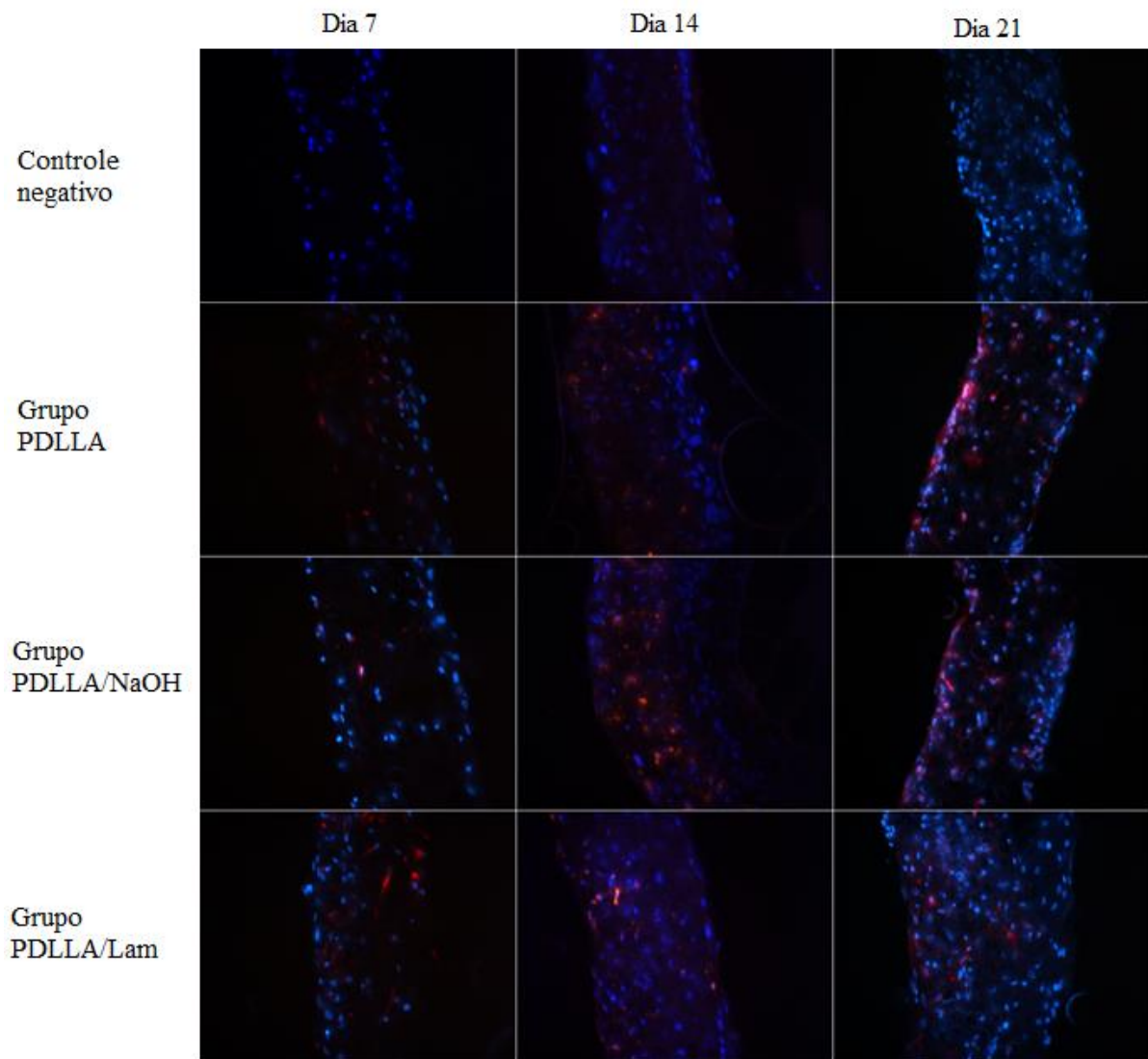


**Figura 17:** Ensaio de viabilidade celular avaliado em 7, 14 e 21 dias após a semeadura celular. Os resultados são apresentados como média±erro padrão. As letras acima das barras correspondem a comparações dos diversos grupos com o grupo controle; letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos. O símbolo “#” corresponde a comparações realizadas entre os grupos de biomateriais. As comparações foram feitas em cada dia de análise.

Pelas lâminas de histologia, pode-se visualizar claramente que as células ocuparam toda a estrutura dos biomateriais em todos os grupos. Um epitélio estratificado é visível no dia 7 de análise nos grupos PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam (figura 18). Na figura 19 observa-se a presença de ambos os tipos de células, células-tronco mesenquimais e queratinócitos, nas matrizes, durante todo o período de análise, para todos os *scaffolds* testados.



**Figura 18:** Fotografias das análises histológicas das matrizes de PDLLA, PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam, onde as CTMs e os queratinócitos foram co-cultivados. Os *scaffolds* foram corados com hematoxilina e eosina e as fotos obtidas em aumento de 20x.



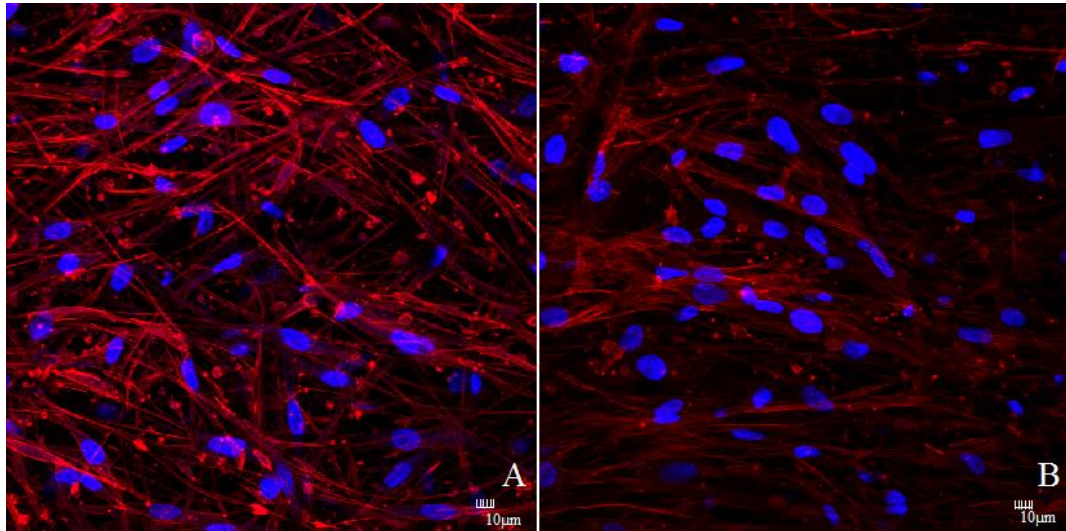
**Figura 19:** Fotografias de análises por fluorescência mostrando o co-cultivo de CTMs (coradas em vermelho com o reagente Mini-26) e queratinócitos. No controle negativo foram semeadas CTMs, sem marcação com o corante Mini-26, e queratinócitos. O núcleo de todas as células aparece em azul devido à coloração com DAPI.

### 4.3 Experimentação *in vivo*

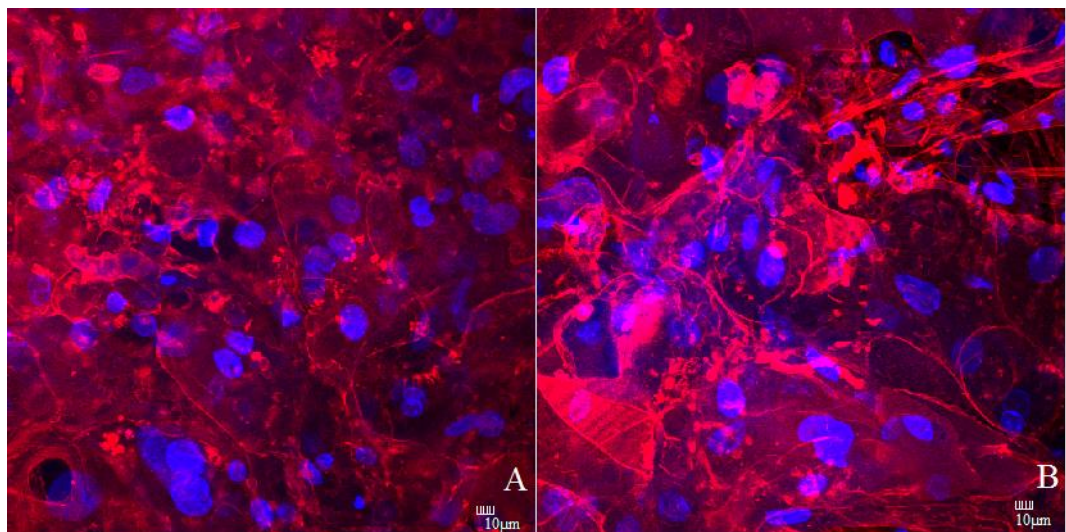
As células foram semeadas nos *scaffolds* por sete dias para, posteriormente, serem utilizados nos experimentos animais com camundongos *nude*. As análises por microscopia confocal revelaram a presença de CTMs em um dos lados do biomaterial e queratinócitos do outro lado do mesmo. As CTMs podem ser reconhecidas pela sua morfologia, com citoplasma alongado em ambos os tipos de *scaffolds* testados (figura 20). Os queratinócitos também podem ser reconhecidos pela sua morfologia em ambos os biomateriais (figura 21). Dessa



forma, os *scaffolds* utilizados nos animais dos grupos PDLLA + células e PDLLA/Lam + células apresentaram ambos os tipos celulares no momento de sua implantação nos camundongos *nude*.



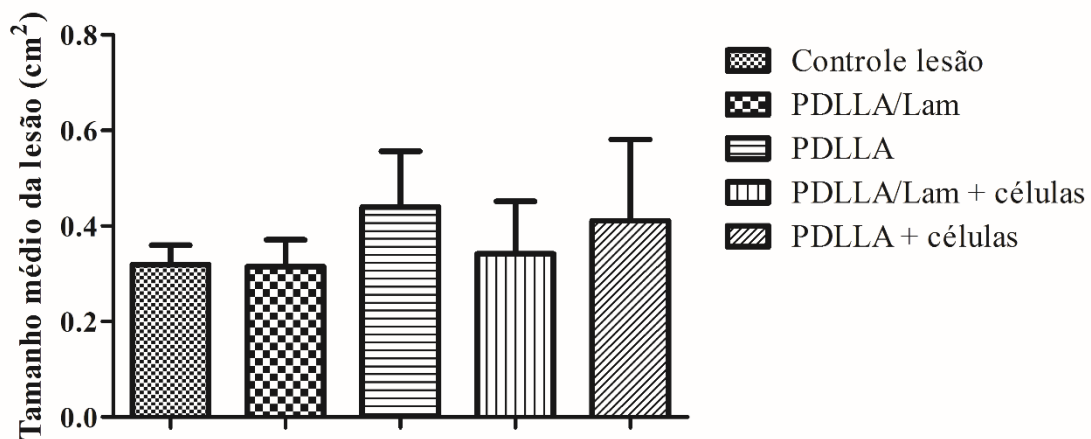
**Figura 20:** Análise de microscopia confocal das CTMs após 7 dias da semeadura nos *scaffolds*. A) Matriz de PDLLA e B) Matriz de PDLLA/Lam.



**Figura 21:** Análise de microscopia confocal dos queratinócitos após 7 dias da semeadura nos *scaffolds*. A) Matriz de PDLLA e B) Matriz de PDLLA/Lam.

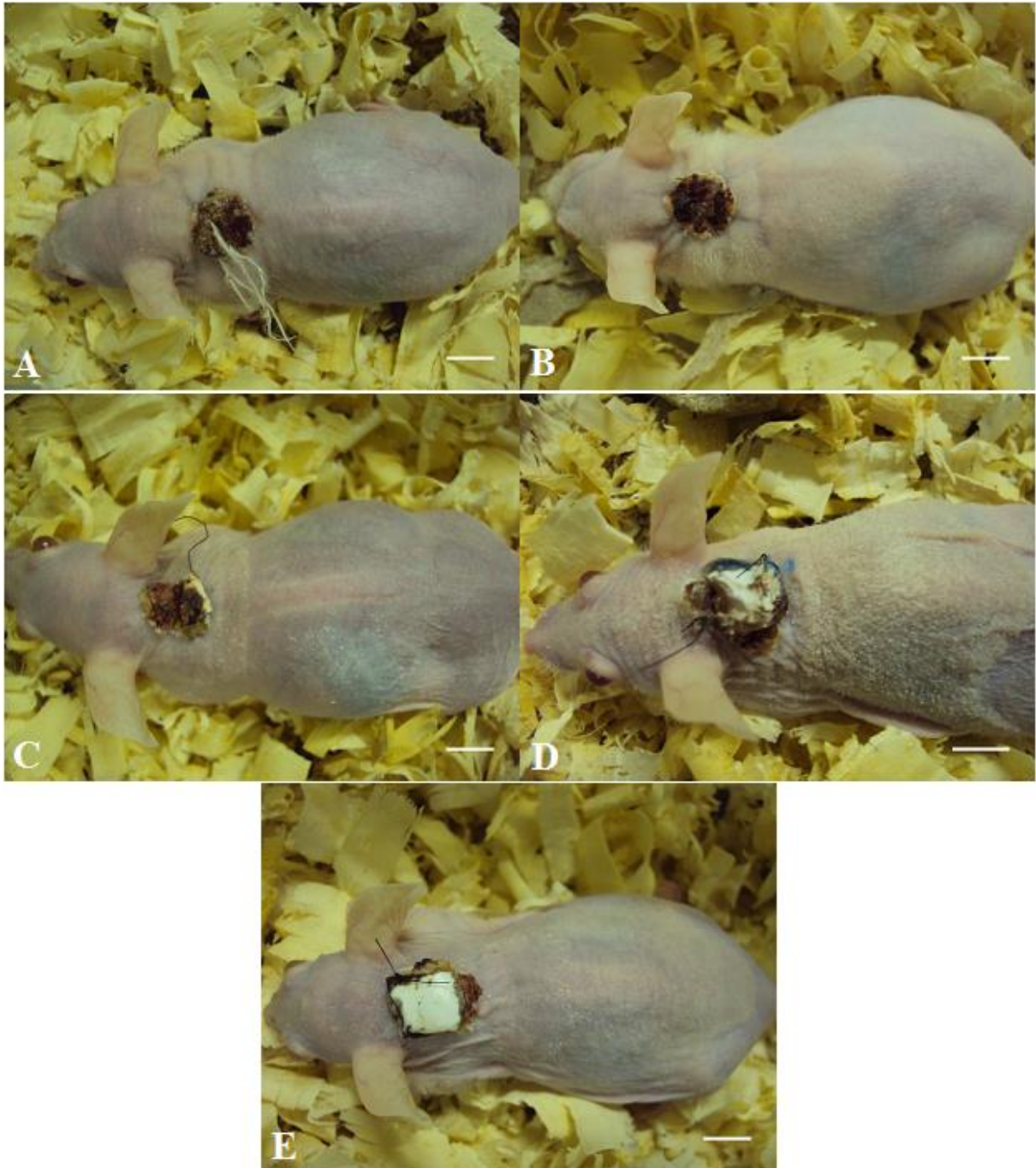
Foram realizadas cirurgias em 28 animais e nenhum deles apresentou sinais de infecção durante todo o período de análise, não havendo, portanto, perda de nenhum animal.

Para a medida do tamanho médio das lesões após 9 dias da cirurgia dos animais, utilizou-se cinco grupos: 1) Controle lesão, 2) PDLLA/Lam, 3) PDLLA, 4) PDLLA/Lam + células e 5) PDLLA + células. Inicialmente, todos os animais foram submetidos ao mesmo padrão de lesão, com 1 cm<sup>2</sup> de área de pele total retirada. Após 9 dias, os animais foram eutanasiados e por meio de fotografias foram feitas medidas da área da lesão com auxílio do software ImageJ 1.38x. Como pode ser verificado na figura 22, as médias e desvios padrão para os grupos 1, 2, 3, 4 e 5 foram 0,319±0,040 cm<sup>2</sup>, 0,315±0,056 cm<sup>2</sup>, 0,439±0,117 cm<sup>2</sup>, 0,342±0,110 cm<sup>2</sup>, 0,411±0,170 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos (p=0,296), embora perceba-se que os grupos 2 e 4 (*scaffolds* de PDLLA/Lam sem e com células, respectivamente) tiveram uma maior redução da área lesada quando comparados aos grupos 3 e 5 (*scaffolds* de PDLLA sem e com células).



**Figura 22:** Gráfico do tamanho médio de lesão após 9 dias da cirurgia com remoção total de pele.

Nos grupos onde as CTMs e os queratinócitos foram previamente semeados nas matrizes (grupos 4 e 5), ainda foi possível visualizar os *scaffolds* íntegros sobre a lesão após 9 dias da cirurgia. Em 3 de 6 animais do grupo 3 também foi possível visualizar pedaços de *scaffolds* (figura 23).

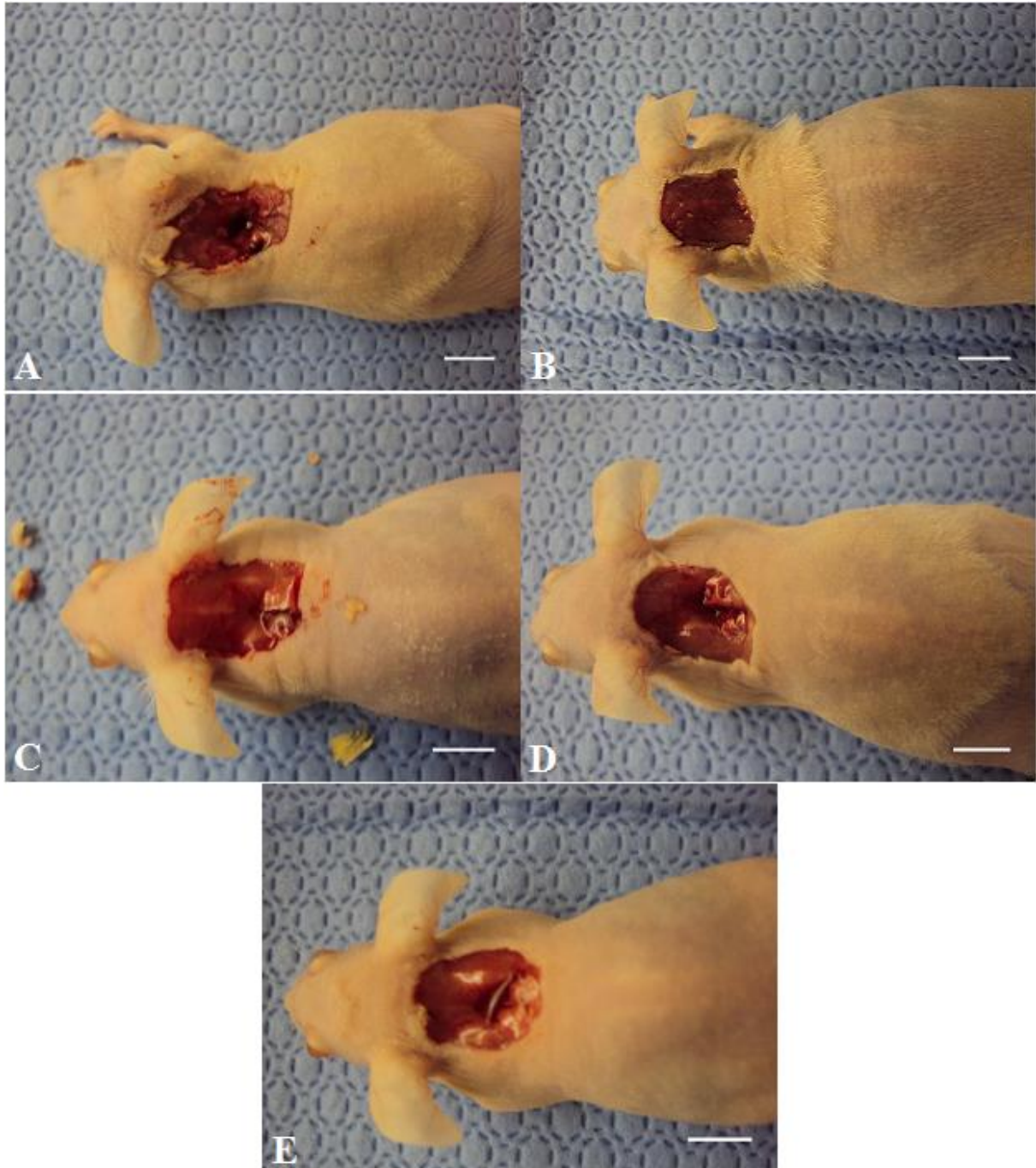


**Figura 23:** Fotos das lesões cutâneas dos animais 9 dias após a cirurgia. A) Controle lesão, B) PDLLA/Lam, C) PDLLA, D) PDLLA/Lam + células e E) PDLLA + células. A barra de escala corresponde a 1 cm.

Com relação ao aspecto visual do leito da lesão, o grupo 2 (PDLLA/Lam) foi o que apresentou o melhor aspecto visual, sem a formação de uma ferida grosseira. Já o grupo 1, controle, foi o que apresentou o pior aspecto de leito de lesão (figura 24). Além disso, a área retirada para as análises compreenderam somente o local da ferida, dessa forma, o grupo 2 foi



o que aparentou apresentar a menor contração da ferida, já que após a retirada da área lesionada, foi o que teve o menor tamanho de lesão, ou seja, não houve expansão da área lesionada após a retirada da cicatriz (figura 24).



**Figura 24:** Fotos do leito das lesões cutâneas após 9 dias da cirurgia. A) Controle lesão, B) PDLLA/Lam, C) PDLLA, D) PDLLA/Lam + células e E) PDLLA + células. A barra de escala corresponde a 1 cm.



A análise da expressão gênica foi realizada para diferentes genes (figura 25). Entre eles, genes relacionados à vasculogênese, como o gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator derivado de células estromais-1 (SDF-1); genes relacionados à fibrose, como o do fator de crescimento transformador-  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) e do pró-colágeno do tipo I (Colla1) e genes da família Bcl, como o Bcl-2 e o BAX, genes anti-apoptótico e pró-apoptótico, respectivamente.

As análises foram realizadas comparando-se os diferentes genes entre os grupos testados.

Todos os grupos apresentaram maior quantidade de expressão gênica de VEGF quando comparados ao grupo controle lesão. O grupo 4 (PDLLA/Lam + células) apresentou a maior expressão gênica de VEGF, sendo estatisticamente diferente dos grupos 1 (Controle lesão) ( $p < 0,001$ ), 3 (PDLLA) ( $p = 0,039$ ), 5 (PDLLA + células) ( $p = 0,003$ ) e 6 (Controle sadio) ( $p = 0,011$ ), e semelhante ao grupo 2 (PDLLA/Lam) ( $p = 0,1$ ).

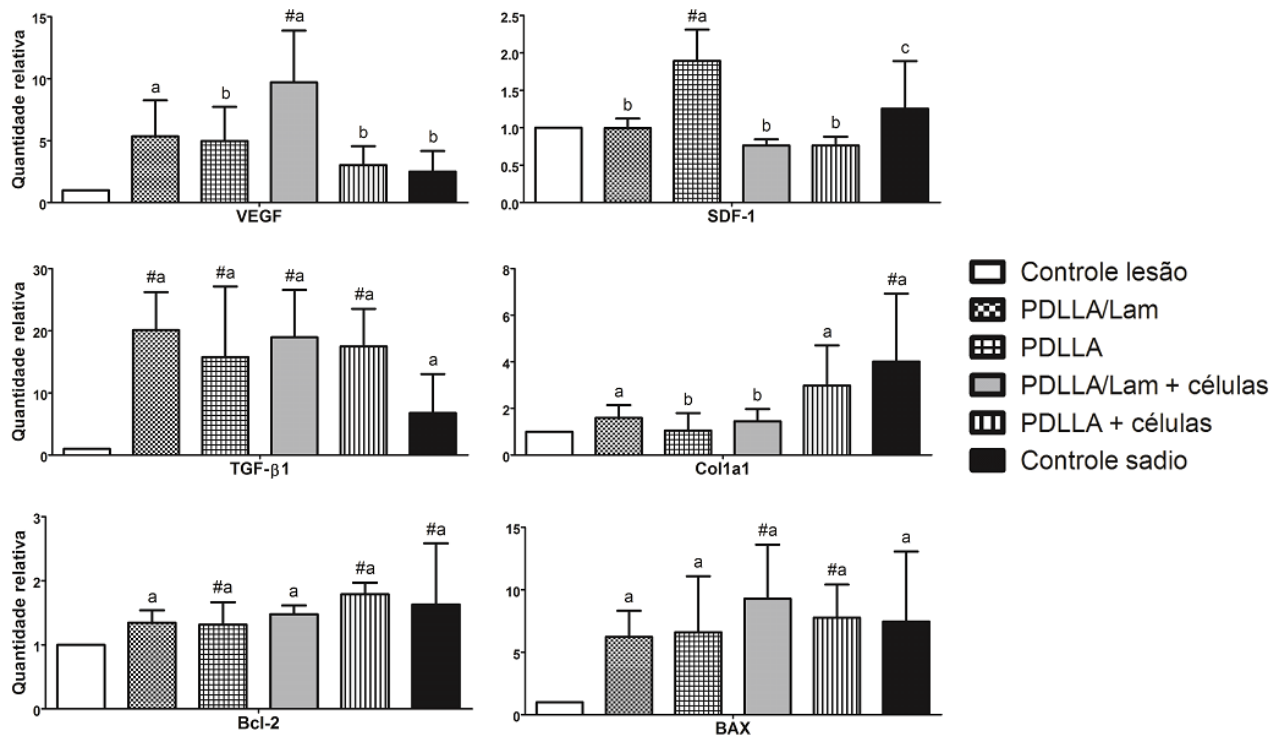
Já na expressão do SDF-1, o grupo 3 demonstrou a maior expressão, apresentando diferença estatística com o grupo controle lesão e demais grupos ( $p < 0,001$  para todos os casos).

Todos os grupos onde foram implantados biomateriais foram diferentes estatisticamente dos grupos controle ( $p < 0,014$  para todas as comparações) para as análises de TGF $\beta$ 1, tendo expressado consideravelmente mais TGF $\beta$ 1.

Para o gene de pro-colágeno do tipo 1 somente o grupo 6 (controle sadio) apresentou diferença com relação ao grupo controle lesão ( $p = 0,007$ ). Os grupos 2 e 5 não apresentaram diferença estatística ao serem comparados ao grupo 6 em termos de expressão gênica ( $p = 0,056$  e  $p = 0,822$ , respectivamente).

Com relação ao gene Bcl-2, os grupos PDLLA, PDLLA + células e controle sadio apresentaram um aumento na expressão gênica quando comparados ao grupo controle lesão, com diferença estatística ( $p = 0,012$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,041$ , respectivamente). Os demais grupos não apresentaram diferença, embora o grupo PDLLA/Lam tenha apresentado uma tendência à diferença estatística ( $p = 0,072$ ).

Não houve diferença estatística entre todos os grupos testados e o controle sadio em termos de expressão gênica de BAX. Ao se comparar os grupos onde foram implantados biomateriais com o grupo controle lesão, a diferença somente ocorreu entre os grupos 4 e 5 ( $p = 0,001$  e  $p = 0,015$ , respectivamente). O grupo controle lesão apresentou os menores níveis de expressão de BAX.



**Figura 25:** Expressão gênica dos diferentes grupos testados para os genes Bcl-2, VEGF, TGF $\beta$ 1, Col1a1, SDF-1 e BAX. # refere-se à comparação com o grupo controle lesão. As letras referem-se às comparações feitas entre os demais grupos, para o mesmo gene em questão.

A análise histológica foi realizada nos mesmos grupos analisados para expressão gênica e as fotomicrografias podem ser visualizadas na figura 26. Os anexos da pele, como glândulas sebáceas e folículos pilosos não foram observados em nenhum dos animais testados, com exceção dos animais controle sadio (figura 26 O e P).

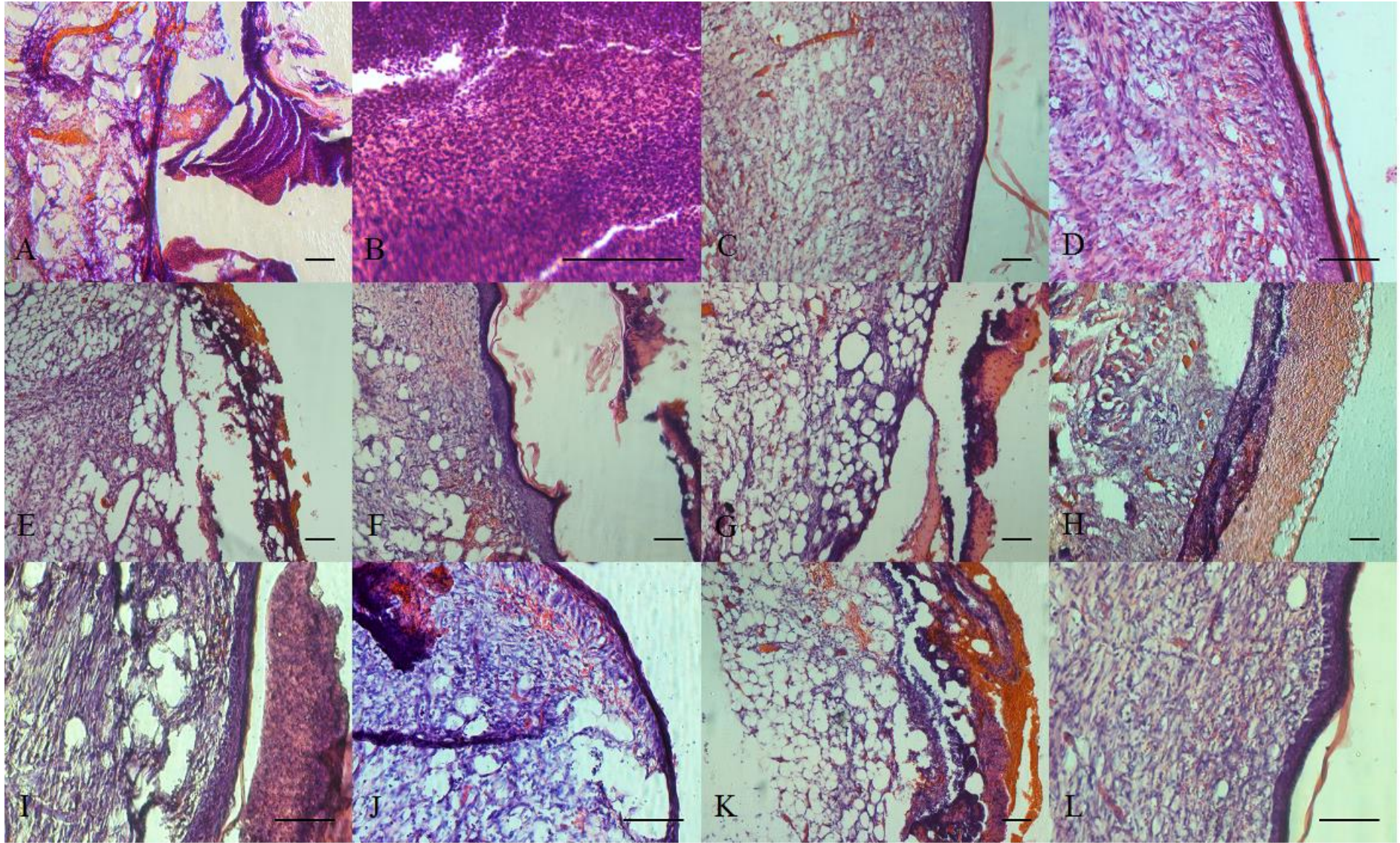
Por meio da figura 26A, é possível observar que o grupo controle lesão foi o que apresentou a área de injúria mais desorganizada após 9 dias. Verifica-se a presença de derme, com vasos sanguíneos, assim como um grande infiltrado inflamatório (figura 26B). Embora sejam observados vasos sanguíneos nas imagens referentes aos animais do grupo controle lesão, os grupos em que os biomateriais foram utilizados, apresentaram visualmente uma maior vascularização, com a distribuição de hemácias por todo o tecido.

Nos grupos PDLLA/Lam (figura 26 C-E) e PDLLA (figura 26 F-H), observa-se uma semelhança na organização histológica, com derme bem formada e organizada, tanto próximo às bordas da lesão, como na região central. A epiderme nesses dois grupos apresentou-se bem

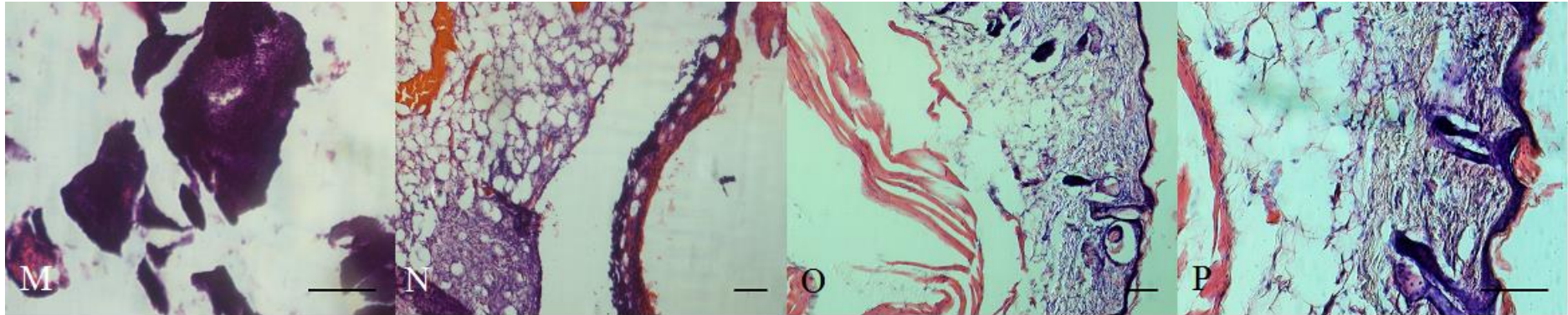
formada próximo às bordas. O mesmo não ocorreu na região central, onde ainda é possível verificar a presença de tecido de granulação com infiltrado inflamatório (figuras E e G). Na figura E, o local onde estão as células inflamatórias assemelha-se à estrutura do *scaffold*, já em estado bem avançado de degradação. Na figura 26 H ainda é possível visualizar o *scaffold* de PDLLA íntegro sobre a lesão.

Nos grupos onde as CTMs e os queratinócitos foram semeados nos *scaffolds* previamente ao implante na lesão, foi possível visualizar a formação de epiderme na região central da lesão em dois animais de cada grupo (figura 26 I e L, respectivamente para os grupos PDLLA/Lam + células e PDLLA + células). Já em outros animais, a parte central da região assemelha-se ao encontrado nos grupos de biomateriais sem células (grupo PDLLA/Lam e PDLLA), como pode ser visto na figura 26 K e N. Ainda, um animal do grupo PDLLA/Lam também já estava em fase de produção da epiderme na região central, como pode ser visualizado na figura 26 J. Um grande infiltrado inflamatório foi observado no grupo PDLLA + células (figura 26 M).









**Figura 26:** Fotomicrografias da análise histológica dos tecidos referente aos experimentos *in vivo*. As figuras A e B referem-se ao grupo controle lesão. A) Aspecto da lesão após 9 dias de experimento, com a derme desorganizada e ausência de epiderme; B) Infiltrado inflamatório presente no leito da lesão. As figuras C-E correspondem ao grupo PDLLA/Lam. C) Região próxima à borda da lesão onde se pode observar a derme e a epiderme bem formadas; D) Aumento da mesma região da figura C, onde a epiderme é evidenciada em maior destaque, com a presença de estrato córneo; E) Região central da lesão, com a derme parcialmente formada e a epiderme em formação, onde se pode observar de modo bem evidente a presença de tecido de granulação. As figuras F-H referem-se ao grupo PDLLA. F) Região próxima à borda da lesão, podendo ser visualizada derme e epiderme bem formadas; G) Região central da lesão, com tecido de granulação proeminente, podendo ser observadas células inflamatórias; H) Visualização de parte do *scaffold* não degradado sobre a lesão cutânea. As figuras I-K correspondem ao grupo PDLLA/Lam + células. I) Figura de parte da região central da lesão onde podem ser visualizadas derme e epiderme bem formadas, com algum tecido de granulação sobre as mesmas e com a presença de infiltrado inflamatório; J) Figura de região central onde pode ser visualizada a formação da epiderme, já com a parte dérmica bem formada; K) Região central da lesão onde derme, e principalmente epiderme, estão em formação. As figuras L-N referem-se ao grupo PDLLA + células. L) Imagem obtida da região central da lesão, já com a derme e a epiderme bem formadas; M) Presença de grande infiltrado inflamatório na região adjacente à lesão; N) Região central da lesão, com derme formada e epiderme em formação. As figuras O e P correspondem ao grupo controle sadio. O) Aspecto da pele sadia, com presença de epiderme, da derme e de seus anexos, assim como do tecido muscular; P) Detalhe em maior aumento da fotomicrografia O, onde são visualizados os folículos pilosos, as glândulas sebáceas, bem como a epiderme com estrato córneo, a derme e, mais abaixo, o tecido muscular. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de biomateriais para uso em órgãos lesionados ou ausentes é um campo que requer um conhecimento multidisciplinar, desde as áreas de engenharia, ciências de materiais, química, biológicas e da saúde. Dessa forma, para utilização clínica de um biomaterial necessita-se que diferentes testes físico-químicos, biológicos e *in vivo* sejam realizados.

Nesse sentido, projeta-se que a engenharia de tecidos formará a base para novas terapias a fim de beneficiar milhões de pacientes que sofrem a perda de um tecido ou de sua função. Além disso, espera-se que, em um futuro próximo, os substitutos tridimensionais também possam ser uma alternativa a estudos *in vivo* de funções normais e patológicas dos tecidos, eliminando, assim, a utilização massiva de animais de experimentação em tais testes.

A pele é o maior órgão do corpo dos vertebrados, sendo composta de epiderme e derme. Nesse trabalho, um biomaterial em bicamada foi produzido para utilização como substituto cutâneo, com o intuito de mimetizar a histologia convencional da pele completa. O desenvolvimento de um biomaterial com diferentes morfologias de fibras na parte superior e na parte inferior foi possível, como pode ser observado pelas micrografias de microscopia eletrônica de varredura, na figura 7. Essa mesma estratégia já foi demonstrada anteriormente em diferentes trabalhos, com resultados benéficos (Lou *et al.*, 2014; Zonari *et al.*, 2014). O objetivo da construção de ambas as fibras foi definir diferentes topologias a fim de imitar a epiderme e a derme, ou seja, uma bicamada gerada por engenharia de tecidos. Dessa forma, os queratinócitos foram co-cultivados com CTMs em um *scaffold* nano e microestruturado a partir do polímero PDLLA, mimetizando a epiderme e derme, respectivamente. Em estudo realizado por Pelipenko e colaboradores, foi demonstrado que os queratinócitos humanos aderem-se e proliferam-se melhor em fibras com diâmetros entre 305 e 667 nanômetros. Já os mesmos testes realizados em fibroblastos, células fenotipicamente semelhantes às CTMs, mostraram que essas células tem uma preferência maior por fibras com diâmetros micrométricos (Pelipenko, Kocbek e Kristl, 2014). Além disso, as fibras da parte superior foram construídas para agirem como uma barreira contra a penetração de queratinócitos nas matrizes. No entanto, mesmo na presença de pequenos poros, os queratinócitos foram capazes de penetrar nessa estrutura, como pode ser visto pelas imagens histológicas da análise *in vitro*. Esse fato pode ser explicado pela capacidade das células em se adaptar ao ambiente. Ainda, o fato da laminina ter sido covalentemente ligada a toda estrutura do biomaterial pode ter desorientado os queratinócitos, tornando-os distribuídos ao longo de uma grande parte da

estrutura das matrizes, uma vez que, em condições naturais, esta proteína está presente somente na membrana basal destas células (Sugawara *et al.*, 2008; Domogatskaya, Rodin e Tryggvason, 2012; Rousselle e Beck, 2013).

A utilização de células na engenharia de tecidos faz parte da tríade para o desenvolvimento de materiais. Assim, as CTMs foram selecionadas como o componente celular do substituto dérmico devido à sua capacidade de diferenciação. A capacidade de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das CTMs já é bem conhecida, sendo todos tecidos de origem mesodérmica (Miura *et al.*, 2003; Bernardi *et al.*, 2011), entretanto, o potencial neurogênico das CTMs também já foi demonstrado, através da capacidade de diferenciação em tecidos não-mesodérmicos (Nourbakhsh *et al.*, 2011). A capacidade imunomodulatória dessas células tem sido relatada em diversos estudos (Caplan, 2007; Silva *et al.*, 2014; Remacha *et al.*, 2015), o que pode ser uma vantagem do seu uso, principalmente em condições graves, como é o caso de pacientes queimados, embora recentemente essa propriedade venha sendo questionada (Kronsteiner *et al.*, 2011; Sánchez-Abarca *et al.*, 2013; Ankrum, Ong e Karp, 2014). Ainda, Nakagawa e colaboradores (Nakagawa *et al.*, 2005) mostraram que as CTMs melhoraram a cicatrização de feridas em um modelo de queimadura animal, utilizando um substituto dérmico, disponível comercialmente como suporte para a adesão e crescimento das células.

No presente trabalho, além da adesividade ao plástico e da diferenciação celular em osteócitos, adipócitos e condrócitos, as células apresentaram um perfil imunofenotípico característico, com alta positividade para marcadores típicos de CTMs, como CD29, CD44, CD73 e CD90. Essas células foram negativas para marcadores não-mesenquimais, como o CD14, CD34, CD45, CD184 e HLA-DR. Além disso, houve uma positividade baixa para STRO-1, o que está de acordo com achados anteriores (Bernardi *et al.*, 2011).

De acordo com Lu e colaboradores (Lu *et al.*, 2012), quando os queratinócitos foram cultivados em meio condicionado, onde as CTMs foram previamente cultivadas, os queratinócitos proliferaram mais rapidamente do que quando essas células foram cultivadas em seu meio específico, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Os pesquisadores atribuíram esse fato aos fatores de crescimento investigados por eles, como o fator de crescimento de hepatócitos humanos (HGF) e o fator de crescimento de queratinócitos (KGF, conhecido como FGF-7), secretados pelos queratinócitos quando cultivados no meio condicionado. Para verificar a influência de CTMs e fibroblastos sobre a proliferação de queratinócitos em ambientes 3D, esses pesquisadores também avaliaram o cultivo dessas células em *scaffolds* tridimensionais. Os queratinócitos semeados com CTMs

nas matrizes apresentaram a menor espessura de epiderme em termos de histologia do novo tecido formado, quando comparado às sementeiras de queratinócitos com fibroblastos ou com uma mistura de fibroblastos e CTMs. Entretanto, a espessura da epiderme onde as CTMs foram sementeiras com queratinócitos foi maior do que quando se utilizaram apenas queratinócitos. Além disso, a epiderme formada por queratinócitos sementeiras com CTMs demonstrou melhores propriedades mecânicas do que a camada formada somente por queratinócitos. Dessa forma, demonstrou-se a sinergia biológica e mecânica ao se utilizar o sistema de co-cultivo dessas células para produzir substitutos cutâneos.

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

Assim, o sucesso do desenvolvimento e organização de tecidos depende das propriedades dos materiais, uma vez que elas, eventualmente, podem ditar o transporte de nutrientes/resíduos, a diferenciação celular, a viabilidade celular e a síntese e organização da matriz extracelular (MEC) (Naderi, Matin e Bahrami, 2011). Logo, diversas propriedades físico-químicas foram avaliadas no presente estudo.

Já foi demonstrado anteriormente que o PDLA, puro ou em mistura, é um suporte adequado para a proliferação celular e já foi utilizado por promover o crescimento de osteoblastos, condrócitos, células de carcinoma de pulmão e células-tronco mesenquimais (Roether *et al.*, 2002; Blaker *et al.*, 2003; Maquet *et al.*, 2004; Steffens *et al.*, 2013).

A relação entre o tamanho dos poros e diâmetro das fibras dos biomateriais produzidos por ES é conhecida, onde o tamanho dos poros aumenta proporcionalmente com o aumento do diâmetro da fibra (Li e Xia, 2004; Hussain *et al.*, 2010) em uma razão de 6:1. No entanto, no caso das matrizes de PDLA/Lam, acredita-se que isto possa não ser aplicado. Os *scaffolds* de PDLA e de PDLA/NaOH tiveram diâmetro de fibra e tamanho de poros semelhantes entre si. Por outro lado, as matrizes de PDLA/Lam apresentaram diâmetro de fibras estatisticamente maiores e, conseqüentemente, deveriam ter tamanho de poros maiores, mas como a laminina foi ligada covalentemente às matrizes de PDLA hidrolisadas, acredita-se que o tamanho de poro do grupo de PDLA/Lam seja menor do que o calculado pelos



achados de Hussain e colaboradores, devido à disposição espacial da proteína sob a superfície das fibras.

Trabalhos anteriores também já demonstraram que, para permitir uma reconstrução tridimensional de tecidos *in vitro*, o biomaterial deve suportar o espalhamento uniforme das células em poros interligados (Daley *et al.*, 2010). Dessa forma, um único tamanho de poros pode gerar limitações ao biomaterial, permitindo que somente um único tipo celular possa se proliferar pela arquitetura do mesmo (Havran e Jameson, 2010). O tamanho mínimo de poro para formar um ambiente tridimensional vai depender, em última instância, do diâmetro das células a serem utilizadas (Agarwal, Wendorff e Greiner, 2009). Nesse sentido, um estudo anterior sugeriu que um tamanho de poro de 20-120  $\mu\text{m}$  de diâmetro seria o mais adequado para a engenharia de tecidos da pele (Gay *et al.*, 2013). Assim, no atual projeto de pesquisa, construiu-se biomateriais com dois tamanhos diferentes de poros, com diâmetros na ordem nanométrica e na ordem micrométrica. Os poros na ordem micrométrica variaram de aproximadamente 19 a 28 micrometros, o que pareceu ser suficiente para tornar os biomateriais estruturas tridimensionais, uma vez que, pelas análises histológicas, as células foram identificadas adentrando nos *scaffolds* desde os 7 primeiros dias de análise. Os poros agem não apenas possibilitando a penetração celular, mas permitindo com que a estrutura dos biomateriais, ou *scaffolds*, também seja responsável por determinar o trânsito de nutrientes, metabólitos e moléculas regulatórias entre o meio extracelular e as células. A estrutura química do biomaterial, por sua vez, tem um papel importante na fixação e diferenciação celular, como já foi demonstrado anteriormente (Venugopal *et al.*, 2012). Por ter ocorrido uma boa adesão e geração de um ambiente tridimensional nos *scaffolds* produzidos, acredita-se que eles preencheram tanto as necessidades estruturais como químicas para o seu uso com as células.

Com relação aos demais testes, a hidrólise dos biomateriais não afetou a morfologia superficial das fibras e forneceu um ambiente propício à ligação da laminina, como ficou evidente nas figuras 9, 10 e 11. No entanto, o teste de degradabilidade mostrou uma diminuição acentuada no peso molecular dos biomateriais hidrolisados (grupos PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam), o que está diretamente relacionado às propriedades mecânicas destes biomateriais.

Idealmente, a velocidade de degradação do biomaterial deve ser igual à taxa de regeneração tecidual. Dessa forma, o biomaterial atua como um suporte para o desenvolvimento do tecido, sem que, ao mesmo tempo, atue como uma barreira para a regeneração. Assim, as propriedades mecânicas do biomaterial devem, idealmente,

corresponder às do tecido original, proporcionando a integridade mecânica do tecido formado e apoiando uma mecanotransdução entre as células e seu meio ambiente (Venugopal *et al.*, 2012). De um modo geral, a degradação de polímeros biodegradáveis depende de vários fatores que incluem a sua cristalinidade, o peso molecular, as dimensões, a composição e o pH do meio circundante (Navarro *et al.*, 2006).

Em relação ao biomaterial, como já mencionado anteriormente, o PDLLA é um polímero biocompatível e biodegradável, com uma estrutura amorfa. Isso significa que estruturalmente esse polímero é desorganizado, o que facilita a sua degradação, já que não há necessidade de prover energia para que a desorganização das cadeias poliméricas ocorra antes da degradação das mesmas. Em última instância, tal disposição das cadeias proporciona uma degradação relativamente rápida, essencial para a aplicação em tecidos com rápida regeneração, como no caso da pele.

Nos ensaios biológicos, foi possível observar que os biomateriais permaneceram morfológicamente inalterados e apresentaram fácil manuseio após os 21 dias de análise. Após o período de 21 dias do ensaio de degradabilidade, o grupo PDLLA seguiu o mesmo padrão dos *scaffolds* hidrolisados, em termos de peso molecular. Esses resultados sugerem que esse biomaterial permanece em uma estrutura básica, mais resistente ao processo de hidrólise, após esse período. Alguns trabalhos demonstraram que a degradação hidrolítica provoca a cisão de grupos éster do Poli- ácido láctico (PLA), resultando na formação de grupos álcool e de ácido carboxílico. Tal cisão da cadeia dos grupos éster do PLA foi reportada após apenas 22 dias de degradação. A hidrólise das ligações de éster é mais provável de ocorrer perto das extremidades da cadeia, o que leva à formação de ácido láctico e oligômeros (Karlsson e Albertsson, 1998; Fukushima, Feijoo e Yang, 2013). O ácido láctico, por sua vez, entra na via metabólica do ciclo de Krebs e, dessa forma, é eliminado (Barbanti, S.H., Zavaglia, C.A.C e Duek, E.A.R., 2005).

A degradação hidrolítica do polímero PDLLA alia-se à degradação enzimática no corpo, resultando em uma degradação ainda mais rápida (Tsuji e Miyauchi, 2001), o que é desejável para a pele, em que a vascularização no início do leito da ferida ocorre entre 3 e 4 semanas em humanos. No modelo animal apresentado no presente estudo, foi possível verificar a presença dos biomateriais, em todos os grupos, por um período de 7 dias após o procedimento cirúrgico. Por outro lado, após 9 dias, somente os biomateriais onde as células haviam sido semeadas previamente ainda podiam ser vistos, íntegros, ou seja, sem mostras de degradação, como aparência fragmentada, por exemplo. Estudos anteriores demonstraram a

ação de enzimas como a lipase, collagenase e lisozimas agindo na degradação dos biomateriais (Wang *et al.*, 2013; Zonari *et al.*, 2014).

De toda forma, em todos os grupos de biomateriais testados nos animais, os mesmos mostraram-se mecanicamente estáveis, uma vez que suportaram o procedimento de sutura e permaneceram em todos eles até sua degradação ou até a eutanásia dos animais, além de propiciarem um ambiente favorável à angiogênese. Ainda, as células semeadas nessas estruturas pareceram dar um maior aporte mecânico aos biomateriais, fazendo com que os mesmos tivessem uma menor degradação *in vivo*, como pode ser observado nos experimentos com animais.

No que diz respeito às análises de ângulo de contato, vários estudos já demonstraram que características mais hidrofílicas resultam em uma maior adesão e proliferação celular (Ku e Park, 2010; Jin, Prabhakaran e Ramakrishna, 2011; Wei *et al.*, 2012). O tratamento dos *scaffolds* com solução alcalina (NaOH) resultou em uma superfície mais hidrofílica. No entanto, observou-se que esta hidrofilização não foi a responsável pela maior adesão e proliferação das células nos *scaffolds* de PDLLA/Lam, visto que quando se comparam os grupos PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam, os mesmos demonstraram resultados diferentes para as avaliações celulares. Assim, a proteína laminina parece ter promovido um efeito mais marcante em termos de adesão e proliferação celular.

Em termos de análises biológicas, o grupo PDLLA/Lam apresentou os melhores resultados para os testes de adesão e de viabilidade celular, apesar de não ter ocorrido diferença estatística em alguns casos. Os grupos controle apresentaram maior absorvância no teste de viabilidade, quando comparados aos outros grupos. Tal resultado era esperado visto que o cultivo de células em garrafas plásticas é a maneira convencional de cultura de células, entretanto células cultivadas dessa forma não formam estruturas tridimensionais, dificultando a aplicação clínica para formar novos tecidos e/ou órgãos. A hidrólise da superfície dos biomateriais (grupos PDLLA/NaOH) não foi responsável pelos melhores resultados dos grupos de PDLLA/Lam, considerando que o grupo PDLLA/NaOH apresentou os piores resultados em relação à adesão e viabilidade celular.

O aumento das taxas de proliferação pode, potencialmente, reduzir o tempo necessário para um enxerto ser implantado no doente e, assim, dar origem a um processo melhorado de regeneração. Dessa forma, as proteínas da matriz extracelular, tais como colágenos do tipo I e do tipo IV, laminina, fibronectina e vitronectina são eficazes na promoção da adesão e espalhamento celular. Essas proteínas possuem uma sequência de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), a qual é reconhecida pelas integrinas para adesão celular (Ruoslahti e

Pierschbacher, 1987). Em um estudo realizado por Zanatta e colaboradores (Zanatta, Rudisile, *et al.*, 2012) foi claramente demonstrado que a adesão de CTMs em *scaffolds* é dependente de receptor de integrina beta-1. Assim, esse estudo corrobora a hipótese de que a laminina tenha influenciado a adesão das CTMs, como pode ser observado na figura 16, onde as CTMs tiveram a maior adesão celular em *scaffolds* do grupo PDLLA/Lam.

Ainda, Rho e colaboradores (Rho *et al.*, 2006) também avaliaram a adesão de queratinócitos orais (NHOK) e queratinócitos epidérmicos (NHEK) em nanofibras de colágeno em meio isento de soro, recobertas com colágeno do tipo I (50 mg/mL), fibronectina (1 mg/mL), ou laminina (10 mg/mL). O colágeno do tipo I e a laminina promoveram significativamente a adesão e o espalhamento celular de NHOK e NHEK em comparação às nanofibras apenas de colágeno. Junka e colaboradores (Junka *et al.*, 2013) também observaram um aumento no número de células de Schwann em *scaffolds* de PCL-quitosana com a ligação da laminina, quando comparados ao grupo controle.

Por meio da análise histológica, foi possível observar ambos os tipos de células após 7 dias do procedimento da sementeira nas matrizes. Também foi possível visualizar um epitélio estratificado nos grupos PDLLA/NaOH e PDLLA/Lam, o que não é demonstrado no grupo PDLLA. No grupo PDLLA/NaOH, as células parecem estar mais diferenciadas, visto que elas são maiores e mais desorganizadas, quando comparadas às células nos *scaffolds* de PDLLA/Lam. Após o período de 7 dias, não foi mais possível diferenciar as células no interior dos biomateriais em quaisquer dos grupos. As células preencheram toda a estrutura dos biomateriais, tornando os *scaffolds* estruturas tridimensionais. Isso demonstra que esta tecnologia (*electrospinning*) é capaz de produzir fibras que imitam muito de perto a matriz extracelular das células. Acredita-se que a adição de laminina nas fibras dos biomateriais cria um ambiente mais natural para as células, o que pode ser comprovado pelos melhores resultados de adesão e viabilidade celular para este grupo de matrizes, assim como pela histologia, mostrando células menores (mais indiferenciadas) no grupo de matrizes de PDLLA/Lam.

A fim de certificar a presença de ambas as células nos *scaffolds* por todo o período de análise e devido à dificuldade de realização de imunoenaios em matrizes produzidas por ES, realizou-se a marcação das CTMs com o corante Mini-26. Assim, na figura 19 é perfeitamente possível observar a co-cultura de CTMs e queratinócitos nessas estruturas e por todo o período de análise.

Após as determinações das propriedades físico-químicas e biológicas das matrizes, iniciaram-se os experimentos *in vivo*. Para isso, somente os *scaffolds* de PDLLA e

PDLLA/Lam foram testados. Os *scaffolds* de PDLLA/NaOH não foram testados *in vivo* pelos resultados apresentados *in vitro*, com menor viabilidade celular, além de demonstrarem células diferenciadas na sua estrutura, por meio da análise histológica.

Com relação ao tipo de animal selecionado, camundongos *nude* foram utilizados por não possuírem linfócitos T maduros e, dessa forma, não serem capazes de desenvolver rejeição a transplantes de outras espécies (Dos Santos, 2002). Logo, por serem utilizadas células humanas em camundongos, especialmente células diferenciadas como queratinócitos humanos maduros, optou-se por esses animais atímicos.

A escolha por utilizar matrizes após 7 dias de cultivo imerso para o implante nos animais deu-se pelo fato de que, nesse período, é possível visualizar ambos os tipos de células, com as CTMs na parte inferior e os queratinócitos na parte superior das matrizes. Dessa forma, acreditou-se que, através da sinalização celular, entre animais e células ali presentes, a estrutura tridimensional pudesse se organizar de forma mais semelhante ao que ocorre nos tecidos da pele natural.

O tempo dos experimentos *in vivo* baseou-se no acompanhamento diário dos animais. Como em 7 dias após a cirurgia ainda se podia visualizar os biomateriais em todos os grupos de animais, decidiu-se por aguardar um tempo maior, até que ocorresse a degradação dos mesmos. Nove dias após a cirurgia, somente os *scaffolds* onde foram semeadas células ainda se mostravam íntegros, sem sinais de degradação e, portanto, realizou-se a eutanásia dos camundongos.

Com relação ao tamanho da lesão após os 9 dias, não houve diferença estatística entre os 5 grupos testados, entretanto os grupos de PDLLA/Lam, com ou sem células, foram os que apresentaram a maior redução visual do tamanho da lesão. Esses *scaffolds*, sem células também foram os que apresentaram melhor aparência do leito da lesão, após a retirada do tecido recém-formado. Ainda, na análise de tamanho, somente visual, de todos os animais experimentados após a retirada do neotecido, percebeu-se que o grupo que teve menor contração da lesão, aparentemente, foi o grupo PDLLA/Lam. Esse achado deve-se ao fato de que, após a retirada do entorno do tecido recém-formado, esse grupo foi o que apresentou a menor expansão do tamanho de lesão, comparado com o tamanho sem a retirada da pele em processo de regeneração.

A fim de verificar o processo de regeneração cutânea em termos de expressão gênica, diversos genes foram avaliados. Entre eles, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator derivado de células estromais-1 (SDF-1), relacionados à vasculogênese; o fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) e de procolágeno do tipo I (Col1a1), genes fibróticos

e os genes da família Bcl, como o gene Bcl-2, um gene anti-apoptótico e o gene BAX, um gene pró-apoptótico.

Durante o processo de formação e/ou regeneração de um tecido, a angiogênese é um processo fundamental. Ela garante os nutrientes necessários e o oxigênio no local da lesão, dessa forma, possibilitando a formação do tecido de granulação. Nesse sentido, dois fatores de crescimento estão mutuamente relacionados. O VEGF é sabidamente o maior responsável pela angiogênese. Sabe-se que esse fator se encontra elevado na fase aguda das lesões, sendo sua expressão induzida dentro de 24 horas após a lesão de pele, com um pico máximo em 2 a 3 dias e declinando ao seu nível basal após 7 dias (Brown *et al.*, 1992; Shukla *et al.*, 1998; Martino *et al.*, 2015).

Em experimentos realizados por Fronza e colaboradores, os mesmos verificaram aumento da presença de VEGF após 2 dias da lesão cutânea em ratos Wistar, seguido por decréscimo após esse período. Eles ainda acompanharam esses animais por 21 dias e observaram que o aumento da vascularização só foi notado 7 dias após a lesão realizada nos animais, ou seja, após a elevação do fator de crescimento endotelial vascular (Fronza *et al.*, 2014).

Outro fator de crescimento que vem chamando atenção nos últimos anos pela sua potencial capacidade angiogênica é o SDF-1. Ele possui algumas similaridades com relação ao VEGF, como também ser produzido por tumores e órgãos lesionados, ter propriedades quimiotáticas e agir sobre células-tronco hematopoéticas, células progenitoras endoteliais e células endoteliais maduras (Mirshahi *et al.*, 2000; Petit, Jin e Rafii, 2007). Ainda, ambos fatores podem se auto-regular, aumentando as suas expressões (Petit, Jin e Rafii, 2007).

Com relação à expressão desses genes, o VEGF foi o que apresentou o maior aumento de expressão entre os genes angiogênicos testados. Quando comparados os diferentes grupos, os grupos de animais onde os biomateriais foram implantados apresentaram maior expressão de VEGF ao se comparar ao grupo controle sadio, resultado compreensível, visto que os animais lesionados estão em processo angiogênico intenso e, dessa forma, maior nível de VEGF se faz necessário. Nesse contexto, os biomateriais parecem apresentar vantagem sobre o grupo controle lesão, pois com maior atividade angiogênica acontecendo, a cicatrização se torna facilitada e esteticamente melhor. Estudos anteriores mostram que baixas taxas de oxigênio decorrentes de anomalias microcirculatórias, presentes na lesão cutânea, induzem o aumento da expressão gênica de TFG, um gene que quando superexpresso pode levar à formação de cicatrizes hipertróficas e quelóides (Sultan *et al.*, 2012).

Já o nível de SDF-1 não alterou muito entre os diferentes grupos, embora tenha ocorrido diferença estatística entre os grupos controle lesão e PDLLA, com a maior expressão nesse último grupo.

A presença inicial das células nos biomateriais não parece ter afetado a estimulação de expressão gênica dos genes vasculogênicos.

A síntese de colágeno do tipo I é altamente regulada por diferentes citocinas ao nível da transcrição. Especialmente as isoformas TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2, membros da família TGF, as quais aumentam a expressão do gene do colágeno do tipo I, tendo um efeito determinante na cicatrização e fibrose (Walraven, Beelen e Ulrich, 2015). Essa regulação ocorre por meio da cascata de ativação SMAD, uma via de proteínas intracelulares que transduzem sinais extracelulares, provenientes da ligação do TGF $\beta$ , para o núcleo, agindo sobre diversos genes alvos de colágeno e também de outras proteínas da matriz extracelular, como o Colla1 (Jurzak *et al.*, 2014).

Com relação ao TGF, houve um aumento substancial em todos os grupos testados quando comparados ao grupo controle lesão e sadio. Na comparação com o grupo controle sadio, essa resposta já era esperada, pois a lesão nos animais provoca efeitos fibróticos na tentativa de fechar a lesão causada, o que não ocorre para os animais controle sadio. O aumento de TGF $\beta$ 1 nos animais com implante de biomaterias foi estatisticamente diferente comparado ao grupo controle lesão. Uma das possibilidades é o maior ordenamento das células nesses animais, uma vez que as matrizes poderiam estar agindo como uma ponte onde as células estariam ancoradas e, dessa forma, mais rapidamente iniciariam os eventos para a síntese de colágeno e consequente cicatrização. A presença inicial das células nos biomateriais não parece ter afetado, nem positiva, nem negativamente, a estimulação de expressão gênica de TGF $\beta$ 1.

Ainda em termos de cicatrização, o colágeno é o maior componente do tecido conectivo. Dessa forma, o processo de cicatrização depende de sua regulação, produção, deposição e subsequente maturação. O balanço correto entre a sua síntese e catabolismo é importante para evitar a formação de cicatrizes hipertróficas e quelóides (Santibañez, Quintanilla e Bernabeu, 2011). Além disso, no estágio inicial da regeneração de lesões cutâneas, a síntese e deposição de colágeno é essencial, visto que a utilização de anti-TGF $\beta$  nesse estágio atrasa o processo de cicatrização, demonstrando, assim, a necessidade do colágeno (Lu *et al.*, 2005).

Relativo à expressão gênica, o Colla1 somente apresentou diferença estatística nos grupos controle sadio e controle lesão. Essa ausência de aumento substancial nesse gene nos

grupos testados pode ter sido ocasionada pelo tempo precoce de análise. Sabe-se que após a lesão, o TGF $\beta$ 1 tem um aumento em sua expressão, o que ocasiona o aumento das expressões dos genes Col3a1 e Col1a1, em sequência, respectivamente (Jurzak *et al.*, 2014). Dessa forma, pelo colágeno do tipo I ser um colágeno mais tardio em seu aparecimento, pode ter sido o motivo de não ter ocorrido esse aumento substancial. Witte e Barbul apresentam em sua revisão sobre regeneração cutânea a progressão dos diferentes componentes da matriz extracelular conforme os dias da lesão cutânea. Tais pesquisadores demonstraram que a deposição do colágeno do tipo III ocorre horas após a lesão, enquanto o colágeno do tipo I somente começa a ser depositado no segundo dia da lesão. Entretanto, a partir do terceiro dia pós-lesão, a síntese de colágeno do tipo I já ultrapassa a de colágeno do tipo III (Witte e Barbul, 1997). De toda forma, os grupos PDLLA/Lam e PDLLA + células, apresentaram-se com expressão gênica estatisticamente semelhante ao grupo controle sadio, evidenciando um nível salutar de expressão desse gene, embora pela lesão causada esperava-se que todos os grupos apresentassem uma maior necessidade de produção de fibras colágenas.

Por serem utilizados diferentes materiais, assim como diferentes células no modelo animal, criou-se o questionamento se esses biomateriais não poderiam influenciar a atividade celular das células dos animais, estimulando a apoptose, por exemplo. Dessa forma, genes da família Bcl foram pesquisados.

Intracelularmente, a indução de apoptose é parcialmente mediada por vários genes, tais como p53, Bcl-2, Bax e p21. Sabe-se que o aumento da expressão de Bcl-2 inibe a apoptose induzida por uma variedade de estímulos, ao passo que a predominância de BAX sobre o Bcl-2 acelera a apoptose mediante estímulos apoptóticos (Jurzak *et al.*, 2014).

Em resposta ao estresse, ocorre a formação de homodímero de BAX, com consequente liberação de citocromo c pelas mitocôndrias, o que resulta na ativação da enzima caspase-9 e, por fim, a apoptose. Já homodímeros de Bcl-2 fazem o oposto, exercendo um papel protetor, ao estabilizar a membrana mitocondrial (Jurzak *et al.*, 2014). Ainda, a relação BAX/Bcl-2 determina a susceptibilidade das células à apoptose, ou seja, quanto maior a quantidade de BAX e/ou quanto menor a quantidade de Bcl-2, mais susceptível estará a célula à apoptose (Sultan *et al.*, 2012).

Como pode ser observado na Figura 23, com relação à expressão de ambos os genes, não houve diferença estatística entre os grupos testados com biomateriais e o grupo Controle sadio. A relação BAX/Bcl-2 também ficou bastante semelhante, o que pode ser observado pelo nível de similaridade de expressão entre esses genes nos grupos com os biomateriais e o grupo controle sadio. Além disso, os grupos onde foram semeadas células nos *scaffolds*



também não apresentaram diferenças, indicando que as mesmas não foram prejudiciais em termos de apoptose celular. Já o grupo controle lesão teve muito menor expressão de ambos os genes quando comparados com todos os outros grupos, embora não tenha sido estatisticamente significativa para todas as comparações.

A análise histológica dos diferentes grupos de biomateriais testados corroborou alguns resultados da análise gênica, como será discutido a seguir.

O grupo controle lesão que apresentou os menores níveis de expressão de VEGF, Col1a1 e o maior desbalanço entre BAX/Bcl2 foi o que apresentou um tecido mais desorganizado, não tendo sido observada a formação de epiderme em nenhum dos animais, oposto ao que ocorreu em todos os outros grupos testados. A menor vascularização, provavelmente, favoreceu a formação de uma ferida esteticamente mais grosseira. Além disso, o grande infiltrado inflamatório ainda presente no leito da lesão demonstrou que esse tecido ainda se encontrava em fase inicial de regeneração tecidual (Fronza *et al.*, 2014).

Embora tenha sido evidenciada a formação de camada epidérmica próximo às bordas do defeito cutâneo nos grupos PDLLA/Lam e PDLLA e também na região central nos grupos PDLLA/Lam + células e PDLLA + células, em nenhum animal testado com os biomateriais e biomateriais com células foi verificada a presença de anexos de pele, como ocorre na pele sadia, evidenciando que, embora tenha ocorrido regeneração de pele, essa não foi estruturalmente completa. Em trabalhos separados, os pesquisadores Dearman e Lorden também demonstraram regeneração tecidual com biomateriais, sem a formação dos anexos de pele, assim como tecidos recém-formados vascularizados em 7 a 10 dias após a lesão cutânea. (Dearman, Li e Greenwood, 2014; Lorden *et al.*, 2015). Ainda, Dearman observou, por meio de análise histológica, em porcos, após 21 dias de experimentação, a formação completa de epiderme e sobre essa, a presença de uma carapaça, formada pelo biomaterial implantado juntamente com queratinócitos e fibroblastos (Dearman, Li e Greenwood, 2014). No presente estudo, o mesmo foi observado nos camundongos *nude* onde foram aplicados biomateriais + células. Como pode ser visualizado nas figuras 23 e 26, esses animais ainda tinham os biomateriais íntegros sobre a lesão, entretanto em alguns deles já foi possível visualizar a epiderme em toda a extensão da ferida.

As células semeadas nos biomateriais, nesse sentido, pareceram ter tido um efeito benéfico sobre a cicatrização da ferida, uma vez que estimularam a produção da camada epidérmica completa em alguns animais, como pode ser observado nos grupos PDLLA/Lam + células e PDLLA + células. Esse fato é uma vantagem em relação à sua utilização em

pacientes queimados, visto que, dessa forma, ficam menos expostos ao meio externo e, conseqüentemente, menos susceptíveis a infecções.

Em termos de regeneração da camada dérmica, não houve diferença entre os diferentes animais tratados com biomateriais e biomateriais + células, visto que todos apresentaram derme bem formada. Isso, em última instância, demonstra a capacidade dos *scaffolds* agirem como uma ponte, onde as células do receptor podem se ancorar para produzir o novo tecido, visto que mesmo os biomateriais nos quais as células não foram semeadas previamente foram capazes de produzir um tecido histologicamente homogêneo.

Ainda, em alguns biomateriais também foi possível verificar a presença de células inflamatórias, principalmente em locais onde ainda estava ocorrendo a regeneração cutânea. Esse fenômeno ocorreu em menor concentração nos biomateriais em comparação ao que foi encontrado no controle lesão, o que demonstra que o tecido de granulação estava sendo gerado ou já estava gerado, sendo a formação do novo tecido, o passo seguinte a ocorrer. Em um trabalho desenvolvido por Lorden e colaboradores, utilizando-se camundongos selvagens, ainda foi possível verificar a presença de infiltrado inflamatório moderado após 30 dias da lesão cutânea, fazendo parte da resposta inflamatória aguda que guia a regeneração cutânea (Lorden *et al.*, 2015). Dessa forma, a inflamação moderada parece ser necessária para o processo de regeneração adequado, diferente do ocorrido no grupo lesão, onde a inflamação mais pronunciada parece ter ocasionado uma cicatrização heterogênea, com formação de um tecido desorganizado.

Logo, por meio dos resultados obtidos na análise de expressão gênica e histológica, não foi possível determinar uma possível vantagem na utilização da proteína laminina nos biomateriais de PDLLA/Lam quando comparados aos biomateriais de PDLLA, embora através das análises visuais e de tamanho da ferida, essa proteína tenha apresentado vantagens perceptíveis.

Por fim, devido aos resultados obtidos no presente estudo, pretende-se realizar novos experimentos animais, com seguimento dos mesmos por um período de tempo maior, verificando o fechamento da ferida em todos os animais para, posteriormente, realizar-se testes de expressão gênica e análise histológica, a fim de se ter uma real perspectiva dos efeitos da laminina sobre a cicatrização dos animais. Entretanto, com os resultados aqui apresentados foi possível verificar que os biomateriais produzidos foram eficazes na cicatrização tecidual e apresentaram vantagens reais com relação ao grupo controle lesão, o que os coloca como potenciais biomateriais para utilização na engenharia de tecidos de pele.

## 6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de biomateriais de PDLLA e biomateriais funcionalizados com a proteína laminina foi possível e demonstrado no presente estudo. Essas matrizes foram desenvolvidas com 2 diâmetros de fibras, formando um biomaterial bicamada, mimetizando a estrutura da pele, formada por epiderme e derme.

Ainda, os *scaffolds* foram caracterizados físico-quimicamente, apresentando boas propriedades para utilização como substitutos de pele, tendo sido implantados em camundongos *nude* de forma adequada, por um período de 9 dias.

As análises biológicas, por meio de melhores resultados de adesão e viabilidade celular, demonstraram uma maior preferência das células pelas matrizes de PDLLA/Lam, embora não tenham ocorrido diferenças estatísticas em todos os casos. As análises histológicas dos biomateriais mostraram CTMs e queratinócitos em todos os dias avaliados, apresentando as células menos diferenciadas nos *scaffolds* de PDLLA/Lam.

Nos experimentos animais, os biomateriais mostraram-se compatíveis com o ambiente animal, assim como os resultados de análise histológica e de expressão gênica demonstraram que os mesmos tiveram vantagens em termos de angiogênese, processos apoptóticos, expressão de pró-colágeno do tipo 1 e formação da camada epidérmica, quando comparados ao grupo controle lesão. As células semeadas nos biomateriais e implantadas nos animais, em 9 dias, pareceram desencadear efeitos positivos sobre a cicatrização da lesão, visto que houve formação de camada epidérmica em toda a extensão da lesão, em alguns animais.

Portanto, ambos os biomateriais testados, principalmente os biomateriais de PDLLA e PDLLA/Lam, com preferência por esse último, mostraram bons resultados iniciais em termos de compatibilidade dos materiais e aparente regeneração cutânea e, por isso, acredita-se que possam apresentar sucesso no uso futuro para a engenharia de tecidos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. **Adv Mater**, v. 21, n. 32-33, p. 3343-51, Sep 4 2009. ISSN 1521-4095 (Electronic)
- AKINBINGOL, G. et al. Wound healing at adaptation zones of skin flaps harvested from acute burned skin. **Burns**, v. 39, n. 6, p. 1206-11, Sep 2013. ISSN 1879-1409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541158> >.
- ALREFAI, M. T. et al. Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy. **Stem Cells Cloning**, v. 8, p. 81-101, 2015. ISSN 1178-6957 (Electronic)
- 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**, v. 28, n. 6, p. 1014-26, Feb 2007. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17125831> >.
- ANKRUM, J. A.; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 3, p. 252-60, Mar 2014. ISSN 1546-1696 (Electronic)
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- \_\_\_\_\_. **Polímeros reabsorvíveis na engenharia de tecidos.** Polímeros: Ciência e Tecnologia. 15: 13-21 p. 2005.
- BERNARDI, L. et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **J Endod**, v. 37, n. 7, p. 973-9, Jul 2011. ISSN 1878-3554 (Electronic)
- BLAKER, J. J. et al. In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. **J Biomed Mater Res A**, v. 67, n. 4, p. 1401-11, Dec 2003. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624528> >.

- BOCCAFOSCHI, F. et al. The biological response of poly(L-lactide) films modified by different biomolecules: role of the coating strategy. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 9, p. 2373-81, Sep 2012. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528472> >.
- BOUDRIOT, U. et al. Role of electrospun nanofibers in stem cell technologies and tissue engineering. **Macromolecular Symposia**, v. 225, p. 09-16, 2005.
- BRAGHIROLI, D. I.; STEFFENS, D.; PRANKE, P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. **Drug Discov Today**, v. 19, n. 6, p. 743-53, Jun 2014. ISSN 1878-5832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704459> >.
- BROWN, L. F. et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J Exp Med**, v. 176, n. 5, p. 1375-9, Nov 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402682> >.
- BURD, A.; AYYAPPAN, T.; HUANG, L. Blood Cord: Opportunities and Challenges for the Reconstructive Surgeon. In: BHATTACHARYA, N. e STUBBLEFIELD, P. (Ed.). **Frontiers of Cord Blood Science**. United States of America: Springer, v.24, 2009. cap. 12, p.273-284.
- BURDICK, J. A.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n. 2, p. 205-19, Feb 2009. ISSN 1937-3341 (Print)
- CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 2, p. 341-7, Nov 2007. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620285> >.
- CATERSON, E. J. et al. Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. **MedGenMed**, p. E1, Feb 2001. ISSN 1531-0132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11320340> >.
- CHIANG, L. Y. et al. Laminin-332 coordinates mechanotransduction and growth cone bifurcation in sensory neurons. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 8, p. 993-1000, Aug 2011. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725315> >.

- COTRAN, R. Z. K., V. COLLINS, T. Tissue Repair: Cellular Growth, Fibrosis, and Wound Healing. In: COTRAN, R. Z. K., V. e COLLINS, T. (Ed.). **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Sixth. USA: Saunders Company, 1999. cap. 4, p.1425. ISBN 0-7216-7335-X.
- CUNHA, C. et al. 3D culture of adult mouse neural stem cells within functionalized self-assembling peptide scaffolds. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 943-55, 2011. ISSN 1178-2013 (Electronic)
- DAAR, A. S.; GREENWOOD, H. L. A proposed definition of regenerative medicine. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 1, n. 3, p. 179-84, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1932-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18038409> >.
- DALEY, J. M. et al. The phenotype of murine wound macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 1, p. 59-67, Jan 2010. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20052800> >.
- DATASUS. 2016.
- DEARMAN, B. L.; LI, A.; GREENWOOD, J. E. Optimization of a polyurethane dermal matrix and experience with a polymer-based cultured composite skin. **J Burn Care Res**, v. 35, n. 5, p. 437-48, Sep-Oct 2014. ISSN 1559-0488 (Electronic)
- DERSCH, R.; GREINER, A.; WENDORFF, J.-H. Polymer Nanofibers by electrospinning. In: (Ed.). **Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**: Marcel Dekker, Inc. , 2004. p.2931.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.
- DOMOGATSKAYA, A.; RODIN, S.; TRYGGVASON, K. Functional diversity of laminins. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 28, p. 523-53, 2012. ISSN 1530-8995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23057746> >.
- DOS SANTOS, B. F. **Camundongos mutantes mais utilizados**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 ISBN 85-7541-015-6.

- DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 35, n. 2–3, p. 151-160, 1995. ISSN 0304-3886. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304388695000418> >.
- ELLIOTT, T. R. et al. Does participation mediate the prospective relationships of impairment, injury severity, and pain to quality of life following burn injury? **J Health Psychol**, Apr 2015. ISSN 1461-7277. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869727> >.
- FERREIRA, C. M.; D´ASSUMPÇÃO, E. A. Hypertrophic scars and keloids. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 21, n. 1, p. 40-48, 2006.
- FRONZA, M. et al. Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112297, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25393024> >.
- FUJIMORI, Y. et al. Skin regeneration for children with burn scar contracture using autologous cultured dermal substitutes and superthin auto-skin grafts: preliminary clinical study. **Ann Plast Surg**, v. 57, n. 4, p. 408-14, Oct 2006. ISSN 0148-7043. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998333> >.
- FUKUSHIMA, K.; FEIJOO, J.; YANG, M. Comparison of abiotic and biotic degradation of PDLA, PCL and partially miscible PDLA/PCL blend. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 3, p. 706-717, MAR 2013 2013. ISSN 0014-3057.
- GAMONAL, A. **Dermatologia elementar: compêndio de dermatologia**. Segunda edição. Juiz de Fora: Sampaio & Rivitti, 2002.
- GAUVIN, R.; KHADEMHOSEINI, A. Microscale technologies and modular approaches for tissue engineering: moving toward the fabrication of complex functional structures. **ACS Nano**, v. 5, n. 6, p. 4258-64, Jun 28 2011. ISSN 1936-086X (Electronic)
- GAY, D. et al. Fgf9 from dermal  $\gamma\delta$  T cells induces hair follicle neogenesis after wounding. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 916-23, Jul 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727932> >.

- GHASEMI-MOBARAKEH, L. et al. Structural properties of scaffolds: Crucial parameters towards stem cells differentiation. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 4, p. 728-44, May 26 2015. ISSN 1948-0210 (Electronic)
- GHOHESTANI, R. F. et al. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. **Clin Dermatol**, v. 19, n. 5, p. 551-62, 2001 Sep-Oct 2001. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11604302> >.
- GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 46, n. 30, p. 5670-703, 2007. ISSN 1433-7851 (Print)
- GRINNELL, F. Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices. **J Bodyw Mov Ther**, v. 12, n. 3, p. 191-3, Jul 2008. ISSN 1532-9283. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19083673> >.
- GUTHRIE, K. M. et al. Antibacterial efficacy of silver-impregnated polyelectrolyte multilayers immobilized on a biological dressing in a murine wound infection model. **Ann Surg**, v. 256, n. 2, p. 371-7, Aug 2012. ISSN 1528-1140 (Electronic)
- HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. Terceira edição. São Paulo: Senac, 2009.
- HAVRAN, W. L.; JAMESON, J. M. Epidermal T cells and wound healing. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5423-8, May 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483798> >.
- HENCH, L. L. Millennium challenge mini-symposium: (ii) The challenge of orthopaedic materials. **Current Orthopaedics**, v. 14, p. 7-15, 2000.
- HERSON, M. R. et al. In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. **Artif Organs**, v. 25, n. 11, p. 901-6, Nov 2001. ISSN 0160-564X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11903144> >.
- HOHMANN, M. M. et al. **Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability Theorie**. PhysFluids. 13: 2201-2220 p. 2001.



- HOSSEINKHANI, M. et al. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. **World J Plast Surg**, v. 3, n. 1, p. 3-7, Jan 2014. ISSN 2228-7914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489516> >.
- HOU, L. et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. **Int J Hematol**, v. 78, n. 3, p. 256-61, Oct 2003. ISSN 0925-5710. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604286> >.
- HOZUMI, K. et al. Reconstitution of laminin-111 biological activity using multiple peptide coupled to chitosan scaffolds. **Biomaterials**, v. 33, n. 17, p. 4241-50, Jun 2012. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436803> >.
- HUANG, Z. M. et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Compos Sci Technol**, v. 63, 2003.
- HUSSAIN, D. et al. Structure property correlations for electrospun nanofiber nonwovens. **Polymer**, v. 51, n. 17, p. 3989-3997, AUG 4 2010 2010. ISSN 0032-3861.
- JIN, G.; PRABHAKARAN, M. P.; RAMAKRISHNA, S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 7, n. 8, p. 3113-22, Aug 2011. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550425> >.
- JU, X. L. et al. [Biological characteristics and induced differentiation ability of in vitro expanded umbilical cord blood mesenchymal stem cells]. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**, v. 43, n. 7, p. 499-502, Jul 2005. ISSN 0578-1310. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083548> >.
- JUNKA, R. et al. Laminin Functionalized Biomimetic Nanofibers For Nerve Tissue Engineering. **J Biomater Tissue Eng**, v. 3, n. 4, p. 494-502, Aug 2013. ISSN 2157-9083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083073> >.
- JURZAK, M. et al. Evaluation of genistein ability to modulate CTGF mRNA/protein expression, genes expression of TGF $\beta$  isoforms and expression of selected genes regulating cell cycle in keloid fibroblasts in vitro. **Acta Pol Pharm**, v. 71, n. 6, p. 972-86, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 0001-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25745770> >.

- KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A.-C. **Abiotic and biotic degradation of aliphatic polyesters from “petro” versus “green” resources.** *Macromolecular Symposia*, v. 127, p. 219-225, 1998.
- KATARI, R.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. *Front Bioeng Biotechnol*, v. 2, p. 57, 2014. ISSN 2296-4185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25629029> >.
- KIM, J.-E. et al. A Fibronectin Peptide-Coupled Biopolymer Nanofibrous Matrix to Speed Up Initial Cellular Events **ADVANCED ENGINEERING MATERIALS**, v. 12, n. 4, p. 94-100, 2010.
- KIM, J. A. et al. High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials*, v. 34, n. 34, p. 8555-63, Nov 2013. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937911> >.
- KRONSTEINER, B. et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev*, v. 20, n. 12, p. 2115-26, Dec 2011. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21381973> >.
- KU, S. H.; PARK, C. B. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, n. 36, p. 9431-7, Dec 2010. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880578> >.
- KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng*, v. 5, p. 2041731414557112, 2014. ISSN 2041-7314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25610589> >.
- LEE, S. Y.; KIM, H. J.; CHOI, D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation. *Int J Stem Cells*, v. 8, n. 1, p. 36-47, May 2015. ISSN 2005-3606 (Print)
- LEITE, F. **Apagão traz risco de queimaduras.** *Folha Online*. São Paulo: Folha de São Paulo 2001.

- LEONARDI, D. et al. Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermal substitute improve repair in full-thickness skin wounds. **Burns**, v. 38, n. 8, p. 1143-50, Dec 2012. ISSN 1879-1409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998897> >.
- LI, D.; XIA, Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinvented the wheel? **Advanced Materials**, v. 16, n. 14, p. 1151-1170, 2004.
- LORDEN, E. R. et al. Mitigation of hypertrophic scar contraction via an elastomeric biodegradable scaffold. **Biomaterials**, v. 43, p. 61-70, Mar 2015. ISSN 1878-5905 (Electronic)
- LOU, T. et al. Bi-layer scaffold of chitosan/PCL-nanofibrous mat and PLLA-microporous disc for skin tissue engineering. **J Biomed Nanotechnol**, v. 10, n. 6, p. 1105-13, Jun 2014. ISSN 1550-7033. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749404> >.
- LU, L. et al. The temporal effects of anti-TGF-beta 1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 201, p. 391-397, 2005.
- LU, W. et al. Mixture of fibroblasts and adipose tissue-derived stem cells can improve epidermal morphogenesis of tissue-engineered skin. **Cells Tissues Organs**, v. 195, n. 3, p. 197-206, 2012. ISSN 1422-6421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21494022> >.
- MAMMADOV, B. et al. Cooperative effect of heparan sulfate and laminin mimetic peptide nanofibers on the promotion of neurite outgrowth. **Acta Biomater**, v. 8, n. 6, p. 2077-86, Jul 2012. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342826> >.
- MAQUET, V. et al. Porous poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterisation. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4185-94, Aug 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15046908> >.
- MARTINO, M. M. et al. Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 3, p. 45, 2015. ISSN 2296-4185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883933> >.

- MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? **Genes Nutr**, v. 4, n. 1, p. 13-22, Mar 2009. ISSN 1555-8932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104883> >.
- METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **J R Soc Interface**, v. 4, n. 14, p. 413-37, Jun 2007. ISSN 1742-5689. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251138> >.
- MICHAEL, S. et al. The mouse dorsal skin fold chamber as a means for the analysis of tissue engineered skin. **Burns**, v. 39, n. 1, p. 82-8, Feb 2013. ISSN 1879-1409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22717134> >.
- MIDDELKOOP, E. et al. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1559-67, Apr 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697858> >.
- MIRSHAHI, F. et al. SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. **Thromb Res**, v. 99, n. 6, p. 587-94, Sep 2000. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974345> >.
- MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, May 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716973> >.
- MOHD HILMI, A. B.; HALIM, A. S. Vital roles of stem cells and biomaterials in skin tissue engineering. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 428-36, Mar 2015. ISSN 1948-0210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25815126> >.
- NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. **J Biomater Appl**, v. 26, n. 4, p. 383-417, Nov 2011. ISSN 1530-8022 (Electronic)
- NAKAGAWA, H. et al. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. **Br J Dermatol**, v. 153, n. 1, p. 29-36, Jul 2005. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16029323> >.

- NAVARRO, M. et al. Development of a Biodegradable Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering: Physicochemical, Topographical, Mechanical, Degradation, and Biological Properties **Adv Polym Sci**, v. 200, p. 209–231, 2006.
- NOURBAKHS, N. et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. **Int J Dev Biol**, v. 55, n. 2, p. 189-95, 2011. ISSN 1696-3547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671222> >.
- OU, K. L.; HOSSEINKHANI, H. Development of 3D in vitro technology for medical applications. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 10, p. 17938-62, 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25299693> >.
- PELIPENKO, J.; KOCBEK, P.; KRISTL, J. Nanofiber diameter as a critical parameter affecting skin cell response. **Eur J Pharm Sci**, v. 66C, p. 29-35, Oct 2014. ISSN 1879-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25301202> >.
- PETIT, I.; JIN, D.; RAFII, S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. **Trends Immunol**, v. 28, n. 7, p. 299-307, Jul 2007. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17560169> >.
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele** Terceira edição. São Paulo: Andrei, 1998.
- POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 6, n. 3, p. 230-47, 1995. ISSN 1045-4411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8785263> >.
- POWELL, H. M.; SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. **Biomaterials**, v. 29, n. 7, p. 834-43, Mar 2008. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054074> >.
- PRANKE, P. et al. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 12, p. 1775-89, Dec 2005. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302092> >.

- QIANG, B. et al. Perlecan heparan sulfate proteoglycan is a critical determinant of angiogenesis in response to mouse hind-limb ischemia. **Can J Cardiol**, v. 30, n. 11, p. 1444-51, Nov 2014. ISSN 1916-7075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25249499> >.
- REKHA, K. R.; SELVAKUMAR, G. P. Gene expression regulation of Bcl2, Bax and cytochrome-C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease. **Chem Biol Interact**, v. 217, p. 57-66, Jun 2014. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24768735> >.
- REMACHA, A. R. et al. Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 165, n. 3-4, p. 107-18, Jun 2015. ISSN 1873-2534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977164> >.
- RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Growth of cultured mammalian cells on secondary glucose sources. **Cell**, v. 2, n. 4, p. 287-93, Aug 1974. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4528581> >.
- RHO, K. S. et al. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1452-61, Mar 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16143390> >.
- ROETHER, J. A. et al. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, n. 18, p. 3871-8, Sep 2002. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164192> >.
- ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, n. 1, p. 105-10, 2003. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529557> >.
- ROUSSELLE, P.; BECK, K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. **Cell Adh Migr**, v. 7, n. 1, p. 122-34, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1933-6926. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263634> >.

- RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v. 238, n. 4826, p. 491-7, Oct 1987. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2821619> >.
- SALGADO, A. J. et al. Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future. **Int Rev Neurobiol**, v. 108, p. 1-33, 2013. ISSN 0074-7742. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083429> >.
- SALMASI, S. et al. Role of nanotopography in the development of tissue engineered 3D organs and tissues using mesenchymal stem cells. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 266-80, Mar 2015. ISSN 1948-0210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25815114> >.
- SANTIBAÑEZ, J. F.; QUINTANILLA, M.; BERNABEU, C. TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 121, n. 6, p. 233-51, Sep 2011. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615335> >.
- SCHULZ, J. T.; TOMPKINS, R. G.; BURKE, J. F. Artificial skin. **Annu Rev Med**, v. 51, p. 231-44, 2000. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774462> >.
- SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 146-50, Jan 2008. ISSN 1549-4918 (Electronic)
- SHIELDS, K. J. et al. Mechanical properties and cellular proliferation of electrospun collagen type II. **Tissue Eng**, v. 10, n. 9-10, p. 1510-7, 2004 Sep-Oct 2004. ISSN 1076-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588410> >.
- SHUKLA, A. et al. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 244, n. 2, p. 434-9, Mar 1998. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9514941> >.
- SILVA, F. E. S. et al. Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98050, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24846008> >.

SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci** **1**, v. 119, n. 11, p. 2204-13, 2006.

SONG, Y.; ZHU, L.; LI, M. Antifibrotic effects of crocetin in scleroderma fibroblasts and in bleomycin-induced sclerotic mice. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 10, p. 1350-7, Oct 2013. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212843> >.

STANDRING, S. **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. . 40. New York: Churchill Livingstone 2008.

STEFFENS, D. et al. A new biomaterial of nanofibers with the microalga *Spirulina* as scaffolds to cultivate with stem cells for use in tissue engineering. **J Biomed Nanotechnol**, v. 9, n. 4, p. 710-8, Apr 2013. ISSN 1550-7033 (Print)

SUGAWARA, K. et al. Laminin-332 and -511 in skin. **Exp Dermatol**, v. 17, n. 6, p. 473-80, Jun 2008. ISSN 1600-0625. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474082> >.

SULTAN, S. M. et al. Fat grafting accelerates revascularisation and decreases fibrosis following thermal injury. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 65, n. 2, p. 219-27, Feb 2012. ISSN 1878-0539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962530> >.

SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 941-5, Nov 2014. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414301> >.

SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. **Clin Dermatol**, v. 23, n. 4, p. 403-12, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023936> >.

SÁNCHEZ-ABARCA, L. I. et al. Uptake and delivery of antigens by mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 673-8, Jun 2013. ISSN 1477-2566. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23522868> >.



- TANIKAWA, D. Y. et al. Ultrastructural evaluation of human keratinocyte growth and differentiation on a fibrin substrate. **Acta Cir Bras**, v. 25, n. 6, p. 541-8, Dec 2010. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21120288> >.
- TENG, Y. D. et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3024-9, Mar 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867737> >.
- TSUJI, H.; MIYAUCHI, S. Enzymatic hydrolysis of poly(lactide)s: effects of molecular weight, L-lactide content, and enantiomeric and diastereoisomeric polymer blending. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 597-604, 2001. ISSN 1525-7797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749226> >.
- UTIKAL, J. et al. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 19, p. 3502-10, Oct 2009. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723802> >.
- VENUGOPAL, J. R. et al. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. **J R Soc Interface**, v. 9, n. 66, p. 1-19, Jan 7 2012. ISSN 1742-5662 (Electronic)
- WALRAVEN, M.; BEELEN, R. H.; ULRICH, M. M. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling in healthy human fetal skin: A descriptive study. **J Dermatol Sci**, v. 78, n. 2, p. 117-24, May 2015. ISSN 1873-569X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795202> >.
- WANG, C.; CHIEN, H. S.; YAN, K. W. Correlation between processing parameters and microstructure of electrospun poly(D,L-lactic acid) nanofibers. **Polymer**, v. 50, p. 6100-6110 2009.
- WANG, H. M. et al. Novel biodegradable porous scaffold applied to skin regeneration. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e56330, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762223> >.
- WEI, J. D. et al. Characterizations of chondrocyte attachment and proliferation on electrospun biodegradable scaffolds of PLLA and PBSA for use in cartilage tissue

- engineering. **J Biomater Appl**, v. 26, n. 8, p. 963-85, May 2012. ISSN 1530-8022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21273264> >.
- WHEELDON, I. et al. Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions. **Nanotechnology**, v. 22, n. 21, p. 212001, May 27 2011. ISSN 1361-6528 (Electronic)
- WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am**, v. 77, n. 3, p. 509-28, Jun 1997. ISSN 0039-6109 (Print)
- XU, C. et al. In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. **J Biomed Mater Res A**, v. 71, n. 1, p. 154-61, Oct 2004. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15368265> >.
- YAMAGUCHI, R. et al. Bone marrow-derived myofibroblasts recruited to the upper dermis appear beneath regenerating epidermis after deep dermal burn injury. **Wound Repair Regen**, v. 15, n. 1, p. 87-93, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 1067-1927. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244324> >.
- ZANATTA, G. et al. Mesenchymal stem cell adherence on poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanofibers scaffold is integrin-beta 1 receptor dependent. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 2, p. 211-8, Apr 2012. ISSN 1550-7033 (Print)
- \_\_\_\_\_. Viability of mesenchymal stem cells during electrospinning. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 2, p. 125-30, Feb 2012. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22183245> >.
- ZANDER, N. E. et al. Quantification of protein incorporated into electrospun polycaprolactone tissue engineering scaffolds. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 4, n. 4, p. 2074-81, Apr 2012. ISSN 1944-8252. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22409446> >.
- ZHENG, Y. H. et al. Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. **Exp Ther Med**, v. 5, n. 6, p. 1576-1580, Jun 2013. ISSN 1792-0981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23837034> >.
- ZONARI, A. et al. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) bilayer skin tissue engineering constructs with improved epidermal rearrangement. **Macromol Biosci**, v. 14, n. 7, p.

977-90, Jul 2014. ISSN 1616-5195. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596239> >.

**ANEXO 1:** Artigo “Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute”, aceito para publicação pela revista *Regenerative Medicine*.

Research Article

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)



## Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute

**Aim:** The present study has aimed to produce a cutaneous substitute, bringing together stem cells (mesenchymal stem cells) and keratinocytes, and an electrospun biomaterial. **Materials & methods:** Three groups of scaffolds were studied: group 1, poly-DL-lactic acid (PDLLA); group 2, hydrolyzed PDLLA (PDLLA/NaOH) and group 3, PDLLA/Lam – a PDLLA/NaOH scaffold linked to laminin protein. They were characterized by physicochemical and biological parameters. **Results:** As a result, the scaffolds presented well-formed and randomly distributed fibers. Group 3 showed the greatest hydrophilic characteristics. Group 1 showed a greater degradation rate after 14 days. Groups 2 and 3 presented molecular weight of about 40–50 Da. In general, group 3 showed the best results concerning cell adhesion and viability. **Conclusion:** This study associated two revolutionary fields, stem cells and nanotechnology, for use in regenerative medicine.

**Keywords:** electrospinning • keratinocytes • laminin • scaffolds • skin substitute • stem cells • tissue engineering

The use of scaffolds for regenerative medicine shows strong signs of being a good strategy in the treatment of tissue and organ lesions and has great potential for regenerating many kinds of tissue, skin, vasculature, bone, neural, cartilage and tendon/ligament [1–3]. This new strategy aims to use cells cultivated in scaffolds to replace or restore tissue that has been damaged due to disease, accidents or congenital defects.

There are some commercially available skin substitutes nowadays, which can be divided into epidermic, dermic and composite equivalents [4–6]. Epidermic equivalents generally consist of a keratinocyte slice, isolated from a donor and expanded in a laboratory. The dermic substitutes are usually acellular and made from xenogeneic sources, such as bovine or porcine collagen. Composite substitutes usually consist of a multicell culture, using allogeneic keratinocytes and fibroblasts. They have the advantages of providing growth factors, cytokines, extracellular matrix and other

elements, as well as a cover for the wound. The acellular constructions are easier to develop; however, they do not vascularize well and do not incorporate well in the wound lesion in patients [4,6,7].

The mainly used commercially available skin substitutes are made from collagen, quitin and fibrin [4]. There is also the artificially manufactured skin substitutes which commonly use poly-lactic acid and poly-glycolic acid as biomaterials, for example [7]. Further information concerning the main available substitutes clinically used can be found in Mohd Hilmi and Halim [4].

Available treatment is insufficient in preventing scarring and promotes healing of the patient, especially in large burns and chronic wounds [8,9]. Thus, the regeneration of skin is an important field for tissue engineering [8,10].

Because of this, the development of a biocompatible and biodegradable scaffold, for use in the lesion area allows greater contact and interaction of cells at the lesion site, as

Daniela Steffens<sup>\*1,2</sup>, Monica B Mather<sup>3</sup>, Bruna TS Santi<sup>2</sup>, Dayane P Luco<sup>4</sup> & Patricia Pranke<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Hematology & Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

<sup>2</sup>Post-graduate Program in Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 05508-000, Brazil

<sup>4</sup>Stem Cell Research Institute (Instituto de Pesquisa com Células-tronco), Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90020-010, Brazil

\*Authors for correspondence:

Tel.: +55 513 308 5257

Fax: +55 513 308 5437

[dani\\_ste@hotmail.com](mailto:dani_ste@hotmail.com)



**ANEXO 2:** Produção científica realizada durante o período do doutorado.*Patentes:*

- 1) Patente requerida referente ao projeto de doutorado, intitulada “Substituto Tissular, Composição, Processo de Obtenção, Uso de Substituto Tissular e Processo de Regeneração Tecidual”.

*Capítulos de livro:*

- 1) PRANKE, P.; STEFFENS, D. Nanomedicine and Tissue Engineering. In: Naira Maria Balzaretta. (Org.). Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia. 1ªed.Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

*Prêmios:*

- 1) Prêmio Roberto Chem pelo trabalho “Development of a new biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as skin substitute”, apresentando no Congresso Brasileiro de Queimaduras, 2014.

*Artigos publicados:*

- 1) WERLE, S. B.; LINDEMANN, D.; DEMARCO, F. F.; DE ARAUJO, F. B.; PRANKE, P.; CASAGRANDE, L. Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clinical Oral Investigation*, v. 20, n. 1, p. 75-81, Jan. 2016.
- 2) STEFFENS, D.; ALVARENGA REZENDE, R.; SANTI, B.; ALENCAR DE SENA PEREIRA, F. D.; INFORÇATTI NETO, P.; LOPES DA SILVA, J. V.; PRANKE, P. 3D-printed PCL scaffolds for the cultivation of mesenchymal stem cells. *J Appl Biomater Funct Mater*, Dez. 2015.
- 3) STEFFENS, D.; MATHOR, M. B.; SANTI, B. T.; LUCO, D. P.; PRANKE, P. Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute. *Regenerative Medicine*, v. 10, n.8, p. 975-87, Nov. 2015.
- 4) JOTZ, G. P.; SOSTER, P. R. L.; KUNRATH, S. O.; STEFFENS, D.; BRAGHIROLI, D. I.; ZETTLER, C. G.; BECK, C. A.; MUCCILLO, M.;

- LOPES, R. F. F.; MASTELLA, B.; PRANKE, P. Mesenchymal stem cells and nanofibers as scaffolds for the regeneration of thyroid cartilage. *The Laryngoscope*, v. 124, n. 12, p. 455-460, Dez. 2014.
- 5) STEFFENS, D.; LEONARDI, D.; SOSTER, P. R. L.; LERSCH, M.; ROSA, A.; CRESTANI, T.; SCHER, C.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; PRANKE, P. Development of a new nanofiber scaffold for use with stem cells in a third degree burn animal model. *Burns*, v. 40, n. 8, p. 1650-1660, Dez 2014.
  - 6) DE MORAIS, M. G.; MARTINS, V. G.; STEFFENS, D.; PRANKE, P; COSTA, J. A. V. Biological applications of nanobiotechnology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 14, p. 1007-1017, 2014.
  - 7) BRAGHIROLI, D. I.; STEFFENS, D.; QUINTILIANO, K.; ACASIGUA, G. A. X.; GAMBA, D.; FLECK, R. A.; PETZHOLD, C. L.; PRANKE, P. The effect of sterilization methods on electrospun poly(lactide- *co* -glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, v. 102, p. 700-708, 2014.
  - 8) BRAGHIROLI, D. I.; STEFFENS, D.; PRANKE, P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 6, p. 743-753, 2014.
  - 9) KESSLER, F.; STEFFENS, D.; LANDO, G. A.; PRANKE, P.; WEIBEL, D. E. Wettability and cell spreading enhancement in poly(sulfone) and polyurethane surfaces by UV-assisted treatment for tissue engineering purposes. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 11, p. 23-31, 2014.

## Cariou deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells

Stefanie Bressan Werle<sup>1</sup> · Daniele Lindemann<sup>1</sup> · Daniela Steffens<sup>2</sup> · Flávio Fernando Demarco<sup>3</sup> · Fernando Borba de Araujo<sup>1</sup> · Patricia Pranke<sup>2,4</sup> · Luciano Casagrande<sup>1</sup>

Received: 1 September 2014 / Accepted: 13 April 2015 / Published online: 22 April 2015  
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

### Abstract

**Objective** The objectives of this study are to isolate, cultivate, and characterize stem cells from the pulp of carious deciduous teeth (SCCD) and compare them to those retrieved from sound deciduous teeth (SHED—stem cells from human exfoliated deciduous teeth).

**Material and methods** Cells were obtained of dental pulp collected from sound ( $n=10$ ) and carious ( $n=10$ ) deciduous human teeth. Rate of isolation, proliferation assay (0, 1, 3, 5, and 7 days), STRO-1, mesenchymal (CD29, CD73, and CD90) and hematopoietic surface marker expression (CD14, CD34, CD45, HLA-DR), and differentiation capacity were evaluated. **Results** Isolation success rates were 70 and 80 % from the carious and sound groups, respectively. SCCD and SHED presented similar proliferation rate. There were no statistical differences between the groups for the tested surface markers. The cells from sound and carious deciduous teeth were positive for CD29, CD73, and CD90 and negative for CD14, CD34, CD45, and HLA-DR and were capable of differentiating into osteogenic, chondrogenic, and adipogenic lineages. **Conclusion** SCCD demonstrated a similar pattern of proliferation, immunophenotypical characteristics, and differentiation

ability as those obtained from sound deciduous teeth. These SCCD represent a feasible source of stem cells.

**Clinical relevance** Decayed deciduous teeth have been usually discarded once the pulp tissue could be damaged and the activity of stem cells compromised. These findings show that stem cells from carious deciduous teeth can be applicable source for cell-based therapies in tissue regeneration.

**Keywords** Dental pulp stem cells · Deciduous tooth · Caries · Proliferation · Differentiation

### Introduction

Populations of mesenchymal human stem cells have been isolated from the pulp of permanent (dental pulp stem cells—DPSCs) [1] and deciduous sound teeth (stem cells from human exfoliated deciduous teeth—SHED) [2]. Although these groups of cells share similar characteristics, SHED shows higher proliferation rates and better differentiation potential than DPSCs [3]. Moreover, deciduous teeth are more attractive because they physiologically exfoliate and pulp tissue is usually discarded [4, 5]. Thus, sound deciduous teeth, especially those in advanced exfoliation process [6], are considered a feasible stem cell source.

The use of dental pulp stem cells from sound teeth is successfully reported in several strategies of regeneration in animal models, like treatment of muscular dystrophy [7], corneal reconstruction [8], and repair of the central nervous system [9]. Moreover, DPSC and SHED are focus of dental researches and have showed promising results for pulp regeneration [10, 11] and bone repair in animal [12] and human [13] models.

Recent studies have shown conflicting results regarding the differentiation and proliferation potentials of stem cells obtained from the pulp of permanent teeth with deep carious lesions, which can be associated with the pulp inflammation stage [14–17]. The questions remains whether stem cells are modified

✉ Luciano Casagrande  
 luciano.casagrande@ufrgs.br

<sup>1</sup> Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Stem Cell Laboratory and Stem Cell Research Institute, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Department of Operatory Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

<sup>4</sup> Head of Hematology and Stem Cell Laboratory and Stem Cell Research Institute, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

## 3D-printed PCL scaffolds for the cultivation of mesenchymal stem cells

Daniela Steffens<sup>1,2</sup>, Rodrigo Alvarenga Rezende<sup>3</sup>, Bruna Santi<sup>2</sup>, Frederico David Alencar de Sena Pereira<sup>3</sup>, Paulo Inforçatti Neto<sup>3</sup>, Jorge Vicente Lopes da Silva<sup>3</sup>, Patricia Pranke<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Post-graduation Program of Biological Science – Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brazil

<sup>2</sup>Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brazil

<sup>3</sup>Division of 3D Technologies, Center for Information Technology Renato Archer (CTI), Campinas, São Paulo - Brazil

<sup>4</sup>Stem Cell Research Institute, Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brazil

### ABSTRACT

**Introduction:** Tissue engineering is a field which is currently under a great deal of investigation for the development and/or restoration of tissue and organs, through the combination of cell therapy with biomaterials. Rapid prototyping or additive manufacturing is a versatile technology which makes possible the fabrication of three dimensional (3D) structures from a wide range of materials with complex geometry and accuracy, such as scaffolds.

**Aim:** The aim of this study has been to investigate the interaction between mesenchymal stem cells with poly (ε-caprolactone) (PCL) biomaterials used for obtaining scaffolds through additive manufacturing.

**Materials and methods:** Scanning electron microscopy, confocal microscopy and biological assays were performed to analyse the successful interaction between the cells and the biomaterials.

**Results:** As a result, the number of viable cells attached to the scaffolds was lower when compared to the control group; however, it was possible to observe cells in the scaffolds since day 1 of analysis, with regions of confluence after 21 days of seeding.

**Conclusions:** To conclude, these biomaterials are interesting if used as medical artifacts, principally in tissue with prolonged regeneration time and which requires 3D supports with good mechanical properties.

**Keywords:** Stem cells, PCL, Rapid prototyping, Additive manufacturing, Tissue engineering, Regenerative medicine

### Introduction

The loss or failure of an organ or tissue represents frequent and devastating problems in health care. Thus, the need for substitutes to replace or repair tissue or problematic organs is overwhelming. Tissue engineering (TE), therefore, can provide a way of regenerating damaged tissue with the association of stem cells (SCs) with biomaterials (1, 2).

TE was first defined by Skalak and Fox (1998) (3) who defined it as the application of principles and methods of engineering and life sciences toward the fundamental understanding of structure-function relationships in normal and pathological mammalian tissues and the development of

biological substitutes to restore, maintain, or improve tissue function.

Under these considerations, scaffolds used in TE must provide sufficient initial mechanical strength and stiffness for wound contraction forces and later for the remodelling of the tissue. Furthermore, scaffold architecture should enhance initial cell attachment and subsequent migration into the matrix; it must also enhance the mass transfer of metabolites and provide sufficient space for remodelling of the organized tissue matrix and development of a vasculature (4).

Several techniques for manufacturing polymer-based scaffolds are available today; however, additive manufacturing offers the possibility of strictly controlling complex details, such as pore geometry, size, and interconnectivity, as well as the spatial distribution of pores within the structure, providing a more suitable 3D scaffold for cell growth in order to mimic the extracellular matrix (5, 6).

Nowadays, 3D printing or rapid prototyping is transforming into a manufacturing focused process and a Committee (F42) of the American Society for Testing and Materials (ASTM) was established in 2009 to be responsible for this. This committee defined the official name of the technology as "additive manufacturing". ASTM is also integrating its efforts with ISO (261 Technical Committee) in the area of test methods, processes,

Accepted: May 31, 2015

Published online:

#### Corresponding author:

Daniela Steffens  
Post-graduation Program of Biological Science – Physiology  
Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)  
Porto Alegre  
Rio Grande do Sul, Brazil  
dani\_ste@hotmail.com





## Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute

**Aim:** The present study has aimed to produce a cutaneous substitute, bringing together stem cells (mesenchymal stem cells) and keratinocytes, and an electrospun biomaterial. **Materials & methods:** Three groups of scaffolds were studied: group 1, poly-DL-lactic acid (PDLA); group 2, hydrolyzed PDLA (PDLA/NaOH) and group 3, PDLA/Lam – a PDLA/NaOH scaffold linked to laminin protein. They were characterized by physicochemical and biological parameters. **Results:** As a result, the scaffolds presented well-formed and randomly distributed fibers. Group 3 showed the greatest hydrophilic characteristics. Group 1 showed a greater degradation rate after 14 days. Groups 2 and 3 presented molecular weight of about 40–50 Da. In general, group 3 showed the best results concerning cell adhesion and viability. **Conclusion:** This study associated two revolutionary fields, stem cells and nanotechnology, for use in regenerative medicine.

**Keywords:** electrospinning • keratinocytes • laminin • scaffolds • skin substitute • stem cells • tissue engineering

The use of scaffolds for regenerative medicine shows strong signs of being a good strategy in the treatment of tissue and organ lesions and has great potential for regenerating many kinds of tissue, skin, vasculature, bone, neural, cartilage and tendon/ligament [1–3]. This new strategy aims to use cells cultivated in scaffolds to replace or restore tissue that has been damaged due to disease, accidents or congenital defects.

There are some commercially available skin substitutes nowadays, which can be divided into epidermic, dermic and composite equivalents [4–6]. Epidermic equivalents generally consist of a keratinocyte slice, isolated from a donor and expanded in a laboratory. The dermic substitutes are usually acellular and made from xenogeneic sources, such as bovine or porcine collagen. Composite substitutes usually consist of a multicell culture, using allogeneic keratinocytes and fibroblasts. They have the advantages of providing growth factors, cytokines, extracellular matrix and other

elements, as well as a cover for the wound. The acellular constructions are easier to develop; however, they do not vascularize well and do not incorporate well in the wound lesion in patients [4,6,7].

The mainly used commercially available skin substitutes are made from collagen, chitin and fibrin [4]. There is also the artificially manufactured skin substitutes which commonly use poly-lactic acid and poly-glycolic acid as biomaterials, for example [7]. Further information concerning the main available substitutes clinically used can be found in Mohd Hilmi and Halim [4].

Available treatment is insufficient in preventing scarring and promotes healing of the patient, especially in large burns and chronic wounds [8,9]. Thus, the regeneration of skin is an important field for tissue engineering [8,10].

Because of this, the development of a biocompatible and biodegradable scaffold, for use in the lesion area allows greater contact and interaction of cells at the lesion site, as

Daniela Steffens<sup>\*1,2</sup>, Monica B Mathor<sup>3</sup>, Bruna T5 Santi<sup>2</sup>, Dayane P Luco<sup>4</sup> & Patricia Pranke<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Hematology & Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

<sup>2</sup>Post-graduate Program in Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 05508-000, Brazil

<sup>4</sup>Stem Cell Research Institute (Instituto de Pesquisa com Células-tronco), Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90020-010, Brazil

\*Authors for correspondence:

Tel.: +55 513 308 5257

Fax: +55 513 308 5427

[dani\\_ste@hotmail.com](mailto:dani_ste@hotmail.com)

## Mesenchymal Stem Cells and Nanofibers as Scaffolds for the Regeneration of Thyroid Cartilage

Geraldo P. Jotz, MD, PhD; Paula R. da Luz Soster, PhD; Seno Otto Kunrath, MD, PhD;  
 Daniela Steffens, MSc; Daikelly I. Braghirolli, MSc; Claudio Galleano Zettler, MD, PhD;  
 Carlos A. Beck, PhD; Marcelo Muccillo, MSc; Rui F. F. Lopes, PhD;  
 Bernardo Mastella; Patricia Pranke, PhD

**Objectives/Hypothesis:** The aim of this study has been to establish an alternative approach in the form of regeneration of the thyroid cartilage.

**Study Design:** Four 1-month old pigs (*Sus scrofa*) were used (divided into 3 groups) and submitted to general anesthetic to perform cervicotomy with exposure of the thyroid cartilage in a total of 12 (twelve) samples.

**Method:** A resection of 4.0 cm<sup>2</sup> of cartilage was carried out in the right upper region and in the left upper and lower left region of the cartilage, where a scaffold with or without stem cells was implanted. In the left lower region, no biomaterial was implanted and the defect was left open (lesion control [L]).

**Results:** The average extension of the cartilaginous neoformation of L group was 136.3  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  9.6) and 387.7  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  43.2) in the scaffold (SCA) group, presenting a significant statistical difference ( $P < 0.01$ ). The analysis carried out on the lesion site sections of the cartilage of the larynx of the animals from the SCA group + mesenchymal stem cells (SCA+MSC) showed an average of the extension of neocartilage of 825.4  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  122.1), showing a more extensive area of neocartilage when compared to the other groups. These results demonstrated a high significantly statistical difference ( $P < 0.001$ ) when compared with the L and SCA groups.

**Conclusion:** In 100% of the cases for which SCA+MSCs were used, a significant success in the cartilage growth and closing of the lesion in the thyroid cartilage was obtained compared to the other two groups for which MSCs were not used.

**Key Words:** Stem cells, thyroid cartilage, regeneration, scaffolds.

**Level of Evidence:** N/A.

*Laryngoscope*, 00:000-000, 2014

### INTRODUCTION

Cancer of the larynx is diagnosed annually in approximately 10,000 men and women in the United States and is among the most common types of cancer of the upper aerodigestive tract.<sup>1</sup>

Reconstruction of the airways, mainly those with cartilaginous formation in their structure, continue to challenge medical science. A very large variety of techniques for cartilaginous reconstruction have been

described in laryngotracheal reconstruction surgeries—not always with very promising results in milder cases (level II of Cotton) and those of benign origin.<sup>2,3</sup>

These different therapeutic approaches have been developed around the world with the aim of offering an improvement in the life quality of this group of patients.

The main types of tracheobronchial substitutes that have been used in airway transplantation are synthetic prostheses, bioprostheses, allografts, autografts, and bio-engineered conduits. According to a recent review by Martinod et al.,<sup>4</sup> despite the fact that research has been carried out in this area for more than 50 years, airway transplantation is still one of the biggest challenges for thoracic surgery and regenerative medicine.<sup>4</sup>

In the last decade, research using stem cells (SCs) has attracted a great deal of attention from the academic and scientific worlds because it shows enormous potential for modifying the concepts of traditional therapies, with a wide impact on genetic therapy, carcinogenesis, tissue damage, and regeneration, among others. The identification, isolation, and differentiation of embryonic stem cells have broadened the spectrum of potentials for cellular therapy. Recent findings<sup>5</sup> have demonstrated the possibility of isolating skeletal muscular cells derived from SCs of embryoid bodies. The intramuscular and systemic transplantation of these cells in dystrophic

From the Department of Morphological Sciences (G.P.J., P.R.D.S., S.O.K., R.F.F.L.); the Hematology and Stem Cells Laboratory, Pharmacy School (D.S., D.I.B., P.P.); the Post Graduate Program in Physiology (D.S., D.I.B., P.P.); the Medicine Veterinary School (C.A.B., M.M.); the Medicine School; Federal University of Grande do Sul (B.M.); the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (C.G.Z.); and the Stem Cell Research Institute (P.R.), Porto Alegre, RS, Brazil.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication June 3, 2014.

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Stem Cell Research Institute. The authors have no other funding, financial relationships, or conflicts of interest to disclose.

Send correspondence to Geraldo Pereira Jotz, MD, PhD, Department of Morphological Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Dom Pedro II 891/Room 604, Porto Alegre, RS, 90550-142, Brazil. E-mail: geraldo.jotz@terra.com.br

DOI: 10.1002/lary.24805

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/burns](http://www.elsevier.com/locate/burns)

## Development of a new nanofiber scaffold for use with stem cells in a third degree burn animal model



Daniela Steffens<sup>a,b,\*</sup>, Dilmar Leonardi<sup>a</sup>, Paula Rigon da Luz Soster<sup>c</sup>, Michelle Lersch<sup>a</sup>, Annelise Rosa<sup>a,b</sup>, Thayane Crestani<sup>a</sup>, Cristiane Scher<sup>a</sup>, Michele Greque de Morais<sup>d</sup>, Jorge Alberto Vieira Costa<sup>d</sup>, Patricia Pranke<sup>a,b,e</sup>

<sup>a</sup> Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Post Graduate Program in Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Department of Morphological Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Biochemical Engineering, College of Chemistry and Food Engineering, Federal University of Rio Grande, Brazil

<sup>e</sup> Stem Cell Research Institute, Brazil

### ARTICLE INFO

Article history:  
Accepted 10 March 2014

Keywords:  
Burn model  
Stem cells  
Electrospinning  
Spirulina

### ABSTRACT

The combination of mesenchymal stem cells (MSCs) and nanotechnology to promote tissue engineering presents a strategy for the creation of new substitutes for tissues. Aiming at the utilization of the scaffolds of poly-D,L-lactic acid (PDLA) associated or not with *Spirulina* biomass (PDLA/Sp) in skin wounds, MSCs were seeded onto nanofibers produced by electrospinning. These matrices were evaluated for morphology and fiber diameter by scanning electron microscopy and their interaction with the MSCs by confocal microscopy analysis. The biomaterials were implanted in mice with burn imitating skin defects for up to 7 days and five groups were studied for healing characteristics. The scaffolds demonstrated fibrous and porous structures and, when implanted in the animals, they tolerated mechanical stress for up to two weeks. Seven days after the induction of lesions, a similar presence of ulceration, inflammation and fibrosis among all the treatments was observed. No group showed signs of re-epithelization, keratinization or presence of hair follicles on the lesion site. In conclusion, although there was no microscopical difference among all the groups, it is possible that more prolonged analysis would show different results. Moreover, the macroscopic analysis of the groups with the scaffolds showed better cicatrization in comparison with the control group.

© 2014 Elsevier Ltd and ISBI. All rights reserved.

### 1. Introduction

The skin is the largest immunologically competent organ in the body. As it serves as a protective barrier of our body to the

outside world, any injury caused to it needs to be quickly and efficiently repaired.

In burns, high temperatures dilate the blood vessels and the liquids therein contained come out, forming bubbles. These bubbles may result in wounds vulnerable to infections.

\* Corresponding author at: University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga n. 2752, Room 304 G, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5275/3308 5257; fax: +55 51 3308 5437.

E-mail addresses: [dani\\_ste@hotmail.com](mailto:dani_ste@hotmail.com), [danielasteffens@gmail.com](mailto:danielasteffens@gmail.com) (D. Steffens).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2014.03.008>

0305-4179/© 2014 Elsevier Ltd and ISBI. All rights reserved.



Copyright © 2014 American Scientific Publishers  
All rights reserved  
Printed in the United States of America

Review

*Journal of  
Nanoscience and Nanotechnology*  
Vol. 14, 1007–1017, 2014  
[www.aspbs.com/jnn](http://www.aspbs.com/jnn)

## Biological Applications of Nanobiotechnology

Michele Greque de Moraes<sup>1,\*</sup>, Vilásia Guimarães Martins<sup>1</sup>, Daniela Steffens<sup>2</sup>,  
Patricia Pranke<sup>2,3</sup>, and Jorge Alberto Vieira da Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemical Engineering, College of Chemistry and Food Engineering,  
Federal University of Rio Grande, P.O. Box 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

<sup>2</sup>Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of  
Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Stem Cell Research Institute, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Nanotechnology is a multidisciplinary field that covers a vast and diverse array of devices derived from engineering, physics, chemistry, and biology. Nanotechnology has opened up by rapid advances in science and technology, creating new opportunities for advances in the fields of medicine, electronics, foods, and the environment. Nanoscale structures and materials (nanoparticles, nanowires, nanofibers, nanotubes) have been explored in many biological applications (biosensing, biological separation, molecular imaging, anticancer therapy) because their novel properties and functions differ drastically from their bulk counterparts. Their high volume/surface ratio, improved solubility, and multifunctionality open many new possibilities. The objective of this review is to describe the potential benefits and impacts of the nanobiotechnology in different areas.

**Keywords:** Biosensors, Medicine, Foods, Pathogens, Biosurfactants, Nanobiotechnology, Toxicity.

### CONTENTS

1. Introduction .....	1007
2. Nanobiotechnology .....	1009
3. Nanobiotechnology Applications .....	1009
3.1. Medical Applications .....	1009
3.2. Tissue Engineering .....	1010
3.3. Pathogen Detection .....	1012
3.4. Food Safety .....	1013
3.5. Biosurfactants .....	1013
4. Commercialization of Nanoproducts .....	1014
5. Nanotoxicology .....	1015
6. Conclusion .....	1016
Acknowledgments .....	1016
References and Notes .....	1016

### 1. INTRODUCTION

Nanotechnology can be defined as the science and engineering involved in the design, synthesis, characterization, and application of materials and devices whose smallest functional organization in at least one dimension is on the nanometer scale. This technology is opening new therapeutic opportunities for many agents that cannot be used effectively as conventional formulations because

of their poor functionality. Nanoparticles formulations provide protection for agents susceptible to degradation, denaturation in regions of harsh pH, and also prolong the duration of exposure of a drug by increasing retention of the formulation through bioadhesion.<sup>1</sup> Nanobiotechnology is the combination of engineering and molecular biology that is leading to a new class of multifunctional devices and systems for biological and chemical analysis with better sensitivity, specificity, and a higher rate of recognition. Nano-objects with important analytical applications include nanotubes, nanochannels, nanoparticles, nanopores, nanocapacitors, and nanofibers.<sup>2</sup>

A number of articles have analyzed specific sectors of nanobiotechnology, including liposomes nanoparticles for drug delivery, emulsions, imaging, biomaterials, food, optical and electronics, pathogens, biosensors, and *in vitro* diagnostics. Industry market reports describing companies and their products related to nanobiotechnology have also begun to emerge in the last several years.<sup>3</sup> The uncertain health hazard potential of nanomaterials is probably the most significant hurdle for regulatory approval and commercialization of nanomaterials products. The unique physical and chemical properties of nanomaterials (small size, increased reactivity, high surface-to-volume ratio)

\*Author to whom correspondence should be addressed.





## The effect of sterilization methods on electrospun poly(lactide-co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells

Daikelly Iglesias Braghirolli,<sup>1,2</sup> Daniela Steffens,<sup>1,2</sup> Kerlin Quintiliano,<sup>1,3</sup> Gerson Arisoly Xavier Acasigua,<sup>1,4</sup> Douglas Gamba,<sup>5</sup> Roland A. Fleck,<sup>6</sup> Cesar L. Petzhold,<sup>5</sup> Patricia Pranke<sup>1,2,7</sup>

<sup>1</sup>Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil

<sup>2</sup>Post Graduate Programme in Material Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

<sup>3</sup>Post Graduate Programme in Neuroscience, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, Porto Alegre 90050-170, Brazil

<sup>4</sup>Post Graduate Programme in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, Porto Alegre 90035-003, Brazil

<sup>5</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

<sup>6</sup>Cell Biology and Imaging, National Institute of Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire, EN6 3QG, UK

<sup>7</sup>Stem Cell Research Institute, Porto Alegre 90020-010, Brazil

Received 15 May 2013; revised 6 August 2013; accepted 10 September 2013

Published online 00 Month 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.33049

**Abstract:** The sterilization of scaffolds is an essential step for tissue engineering *in vitro* and, mainly, clinical biomaterial use. However, this process can cause changes in the structure and surface of the scaffolds. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of sterilization by ethanol, ultraviolet radiation (UVR) or antimicrobial solution (AMS) on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds produced by the electrospinning technique. The properties of nanofibers and the cellular adhesion of mesenchymal stem cells to the scaffolds were analyzed after the treatments. All methods generated sterile scaffolds but showed some kind of damage to the scaffolds. Ethanol and AMS caused

changes in the morphology and scaffold dimensions, which were not observed when using the UVR method. However, UVR caused a greater reduction in polymeric molecular weight, which increased proportionally with exposure time of treatment. Nanofibers sterilized with AMS for 1 h and 2 h showed greater cellular adhesion than the other methods, demonstrating their potential as a method for sterilizing PLGA nanofibers. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B: 000–000, 2013.

**Key Words:** electrospinning, nanofibers, biomaterials, sterilization, PLGA

**How to cite this article:** Braghirolli DI, Steffens D, Quintiliano K, Acasigua GAX, Gamba D, Fleck RA, Petzhold C, Pranke P. 2013. The effect of sterilization methods on electrospun poly(lactide-co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res Part B* 2013; 00B: 000–000.

### INTRODUCTION

Tissue engineering, through the use of cells and scaffolds, is proving to be a promising tool for rebuilding organs and tissues.<sup>1,2</sup> However, success depends on the development of biocompatible and biodegradable scaffolds, with highly specialized properties, which, when associated with cells are able to form organized tissue.<sup>3–5</sup> Electrospinning, using high voltages, is a most cost effective and easy method to produce nanofiber scaffolds.<sup>6</sup> The scaffolds produced by this technique are formed by fibers with diameters which vary from a few micrometers to 100 nm or less.<sup>7</sup> These scaffolds have been extensively utilized for tissue engineering because they are able to mimic the native extracellular matrix in structure and scale.<sup>2</sup> Moreover, the electrospun scaffolds also present a raised superficial area, which favors

cellular adhesion. Their construction provides a large number of interconnected pores allowing space for the exchange of nutrients, metabolics and for the development of cellular migration.<sup>2,8,9</sup>

When manufacturing of scaffolds for later use in cellular cultures is considered, sterilization becomes a crucial step and its efficiency needs to be confirmed.<sup>10</sup> This procedure can cause alterations in the properties of the scaffolds, such as mechanical resistance, degradation of profile, morphology and structure, which in turn can create changes in the interaction between the scaffolds and the cells.<sup>11</sup>

This study, therefore, proposes to investigate the effects of different sterilization methods on the properties of the poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanofibers produced by electrospinning and then to examine the cellular response

**Correspondence to:** P. Pranke (e-mail: patriciapranke@ufrgs.br)

Contract grant sponsor: National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Stem Cell Research Institute



# Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics

Reviews • POST-SCREEN

Daikelly I. Braghioroli<sup>1,2,4</sup>, Daniela Steffens<sup>1,2,4</sup> and Patricia Pranke<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil

<sup>2</sup>Post Graduate Program in Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90010-170, Brazil

<sup>3</sup>Stem Cell Research Institute, Porto Alegre 90020-010, Brazil

Electrospun fibers are promising tissue engineering scaffolds that offer the cells an environment that mimics the native extracellular matrix. Fibers with different characteristics can be produced by the electrospinning technique according to the needs of the tissue to be repaired. In this review, the process of electrospinning was examined, providing a description of the common techniques used for the physicochemical and biological characterization of electrospun fibers. The review also discusses the potential applications of electrospun scaffolds for tissue engineering, based on scientific literature.

## Introduction

Failure of organ and/or tissue function as a result of injury, disease or aging has a high impact on quality of life and also incurs a large social and economic cost. Current treatments vary with the organ affected, but all of them have their limitations [1]. Frequently, organ transplantation is the indicated therapy for these clinical cases; however, there are several disadvantages in using autologous or allogenic grafts, including shortage of appropriate donor organs, risk of disease transmission and immune rejection [2]. Tissue engineering (TE) is an exciting area that involves engineering and biological knowledge to create or restore tissue and organs. It utilizes three basic tools: cells, biomaterials and biomolecules. Electrospinning (ES) is a simple and versatile technique that produces scaffolds formed by nano- and micro-fibers, which offer a favorable micro-environment for cellular development by mimicking the native extracellular matrix [3]. The aim of this review paper is to describe the production of electrospun scaffolds and examine the most commonly used techniques for their physicochemical and biological characterizations. It also discusses the main biomedical applications of electrospun fibers and the cell sources used in TE.

## The electrospinning process

From the techniques used to construct biomaterials to be cultivated with cells, ES is the most widely studied and it has also

been demonstrated as giving the most promising results in terms of TE applications. The first recorded citation detailing the application of high electrical potentials to generate aerosols from drops of fluids was in 1745; but not until 1929 was the application of an electrical field to produce artificial silk described. Until the 1990s, there was no commercial interest in this technique, although advances and patents in the field were achieved [4]. A search in February 2014 for the keyword 'electrospinning' in PubMed showed an increased interest for this technique after 2000.

The electrospinning process works by the electrostatic principle. As can be seen in Fig. 1, the machine is basically composed of a syringe with a nozzle, a counter electrode (normally a metal plate), a source of electrical field and a pump. The solution to be electrospun is applied to the system via the nozzle of the syringe and is pulsed by the pump. It is then subjected to a difference in an electrical voltage present between the nozzle and the counter electrode. This electrical voltage generated by the source causes a cone-shaped deformation of the drop of polymer solution. The solvent in the solution evaporates on its way to the counter electrode and, at the end of the process, solid continuous filaments are yielded [5]. It is important to note that the gravitational forces do not interfere in the process because the acceleration of the fiber formation is up to 600 m/s<sup>2</sup>, which is close to two orders of magnitude greater than the acceleration of gravitational forces. Because of this, it is possible to form fibers from top-down, bottom-up or other types of arrangements [6].

Corresponding author: Pranke, P. (patriciapranke@ufrgs.br)

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this paper.

## Wettability and Cell Spreading Enhancement in Poly(sulfone) and Polyurethane Surfaces by UV-Assisted Treatment for Tissue Engineering Purposes

Felipe Kessler<sup>1\*</sup>, Daniela Steffens<sup>2\*</sup>, Gabriela A. Lando<sup>1</sup>, Patricia Pranke<sup>2,3</sup>, and Daniel E. Weibel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Photochemistry and Surfaces (LAFOS), Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Stem Cell Research Institute, Porto Alegre, RS, Brazil.

(Received: April 15<sup>th</sup>, 2013; Revision: July 15<sup>th</sup>, 2013; Accepted: July 22<sup>nd</sup>, 2013)

**Abstract :** The surface of Poly(sulfone) (PSU) and Polyurethane (PU) films were treated with ultraviolet (UV) light in the presence of oxygen to improve their wettability, adhesion and cell spreading properties. XPS and WCA results illustrated the effective conversion of the PSU and PU surfaces from hydrophobic to hydrophilic with grafting of new oxidized functional groups during the photochemical treatments. Treated films showed a larger number of adhered cells compared to the untreated films and that number of adhered cells was comparable to the number of adhered cells in the control group. The results showed that the cell response does not only depend on the hydrophilicity but on the chemical surface alterations which occur as a result of UV-assisted treatment in the presence of oxygen. Better cell adhesion, spreading and growing on the PSU and PU substrates modified by the present UV methodology confirmed the biocompatibility of the treated surfaces.

**Key words:** poly(sulfone), polyurethane, UV surface functionalization, tissue engineering, cell spreading and adhesion

### 1. Introduction

The relationship between the surface chemistry of materials and resulting cellular response is of great importance for biomedical materials, regenerative medicine, tissue engineering and biosensors. As the surface of the biomaterial is what first comes into contact with the body when the biomaterial is used as a medical device, the initial response of the living body to the biomaterial must depend on its surface properties.<sup>1,2</sup> This is of particular importance, for example, for a medical implant, which has to be fully compatible with the surroundings at the point of application.

A variety of materials have been used for replacement and repair of damaged or traumatized tissue.<sup>3</sup> These materials include metals, ceramics, polymers (natural and synthetic) and their combinations. The lack of degradability in a biological environment and their limited powers of processing are the two

major disadvantages of metals and ceramics for tissue engineering applications. In contrast, polymers are very attractive because they have great design flexibility in composition and structure to tailor specific needs. Additionally, they have, in many cases biodegradability properties that can be imparted into polymers through molecular design. Some polymers contain chemical bonds which undergo hydrolysis upon exposure to the body's aqueous environment and there are others which can degrade by cellular or enzymatic means. A principal drawback of many natural and synthetic polymers is their natural surface hydrophobicity, which limits their use in tissue engineering. This important remaining problem causes inadequate interaction between polymers and cells, leading to *in vivo* foreign body reactions, such as inflammation, infections, aseptic loosening, local tissue waste and implant encapsulation, as well as thrombosis and embolization.

In order to enhance the biocompatibility and in particular the bio-functionality of materials used for tissue engineering, increasing use is being made of surface modification techniques. Many techniques have been developed and used to modify the surfaces of many different polymers. Corona-discharge<sup>4</sup>, plasma treatment<sup>5</sup>, plasma polymerization<sup>6,7</sup>,

\*Corresponding authors  
 Tel: +55-51-33085257; Fax: +55-51-33085437  
 e-mail: felipekessler@gmail.com (Felipe Kessler)  
 dani\_ste@hotmail.com (Daniela Steffens)