

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

***ELECTROSPINNING* DE EMULSÃO PARA A
PRODUÇÃO DE MATRIZES DE NANOFIBRAS COMO UMA
ESTRATÉGIA PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO E
INCORPORAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO**

Annelise Ribeiro da Rosa

**Dissertação de Mestrado
Porto Alegre, Julho de 2012**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

***ELECTROSPINNING* DE EMULSÃO PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES DE NANOFIBRAS COMO UMA ESTRATÉGIA PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO E INCORPORAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO**

Annelise Ribeiro da Rosa

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

Porto Alegre
2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, Amílcar da Rosa e Solange Ribeiro da Rosa, que sempre me estimularam a dar este grande passo. Pai e mãe muito obrigada por todo amor, compreensão e apoio incondicional, sem vocês nada disso seria possível.

A minha querida irmã Aline da Rosa por toda a torcida .

AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha orientadora **Profª Drª Patricia Pranke** exemplo de dedicação profissional, pela oportunidade oferecida, bem como pelo ensinamento e incentivo dispensados a concretização deste trabalho.*

Muito obrigada por tudo!

*Agradeço ao meu co-orientador **Profº Dr. Diogo André Pilger** sempre disposto ajudar, auxiliando na busca de respostas aos questionamentos que surgiram ao decorrer deste trabalho. Sua participação ativa foi muito importante.*

*A minha querida colega **Kerlin**, que “sofreu” comigo durante a execução de algumas etapas deste trabalho, que sempre se mostrou disposta a ajudar, compreensiva e ótima amiga em todas as horas. Muito obrigada!*

*A **Dani** pelas inúmeras ajudas dispensadas a este trabalho, pelo incentivo, pelas suas reflexões críticas e, sobretudo pela amizade. OBRIGADA de coração!*

*A minha parceira de aventuras pelo Campus do Vale, estudos no MSN madrugada à dentro, sem você **Daikelly Iglesias** tudo seria mais difícil.*

*Ao **Davi** aluno de iniciação científica que iniciou este trabalho comigo. Obrigada!*

*A minha bolsista **Bruna Santi**, sempre muito atenciosa e solícita aos meus pedidos. Mesmo chegando mais ao final deste trabalho, sua ajuda foi muito importante.*

***Cristiane Scher** por deixar meus dias de trabalho mais divertidos.*

*Ao meu querido **Pedro Chagastelles** pelas análises de citometria de fluxo e por sempre ver o lado positivo das coisas com um otimismo contagiante!*

*Aos queridos colegas de laboratório **Régis, Thay, Vick, Fer Z., Janine, Andrea, Gerson, Dani L. e Eduardo** por toda ajuda dispensada ao longo desses dois anos e principalmente pelo companheirismo e amizade, com certeza vocês deixaram os meus dias de trabalho mais coloridos e agradáveis*

*Ao **Dr° Niveo Steffen** pela parceria neste estudo*

*As técnicas, **Fernanda Klein** pelos inúmeros orçamentos solicitados e **Simone de Almeida** por arrumar a nossa bagunça.*

*Ao **Douglas Gamba** agradeço pela disposição para discutir as dúvidas, sempre de forma muito atenciosa e amigável*

*Agradeço a **Gabriela Lando, Matheus Tilton e Felipe Kessler** pela análise de ângulo de contato*

*A **Profª Drª Raquel Mauler e Vinícius Pistor** pela análise dinâmico-mecânica*

*Ao **Prof° Dr° César Liberato Petzhold e Fabiana Grosser** pela análise de cromatografia de permeação em gel*

*Agradeço **Profª Dr.ª Irene Kulkamp Guerreiro** pela ajuda em alguns momentos deste trabalho.*

*As minhas queridas primas e amiga **Luciane, Bruna e Bianca**, pela amizade e parceria ao longo desses dois anos. Vocês a quem eu sempre recorri para desabafar, comemorar e me*

divertir, sem sombra de dúvidas as melhores amigas que eu poderia ter, o meu muito obrigado!

O meu reconhecido e carinhoso muito obrigado a todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| LISTA DE TABELAS..... | XII |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XIII |
| RESUMO..... | XVI |
| ABSTRACT..... | XVII |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 CÉLULAS-TRONCO..... | 3 |
| 2.2 BIOMATERIAIS..... | 5 |
| 2.3 <i>ELECTROSPINNING</i> | 8 |
| 2.4 MATRIZES DE NANOFIBRAS NA ENGENHARIA DE TECIDOS..... | 9 |
| 2.5 INCORPORAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO EM MATRIZES DE NANOFIBRAS..... | 10 |
| 2.6 FATORES DE CRESCIMENTO E O FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR..... | 11 |
| 3. OBJETIVOS..... | 14 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 14 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 15 |
| 4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS..... | 15 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ADSCs COMO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (ANEXO II)..... | 15 |
| 4.3 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE <i>ELECTROSPINNING</i> | 15 |
| 4.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS..... | 16 |
| 4.5 ENSAIOS DE EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO VEGF..... | 19 |
| 4.6 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ADSCs NAS MATRIZES DE NANOFIBRAS..... | 20 |
| 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 23 |

| | |
|--|----|
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 24 |
| 6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO ADIPOSEO-DERIVADAS..... | 24 |
| 6.2 MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS FIBRAS | 26 |
| 6.3 TEOR DE SOLVENTE RESIDUAL..... | 28 |
| 6.4 DEGRADABILIDADE..... | 30 |
| 6.5 ÂNGULO DE CONTATO..... | 32 |
| 6.6 PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS MATRIZES..... | 34 |
| 6.7 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO E ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO VEGF | 36 |
| 6.8 MORFOLOGIA E ADESÃO DAS ADSCs NAS MATRIZES..... | 41 |
| 6.9 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS METABOLICAMENTE ATIVAS NAS MATRIZES DE NANOFIBRAS | 44 |
| 6.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE..... | 45 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 47 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| ANEXO I..... | 55 |
| ANEXO II..... | 56 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do polímero poli(ácido lático-*co*-glicólico) – PLGA

Figura 2. Representação esquemática do aparato de *Electrospinning* (adaptado de Ziabari e colaboradores)

Figura 3. Aparato de *electrospinning* (Laboratório de Células-tronco e Hematologia da Faculdade de Farmácia – UFRGS)

Figura 4. A e B) Matrizes de nanofibras produzidas pela técnica de *electrospinning*

Figura 5. Micrografia esquemática da medida do tamanho de poro pelo software Image J.

Figura 6. Diferenciação das ADSCs: A) diferenciação condrogênica por coloração com Alcian Blue, B) diferenciação osteogênica por coloração com Alizarin Red, C) diferenciação adipogênica por coloração com Oil Red e D) células não diferenciadas e não submetidas a coloração com morfologia típica de CTMs . Imagens A, B e D foram realizadas a partir de aumento de 20x e a imagem C a partir de aumento de 40x.

Figura 7. Análise do perfil imunofenotípico das ADSCs na quinta passagem celular. A) controles isotípicos, B) CD29/PE e CD90/FITC, C) CD44/FITC e CD73/PE, D) CD14/FITC e CD34/PE, E) HLA-DR/FITC e STRO-1/PE, e F) CD45/FITC e CD184/PE.

Figura 8. Fotomicrografia da morfologia das matrizes por MEV (aumento de 4.000x): A) matriz PLGA/BSA/VEGF, B) matriz PLGA/BSA e C) matriz PLGA 13%.

Figura 9. Demonstração da distribuição dos diâmetros das fibras com valores variando de 100 – 950 nm para os três grupos de matrizes produzidas (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

Figura 10. Gráfico obtido através de análise termogravimétrica demonstrando a percentagem de perda de massa para as matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%.

Figura 11. Perda de massa molecular avaliada por cromatografia de permeação em gel, em diferentes períodos: 0 (não submetido ao processo de degradação), 7, 14 e 30 dias. (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

Figura 12. Ângulo de contato nos filmes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13% com valores médios de $55,22^\circ \pm 3,22^\circ$; $61,72^\circ \pm 4,3^\circ$ e $62,73^\circ \pm 4,66^\circ$, respectivamente.

Figura 13. Imagem representativa do perfil dinâmico-mecânico das diferentes matrizes em função da tensão X deformação. (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

Figura 14. A) Média dos valores de módulo de Young para os diferentes grupos de matrizes, B) tensão máxima de deformação. (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

Figura 15. Curva de Liberação de VEGF *in vitro* a partir de matrizes de PLGA/BSA/VEGF.

Figura 16. Morfologia das ADSCs avaliada por microscopia confocal: A) matriz PLGA/BSA/VEGF, B) matriz PLGA/BSA, C) matriz PLGA 13% D) células cultivadas diretamente no poço da placa de cultivo. Legenda: em vermelho, marcação do citoesqueleto marcado com faloidina conjugada com rodamina; em azul, marcação nuclear com DAPI. Imagens A, B e C aumento de 40x com zoom digital de 1x e imagem D aumento de 10x com zoom digital de 1x.

Figura 17. Adesão celular após 6 horas de cultivo *in vitro* para 5 culturas primárias de ADSCs testadas sobre os seguintes grupos de matrizes: PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13% e grupo controle (células cultivadas diretamente no poço da placa de cultivo). Os resultados foram expressos através de média e erro padrão.

Figura 18. Avaliação das células metabolicamente ativas por MTT testadas sobre os seguintes grupos de matrizes: PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13% e grupo controle (células cultivadas diretamente no poço da placa de cultivo).

Figura 19. Dosagem de LDH em sobrenadante de culturas primárias de ADSCs testadas sobre os seguintes grupos de matrizes: PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13%, grupo controle negativo (células semeadas diretamente no poço da placa de cultivo) e grupo controle positivo (Triton).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade média de solvente residual nas diferentes matrizes (n=3).

Tabela 2. Medidas de ângulo de contato nas matrizes PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13% em diferentes períodos de tempo em segundos (n = 4).

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

mg/L - Miligrama por litro

μL - Microlitro

μM - Micromolar

$^{\circ}$ - Graus

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - Graus Celsius por minuto

\pm - mais ou menos

$<$ - Menor que

$>$ - Maior que

ADSCs - Células-tronco derivadas de tecido adiposo (do inglês, *Adipose-Derived Stem Cells*)

AsAp - Ácido ascórbico-2 fosfato

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

cm^2 - centímetro quadrado

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

CE - Células endoteliais

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CFU-F - Unidades Formadoras de Colônia de Fibroblastos (do inglês, *Colony-Forming Unit-Fibroblasts*)

CO_2 - Dióxido de carbono

CTs Células-tronco

CTEs - Células-tronco Embrionárias

CTAs - Células-tronco Adultas

CTMs - Células-tronco mesenquimais

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

DMA - Análise Dinâmico-Mecânica (do inglês *Dynamic-mechanical analysis*)

DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Desvio padrão

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzimaimunoensaio (do inglês, *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)
ES - do inglês *Electrospinnig*
ET - Engenharia de Tecidos
FC - Fator de crescimento
FDA - *Food and Drug Administration*
FEV - Fração Estromal Vascular
fg - Fentograma
g - Força que exerce a gravidade
GPC - Cromatografia de permeação em gel (do inglês *Gel Permeation Chromatography*)
HEPES - n-2 hidroxietil piperazine- n'-2 ácido sulfônico etano
HFIP - 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
IMDM - Meio de Dulbecco modificado por Iscove
kV - kilovolts
LDH - Lactato Desidrogenase
M - Molar
m³ - Metro cúbico
MEC - matriz extracelular
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/mL - Miligrama por mililitro
mL - Mililitro
mL/h - mililitro/hora
mm - Milímetro
mM - Milimolar
mmol/L - milimol por litro
m/m - massa/massa
MO - Medula Óssea
MTT - Método do Sal de Tretazolium
N - número de amostra
ng - Nanograma
NGF - Fator de crescimento neural (do inglês *Neural Growth Factor*)
nm - Nanometro
nM - Nanomolar
P5 - Quinta passagem celular

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

PDLLA - Poli-D,L- ácido láctico

PIGF - Fator de Crescimento Placentário (do inglês *Placental Growth Factor*)

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

PE - Ficoeritrina (do inglês, *Phycoeritrin*)

ppm - Parte por milhão

rpm - Rotações por minuto

SFB - Soro fetal bovino

TGA - Análise termogravimétrica (do inglês, *Termogravimetric Analysis*)

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

THF - Tetrahydrofurano

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

U/mL - Unidades por mililitro

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VPF - Fator de permeabilidade vascular (do inglês, *Vascular Permeability Factor*)

x - Vezes

7AAD - 7-Amino Actinomicina D

RESUMO

A associação de matrizes produzidas por *electrospinning* (ES) e células-tronco tem sido apontada como uma alternativa promissora na reconstituição de tecidos. A associação de moléculas bioativas, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em nanofibras, permite a liberação controlada do fator incorporado. Isso pode contribuir para a migração e diferenciação celular, tomando-se uma opção interessante para a regeneração de tecidos. Neste trabalho foi analisado a influência da incorporação do VEGF em matrizes de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) produzidas por ES. As análises de adesão, viabilidade celular e citotoxicidade dos biomateriais foram realizadas em três grupos de matrizes: (1) PLGA/BSA/VEGF, (2) PLGA/BSA, (3) PLGA 13%. As análises físico-químicas das matrizes como morfologia, diâmetro da fibra, degradabilidade, solvente residual, ângulo de contato, propriedades mecânicas, eficiência de incorporação e liberação controlada do VEGF foram realizadas. As nanofibras apresentaram superfície lisa sem *beads* com poros interconectados, semelhantes às da MEC. Observou-se melhora na adesão celular nas matrizes PLGA/BSA/VEGF quando comparadas aos demais grupos. As matrizes foram atóxicas para as células. Portanto, a associação entre matrizes de nanofibras com fatores de crescimento incorporados e células-tronco pode ser uma estratégia útil para a engenharia de tecidos (ET).

ABSTRACT

The association of matrices produced by *electrospinning* (ES) and stem cells has been considered as a promising alternative for the recovery of tissue. The association of bioactive molecules, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) in nanofibres, allows the controlled release of the incorporated factor. It can contribute to cellular migration and differentiation, becoming an interesting option for tissue regeneration. In this work, the influence of VEGF incorporation on a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) scaffold produced by ES was analyzed. The analysis of cell adhesion, cell viability and biomaterials cytotoxicity was carried out in three matrix groups: (1) PLGA/BSA/VEGF; (2) PLGA/BSA, (3) PLGA 13%. The physical-chemical analysis assessment of morphology, fiber diameter, residual solvent, degradability, contact angle, mechanical properties, loading efficiency and controlled release of VEGF were performed. Nanofibres showed smooth surfaces without beads with interconnected pores, similar to those of ECM. An improvement in cell adhesion was observed for the matrices of PLGA/BSA/VEGF when compared to the other groups. The matrices were non toxic for the cells. Therefore, the association between nanofibre matrices loaded with growth factors and stem cells may be a useful strategy for tissue engineering.

1.INTRODUÇÃO

Durante séculos, quando um tecido era lesado por um trauma mecânico, ou até mesmo por um processo degenerativo, a única opção era a sua remoção, reduzindo enormemente a qualidade de vida do paciente. Com o passar do tempo e o aumento da expectativa de vida, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas que visassem não só o reparo, mas também à substituição dos tecidos lesados ¹. Nesse contexto, a engenharia de tecidos (ET) surge como uma ciência multidisciplinar que envolve diversas áreas do conhecimento, tais como as ciências da saúde, ciência dos materiais e a engenharia ². O conceito fundamental da ET está estruturado pela associação de três requisitos básicos, conforme descritos a seguir. (1) Terapia celular, na qual as células são infundidas nos tecidos lesados ou na corrente circulatória. Esse procedimento apresenta limitações, tais como insuficiência na infusão celular e difusão das células pelo organismo, o que impossibilita as mesmas de exercerem as suas funções no local da lesão. (2) Agentes bioativos: o êxito da terapia celular depende da participação de moléculas de sinalização, tais como fatores de crescimento. (3) Utilização de matrizes como suportes celulares: nesta abordagem, as células são isoladas a partir de tecidos vivos e são cultivadas sobre matrizes naturais ou sintéticas. Essas matrizes permitem a permeação de nutrientes e eliminação de resíduos, bem como permitem a localização das células no sítio da lesão. O sucesso da ET está atrelado à vascularização do tecido em formação, fenômeno denominado angiogênese ^{4, 5}. No adulto, o sistema vascular é formado por uma estrutura altamente organizada e ramificada que é o principal regulador da homeostase e do transporte de gases e nutrientes. Além disso, é responsável pela comunicação de órgãos e tecidos e tem um papel importante na diferenciação celular ^{6, 7}. A sequência de eventos durante a angiogênese inclui a vasodilatação através de movimentos das células endoteliais (CE), ação de enzimas proteolíticas bem como migração e proliferação celular, processos esses controlados principalmente pelas diferentes isoformas do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) ⁸.

Atualmente, existem diversos tipos de tecidos desenvolvidos *in vitro*, como por exemplo, aqueles desenvolvidos a partir de matrizes poliméricas. Suas aplicações são as mais variadas na área médica, destacando-se, especialmente, aquelas voltadas à regeneração da pele e cartilagens ⁹.

De um modo geral, a substituição de um tecido lesado ou não funcional, através da utilização de tecidos desenvolvidos *in vitro*, requer a formação concomitante de novos vasos sanguíneos que sejam capazes de fornecerem o oxigênio e nutrientes para o tecido neoformado¹⁰. Atualmente, várias estratégias estão sendo utilizadas com o intuito de aumentar a vascularização dos implantes utilizados na ET¹¹, dentre elas podemos destacar a adição de fatores de crescimento (FC) como VEGF em matrizes poliméricas biocompatíveis e biodegradáveis.

Assim, devido a grande importância da angiogênese na ET, o presente estudo visou produzir matrizes poliméricas com VEGF incorporado com o intuito de aumentar a vascularização do mesmo, contribuindo, deste modo, na construção de modelos de liberação controlada que possam ser aplicados em situações de regeneração tecidual.

Essas matrizes foram utilizadas como suporte para o cultivo celular de células-tronco, que apresentam enorme potencial de diferenciação em diferentes tipos de tecidos, formando um sistema que contempla todos os requisitos da ET: componente celular, presença de fatores de crescimento e o suporte de crescimento para as células. Todos os diferentes componentes foram avaliados isoladamente e também em conjunto. Diferentes análises biológicas das células-tronco, propriedades físico-químicas do biomaterial, assim como a influência do fator de crescimento (VEGF) sobre a adesão e viabilidade celular foram avaliadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

A terapia celular com base no uso das células-tronco (CTs) apresenta uma grande vantagem, pois faz uso de células indiferenciadas, que apresentam capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação. As CTs são reconhecidas pela sua plasticidade, sendo capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares com diferentes funções ¹².

As células-tronco podem ser divididas em células-tronco embrionárias (CTEs), obtidas a partir do embrião de até cinco dias, e células-tronco adultas (CTAs), que são obtidas a partir de órgãos já formados do organismo ¹³. As CTEs contidas no embrião de até três dias são totipotentes, enquanto que as CTEs da massa interna dos blastocistos, embrião de 4 e 5 dias, são consideradas pluripotentes. As CTEs são capazes de gerar todos os tipos celulares encontrados no organismo humano. Embora, a potencialidade das CTE seja considerada um recurso atraente para a terapia celular, a utilização das mesmas é limitada devido a problemas de regulação celular e implicações éticas ^{14, 15, 16}. Em contrapartida, as CTAs são uma opção promissora para ensaios clínicos, devido ao fato de serem obtidas a partir de várias fontes e serem facilmente cultivadas e expandidas *in vitro* ¹⁷. Além disso, são células mais amplamente estudadas e, portanto, mais seguras para uso clínico, bem como não apresentam problemas éticos relacionados à sua utilização ¹⁴.

As células-tronco mesenquimais são células adultas, que foram inicialmente descritas por Friedenstein e colaboradores, na década de 70 ^{12, 18}. O grupo observou a existência de células não fagocíticas, não hematopoéticas, com morfologia semelhante a fibroblastos que, quando cultivadas *in vitro*, apresentavam aderência a plástico sendo capazes de se diferenciar em osteoblastos e adipócitos. Essas células foram denominadas Unidades Formadoras de Colônia de Fibroblastos (CFU-F). Desde então, as mesmas vêm sendo extensivamente estudadas e apresentaram diversas modificações na sua nomenclatura, até que em 1991, Caplan propôs a nomenclatura Células-tronco Mesenquimais (CTMs) ¹⁸.

As CTMs foram inicialmente encontradas na medula óssea, as mesmas são consideradas multipotentes com capacidade de auto-renovação e diferenciação ¹⁹ podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* a partir de vários tecidos do organismo, sendo encontradas na medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária, entre outros tecidos ^{20, 21, 22, 19}. As CTMs são reconhecidas pela sua plasticidade sendo capazes de se diferenciarem em

condroblastos, osteoblastos, adipócitos^{15,19,23,24}. Além disso, há um grande interesse no uso dessas células para transplantes, pois as mesmas possuem propriedades supressoras de células T, envolvidas na resposta imunológica e rejeição aos enxertos. Atualmente, existem diversos estudos que comprovam a atividade imunomodulatória dessas células²⁵.

A *International Society for Cellular Therapy* especificou três propriedades que devem ser evidenciadas para que as células sejam designadas como CTMs: (1) isolamento por aderência em plásticos e proliferação *in vitro*; (2) diferenciação *in vitro* nas três linhagens mesenquimais - osteoblastos, adipócitos e condroblastos; (3) perfil imunofenotípico positivo para os antígenos CD73, CD90 e CD105, e negativo para CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 ou CD79 e HLA-DR^{17,21,26}.

Entre as funções das CTMs, está o fato dessa população celular representar uma fração de reserva celular para a manutenção e reparo de tecidos. Elas permanecem nos tecidos em um estado quiescente até serem ativadas por mediadores de lesão ou por processos naturais de senescência²⁷. Devido ao fato de serem facilmente isoladas, expandidas com alta eficiência e ainda apresentarem grande capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, essas células têm sido amplamente empregadas na medicina regenerativa e engenharia tecidual^{16,28}.

2.1.1 Células-tronco derivadas de tecido adiposo/*Adipose-Derived Stem Cells* – ADSCs

As células-tronco derivadas de tecido adiposo (*Adipose-Derived Stem Cells* – ADSCs) foram descritas por Zuk e colaboradores em 2001 e desde então esta fonte alternativa de CTMs tem sido amplamente estudada devido à facilidade de obtenção e a possibilidade de extração de grandes volumes de tecido^{29,30}.

O tecido adiposo é constituído por um grupo celular bastante heterogêneo, tais como adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e também pela fração estromal vascular (FEV)^{18,30}. Adipócitos maduros constituem cerca de 20 a 30% de todas as células totais do tecido adiposo intacto. A FEV corresponde às ADSCs obtidas logo após o isolamento por tratamento enzimático com colagenase. Esse termo foi utilizado por razões técnicas e só deve ser empregado para designar às CTMs anteriores ao cultivo e expansão *in vitro*. A FEV corresponde a cerca de 30 a 40% do total de células do

tecido adiposo, o que justifica o grande número celular e a facilidade de expansão dessas células logo após o isolamento ¹⁸.

Assim como a medula óssea (MO), o tecido adiposo é de origem mesenquimal, fato que explicaria a presença de CTMs no mesmo ^{5, 13}. Além disso, as ADSCs também são capazes de se diferenciar em adipócitos, condroblastos e osteoblastos quando submetidos a condições apropriadas demonstrando a alta plasticidade desse tipo celular ^{20,29,31,32}.

Embora as ADSCs e as CTMs-MO compartilhem muitas características biológicas, existem algumas diferenças entre as populações. As ADSCs são consideradas geneticamente e morfológicamente mais estáveis em cultura celular por um período mais prolongado, exibindo baixo potencial de senescência e maior potencial de proliferação quando comparadas com as CTMs-MO ¹⁸. Ainda, alguns estudos demonstram diferenças moleculares entre as ADSCs e CTMs-MO, embora o perfil de expressão de genes e proteínas de superfície seja muito semelhante ³³.

2.2 BIOMATERIAIS

Existem diversas definições para o termo biomateriais, sendo mais tradicionalmente conhecido como material não vivo utilizado como um dispositivo médico. Uma definição aplicada ao contexto deste trabalho é a que o considera como um material criado com o intuito de controlar o ambiente celular e tecidual ³⁴.

Atualmente, diversos tipos de biomateriais vêm sendo empregados para a regeneração tecidual. Esses materiais podem ser classificados em temporários ou permanentes ² e desenvolvidos a partir de substâncias naturais ou sintéticas ^{35, 36}. Dentre a categoria dos biomateriais temporários e sintéticos, os polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são os materiais preferencialmente utilizados na medicina regenerativa ^{2,35}. Aplicações clínicas com materiais biodegradáveis apresentam uma grande vantagem quando comparadas com materiais permanentes, pois à medida que o novo tecido vai sendo formado o polímero vai se degradando, logo não ocorre a necessidade de uma nova cirurgia para a retirada do biomaterial ³⁵.

A produção de polímeros sintéticos é mais padronizada e conseqüentemente esses polímeros apresentam menor variação de características estruturais. Os polímeros naturais, por sua vez, apresentam uma maior variação na sua produção devido a sua estrutura e composição química mais complexa ³⁵.

Ainda, é possível destacar o fato de que polímeros sintéticos são mais facilmente produzidos em grande escala e também eliminam a possibilidade de serem vetores de vírus e príons exógenos sendo, deste modo, mais seguros para a utilização na engenharia de tecidos^{2, 35}. Em contrapartida, os polímeros sintéticos, geralmente, possibilitam uma menor adesão celular quando comparados com os polímeros naturais, visto que não apresentam alguns grupos funcionais responsáveis pela interação celular com o biomaterial^{35,36}.

A seleção do biomaterial empregado na ET deve atender a algumas características fundamentais para o sucesso desta abordagem. O biomaterial deve ser biocompatível e biodegradável, com cinética de degradação adequada de acordo com o local onde se quer regenerar. Além disso, deve apresentar arquitetura tridimensional (3D) que mimetize a matriz extra-celular (MEC), sendo capaz de suportar a adesão e a proliferação celular, facilitando o contato entre as células^{37, 38}. A presença de poros interconectados também é de suma importância, uma vez que permite o eficiente transporte de nutrientes e metabólitos³⁹. As propriedades mecânicas dos biomateriais empregados devem ser semelhantes ao tecido original respeitando sua integridade e funcionalidade, permitindo um eficiente contato entre as células e seu meio ambiente³⁹.

Assim, para que o biomaterial recrie esse microambiente favorável para o desenvolvimento de tecidos é importante que se avalie não somente a biocompatibilidade, mas também suas propriedades físico-químicas e biológicas³⁴.

Diversos polímeros sintéticos biodegradáveis vêm sendo utilizados como matrizes na engenharia de tecidos, sendo que os mais empregados são os poliésteres poli(L-ácido láctico) (PLLA), o poli(D-ácido láctico) (PDLA), o poli(DL-ácido láctico) (PDLLA), o poli(ácido glicólico) (PGA), poli etilenoglicol (PEG) e seus derivados, entre outros⁴⁰. Em geral os poliésteres apresentam degradação por hidrólise. Inicialmente, ocorre difusão pelas regiões amorfas do polímero e quebra das ligações ésteres mais suscetíveis e posteriormente a degradação das regiões amorfas, através da quebra das ligações ésteres da porção cristalina⁴¹.

Atualmente, existem diversas técnicas para produção de matrizes de acordo com e espessura desejada, aplicação e a característica do polímero⁴². Dentre essas metodologias, destaca-se o *electrospinning*, prototipagem e *foaming* que são capazes de gerar suportes celulares com morfologias porosas que facilitam a adesão e proliferação das células para a formação dos tecidos³⁸.

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

O polímero PLGA tem gerado grande interesse na área de bioengenharia devido a sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e sua resistência mecânica ⁴³. Durante a década de 60 e início dos anos 70, esse polímero foi extensivamente estudado como fonte para a produção de suturas e fibras. Desde então, vem sendo utilizado em uma ampla gama de aplicações farmacêuticas e biomédicas. Vários dispositivos poliméricos, tais como microesferas, microcápsulas, nanopartículas, nanofibras, implantes, filmes, entre outros, já foram fabricadas a partir deste polímero ^{43, 44}.

O PLGA também tem sido relatado como um ótimo polímero para a fabricação de dispositivos de liberação controlada de agentes ativos como peptídeos, proteínas, vacinas e micromoléculas ⁴⁵, sendo alguns já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) ⁴³.

Esse polímero pode ser sintetizado a partir de reação de policondensação ou através da polimerização por abertura do anel dos seus respectivos monômeros cíclicos ⁴³. Os copolímeros de PLGA (Figura 1) preparados a partir de PLLA e PGA são cristalinos, enquanto os formados a partir de PDLLA e PGA são amorfos ⁴³. O PLA poli(ácido láctico) pode existir em duas formas: a forma estereoregular poli(L-ácido láctico) – (PLLA) ou a forma racêmica poli(D,L-ácido láctico) – (PDLA). O PLLA é semicristalino, devido a elevada regularidade das suas cadeias, enquanto que o PDLA é um polímero amorfo, devido a irregularidade estrutural das suas cadeias. O poliglicólico (PGA) é altamente cristalino, pois o mesmo não possui os grupos laterais metílicos do PLA ⁴¹.

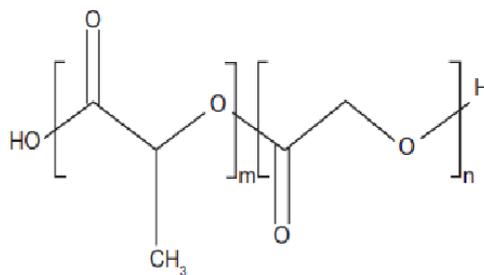


Figura 1. Estrutura química do polímero poli(ácido láctico-co-glicólico) – PLGA⁴³.

2.3 ELECTROSPINNING

A técnica de *electrospinning* (ES) ganhou notoriedade devido a sua capacidade de produzir fibras em escala nanométrica, podendo ser empregada em diversas aplicações, incluindo a engenharia de tecidos ⁴². A mesma vem sendo amplamente estudada na última década, não somente devido a sua grande versatilidade na produção de fibras, mas principalmente pela sua capacidade de formar fibras que variam de 2 nm até vários micrometros, o que é difícil de ser obtido através de outras tecnologias ⁴⁶.

Esse método funciona pelo princípio eletrostático, no qual são processadas soluções poliméricas produzidas a partir de diversos solventes e polímeros. A solução polimérica é colocada no aparato de ES por uma seringa, que é submetida a uma diferença de voltagem elétrica. Nesse processo, quando a tensão é aplicada na ponta da agulha, a solução polimérica forma um jato de material fluido que é acelerado e estirado, através de um campo elétrico. À medida que o solvente vai evaporando, as fibras formadas vão sendo coletadas em uma placa metálica ^{42,47} (Figura 2). Na figura 3 observa-se o aparato de *electrospinning* do laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sendo o mesmo utilizado para a produção das matrizes poliméricas desenvolvidas no presente estudo.

As nanofibras produzidas por ES oferecem inúmeras vantagens, tais como alta razão superfície/volume, porosidade ajustável e grande flexibilidade. Além disso, há a possibilidade de controlar a composição das nanofibras a fim de alcançar os resultados desejados de acordo com as suas propriedades e funcionalidades. A técnica de ES tem sido amplamente utilizada em diferentes aplicações tais como na produção de sensores óticos e químicos, indústria têxtil e também engenharia de tecidos. No caso da ET, há interesse em explorar essa técnica para a fabricação de suportes celulares, uma vez que, por esse método, as fibras produzidas mimetizam a estrutura da MEC em termos de variabilidade de diâmetros de fibras, topografia e textura ^{46,48}.

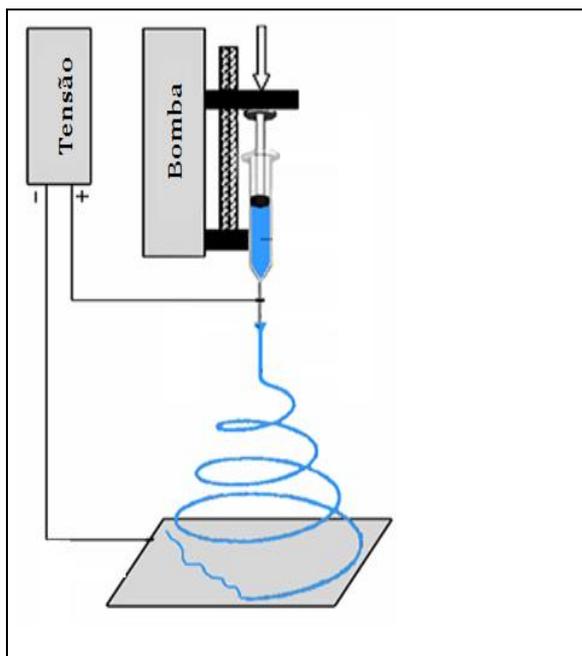


Figura 2. Representação esquemática do aparato de *Electrospinning* (adaptado de Ziabari e colaboradores)⁴²



Figura 3. Aparato de *electrospinning* (Laboratório de Células-tronco e Hematologia da Faculdade de Farmácia – UFRGS)

2.4 MATRIZES DE NANOFIBRAS NA ENGENHARIA DE TECIDOS

O uso de matrizes de nanofibras para a engenharia de tecidos é uma ferramenta promissora, que pode ser utilizada como suporte para o crescimento das células-tronco ⁴⁹. Diversos tipos celulares, tais como células-tronco mesenquimais, neurais, queratinócitos, condrócitos, osteoblastos, entre outros, vêm sendo testados com sucesso de cultivo sobre as matrizes produzidas por ES ⁵⁰.

Além disso, as matrizes de nanofibras apresentam semelhança morfológica, em estrutura e dimensões, com as fibras de colágeno da MEC, são facilmente produzidas e quando utilizadas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, não apresentam problemas referentes à rejeição em casos de transplantes ^{51,52,53}.

A MEC é um componente estrutural do nicho celular, tendo a sua estrutura básica formada por uma rede de nanofibras de colágeno, nas quais glicoproteínas, fatores de crescimento e proteoglicanos encontram-se aderidas ^{53, 54, 55}. *In vivo*, as células-tronco estão dispersas em uma configuração tridimensional por toda essa estrutura ^{53,54}.

A MEC não serve apenas para ancorar as células do organismo, mas também atua regulando as funções celulares, tais como a migração e proliferação, modulação e transdução

de sinais de fatores de crescimento e citocinas. Devido às propriedades versáteis da MEC, diversos tecidos descelularizados tem sido amplamente explorados na medicina regenerativa. Porém, a escassez de órgãos disponíveis para a sua utilização, aliado a possíveis problemas de rejeição, são fatores limitantes dessa alternativa ⁵⁶. Ainda, as matrizes de nanofibras quando comparadas com materiais densos, apresentam uma maior área de superfície, o que ajuda no reconhecimento celular e, portanto, favorece uma maior adesão e migração das células ⁵³.

Outra importante vantagem dessa alternativa está no fato das matrizes de nanofibras permitirem a localização do implante celular, assegurando sua correta distribuição no tecido-alvo. O ideal é que se proporcione maior contato das CTs no tecido a ser regenerado, bem como melhorar a sua capacidade proliferativa no local certo da lesão, evitando que as células migrem para outros locais, carregadas pela corrente circulatória ⁴⁹.

2.5 INCORPORAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO EM MATRIZES DE NANOFIBRAS

Comumente, a ET utiliza a combinação de células, matrizes biodegradáveis e fatores de crescimento para mimetizar os processos naturais de regeneração tecidual. Diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas para a combinação destes 3 fatores para utilização na ET: (1) semeadura de células diretamente sobre matrizes poliméricas e (2) matrizes acelulares contendo fatores de crescimento que, ao serem liberados no local da lesão, irão recrutar células progenitoras para os tecidos lesados ⁵⁷.

Atualmente, há uma tendência para a união dessas duas abordagens. Acredita-se que à medida que os FC contidos nas matrizes são liberados, os mesmos possam induzir a proliferação e a diferenciação das células durante o período de cultivo celular *in vitro*, incentivando a formação de um novo tecido quando implantado *in vivo*. Além disso, após o implante, as matrizes continuam a liberar fatores de crescimento o que causa um aumento na resposta fisiológica e, por conseguinte, contribui para um aumento na regeneração do tecido ⁵⁷.

Existem diversas estratégias para a incorporação de fatores de crescimento nas matrizes produzidas por *electrospinning*. Dentre as diversas abordagens descritas na literatura podemos destacar: (1) Adsorção física: a matriz, depois de produzida, é mergulhada em uma solução aquosa contendo o agente bioativo. Essa estratégia apresenta grandes limitações, uma vez que dificilmente os FC ligam-se às matrizes. Desse modo, não há como garantir a eficiência da técnica. (2) Incorporação do FC através de emulsões: na literatura o termo

“emulsão de *electrospinning*” é caracterizado pela mistura de uma suspensão de biomoléculas em uma solução polimérica, seja essa mistura feita por processos mecânicos, tais como ultrassonicação, ou por homogeneização convencional, ou ainda pela adição de um tensoativo. Nesse contexto, a idéia de emulsificação parte do princípio de misturar duas fases independentemente de como esse processo será realizado. Nessa abordagem, as moléculas bioativas encontram-se dispersas por toda a fibra e não somente na superfície, permitindo assim perfis de liberação mais controlados do que a adsorção física ⁵⁷. (3) *Electrospinning* coaxial: esta é uma variação da técnica principal, na qual duas soluções (solução polimérica e solução contendo o FC) são simultaneamente submetidas ao processo de *electrospinning*, através de duas seringas acopladas ⁵⁸. Nesta técnica a solução contendo o FC passa por dentro da solução polimérica, que forma a camada externa da nanofibra. O processo é descrito como promissor para a incorporação de drogas e fatores de crescimento. Esse método garante que o agente incorporado fique no interior das fibras formando o que é chamado de nanofibras do tipo casca-núcleo, na qual o agente bioativo fica encapsulado no núcleo das nanofibras ⁵⁷. Embora tenha um grande potencial para a incorporação de agentes bioativos esta técnica apresenta a desvantagem de ser um procedimento bastante complexo o que dificulta a sua execução ⁵⁷.

2.6 FATORES DE CRESCIMENTO E O FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR

A regeneração tecidual requer a transferência de uma grande quantidade de informações entre as diferentes populações celulares, tecidos e órgãos. Nesse contexto, os fatores de crescimento (FC), desempenham um papel importante, pois são responsáveis pela comunicação e interação dos órgãos e tecidos ⁵⁹. Os FC são polipeptídios que modulam a atividade celular, incluindo proliferação, diferenciação, migração, adesão e expressão gênica ⁵⁹. Os FC se ligam a receptores específicos na superfície celular ^{57, 59}. A concentração, a identidade química e a duração da resposta desses fatores é que irão determinar o destino da célula durante o processo de diferenciação ⁵⁹.

A via de administração dos FC é um fator crucial para a utilização na medicina regenerativa. A administração sistêmica através da via transdérmica é considerada bastante restrita devido ao elevado tamanho dos FC. A via oral, por sua vez, é ineficiente devido à baixa absorção dos FC e degradação do mesmo no trato-gastrointestinal. A administração

endovenosa tem sido utilizada com frequência. Porém, muitas vezes, os FC não chegam ao tecido-alvo, difundindo-se pela corrente circulatória ⁵⁹. Os dados demonstram que 24 horas após a infusão intracoronariana, menos de 0,1% do fator de crescimento permaneceu retido no tecido-alvo ⁵⁹.

Assim, para promover o efeito regenerativo, o tecido deve ficar exposto às proteínas endógenas por um período de tempo considerável que varia de dias até semanas ⁵⁹. Nesse sentido, as matrizes poliméricas tomam-se um bom veículo para a disponibilização adequada de diferentes FC, uma vez que propiciam um maior contato das células com o local a ser regenerado. Além disso, as matrizes ajudam a promover uma liberação lenta e controlada do princípio ativo, à medida que a matriz de nanofibras vai se degradando ⁵⁹. Nesse contexto, o ideal na ET é a obtenção de uma matriz que não só mimetize a topografia e constituição da MEC, mas que também tenha uma bioatividade aumentada. Assim, a integração de FC às matrizes, permite uma melhor modulação dos processos de migração, proliferação e diferenciação celular ⁵⁸.

A família do gene VEGF é constituída por vários membros incluindo o VEGF-A, B, C, D e PlGF. O VEGF-A é o membro mais bem caracterizado sendo descrito como uma glicoproteína homodimérica de 23 Kda. Até o momento, há, pelo menos, sete isoformas do VEGF-A descritas. As isoformas mais comuns são o VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉ e o VEGF₁₆₅, sendo esta última a de maior circulação e também a mais mitogênica ^{60,61}. Esse fator de crescimento é um dos principais reguladores da angiogênese promovendo proliferação, mitogênese, migração e diferenciação das células endoteliais, atuando também diretamente no aumento da permeabilidade vascular ^{8, 62}.

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vascularização pré-existente, sendo um evento essencial para o desenvolvimento normal e a homeostase dos tecidos ^{7, 8, 60}. Em condições fisiológicas, esse fator atua na embriogênese, no desenvolvimento tecidual, na ovulação, na formação do corpo lúteo e no processo de cicatrização ^{8, 60}. Além disso, diversas condições patológicas são caracterizadas por angiogênese excessiva ou insuficiente. As mais conhecidas são doenças com angiogênese excessiva como é o caso de câncer, artrite, doenças infecciosas e auto-imunes, entre outras. Dentre as doenças com angiogênese diminuída, destacam-se a diabetes, acidente vascular cerebral, osteoporose e doenças isquêmicas do coração ⁶¹.

O VEGF foi inicialmente chamado de fator de permeabilidade vascular (VPF) devido a sua capacidade de regular a permeabilidade vascular das proteínas plasmáticas e do plasma

^{8, 60}. Posteriormente, foi descrito como VEGF devido à descoberta de que o mesmo era um fator mitógeno das células endoteliais ⁶².

As terapias atuais para a regeneração de tecidos dependem da disponibilidade de uma série de fatores de crescimento, tais como o VEGF. Entretanto, os ensaios clínicos que visam promover a angiogênese e, conseqüentemente, o reparo tecidual, apresentam resultados limitados, devido à instabilidade dos fatores, aliado a falhas na via de administração dos mesmos no local da lesão. Assim, o uso de matrizes poliméricas biodegradáveis, representa uma boa abordagem para a tentativa de disponibilizar o VEGF no local onde se espera que a regeneração ocorra ⁶³.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de matrizes de nanofibras produzidas por *electrospinning* de emulsão, com ou sem o VEGF₁₆₅ incorporado, servirem como biomaterial para o crescimento de células-tronco para uso na engenharia de tecidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, cultivar e caracterizar as ADSCs obtidas a partir de produto de lipoaspirado;
- Desenvolver matrizes de PLGA através da técnica de *electrospinning* de emulsão;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos biomateriais produzidas por *electrospinning* de emulsão, tais como morfologia, diâmetro das fibras, ângulo de contato, teor residual de solventes, propriedades mecânicas e degradabilidade;
- Avaliar as propriedades biológicas dos biomateriais produzidas por *electrospinning* de emulsão, através das análises de adesão, viabilidade e citotoxicidade com células-tronco cultivadas nos biomateriais desenvolvidos;
- Incorporar o VEGF ao biomaterial produzido por *electrospinning* de emulsão e avaliar a sua eficiência de incorporação;
- Avaliar a cinética de liberação do VEGF a partir das nanofibras;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A metodologia detalhada para obtenção e cultivo das células-tronco mesenquimais encontra-se disponível no anexo I.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ADSCs COMO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (ANEXO II)

A metodologia detalhada para caracterização das ADSCs como células-tronco mesenquimais encontra-se disponível no anexo II.

4.3 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE ELECTROSPINNING

Dois tipos de matrizes com emulsão foram produzidos: (1) PLGA/BSA/VEGF e (2) PLGA/BSA. A matriz de PLGA/BSA/VEGF foi desenvolvida a partir de emulsão composta de uma fase orgânica constituída de PLGA 15% (m/m), 0,2 % de Span-80 e 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFIP) (Sigma-Aldrich®) e de uma fase aquosa constituída de tampão PBS, 0,1 % de Albumina Bovina (BSA), sendo adicionado 1 µg de VEGF para as matrizes de PLGA/BSA/VEGF. De acordo com dados da literatura, a concentração utilizada de FC para a incorporação em matrizes de nanofibras varia de 1 µg a 5 µg. Desse modo, no presente estudo, utilizou-se a concentração de 1 µg de VEGF em 2g de solução polimérica sendo esta solução submetida ao processo de *electrospinning*. A proteína BSA foi utilizada na matriz contendo VEGF, a fim de estabilizar o FC quando em contato com o solvente orgânico. A matriz de PLGA/BSA foi constituída da mesma forma que a matriz do primeiro grupo, com exceção da presença de VEGF, sendo, portanto, utilizada como controle do primeiro grupo. Ainda foi utilizado um terceiro grupo de matriz, também considerada controle, produzida a partir de solução polimérica 13% (m/m) utilizando o solvente HFIP, matriz essa denominada PLGA 13%.

As respectivas soluções poliméricas foram posicionadas entre eletrodos, os quais foram ligados à alta tensão. A tensão utilizada para a solução de PLGA/BSA/VEGF e PLGA/BSA foi de 18 kV, sendo aplicado 16kV no eletrodo positivo e 2kV no eletrodo negativo a uma distância de 20 cm da placa coletora, utilizando agulha de diâmetro interno de

0,80 mm e vazão de $0,28 \text{ mL.h}^{-1}$. Para a solução de PLGA 13% utilizou-se uma tensão de 14 kV no eletrodo positivo e 2 kV no eletrodo negativo, utilizando agulha de diâmetro interno de 0,80 mm, com vazão de $0,28 \text{ mL.h}^{-1}$ e distância de 15 cm entre a agulha e a placa coletora. As matrizes foram produzidas sobre temperatura controlada de $20^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$ e umidade de $30\% (\pm 5\%)$.

As matrizes produzidas apresentaram espessura de aproximadamente $45 \mu\text{m}$. As mesmas foram fixadas em lamínulas de vidro circulares de 15 mm de diâmetro utilizando solução polimérica de PLGA dissolvido em HFIP 11% (m/m) (figura 4A) Posteriormente, as mesmas foram depositadas em placas de cultivo de 24 poços e esterilizadas com luz ultravioleta por 1 hora, dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (Figura 4B).

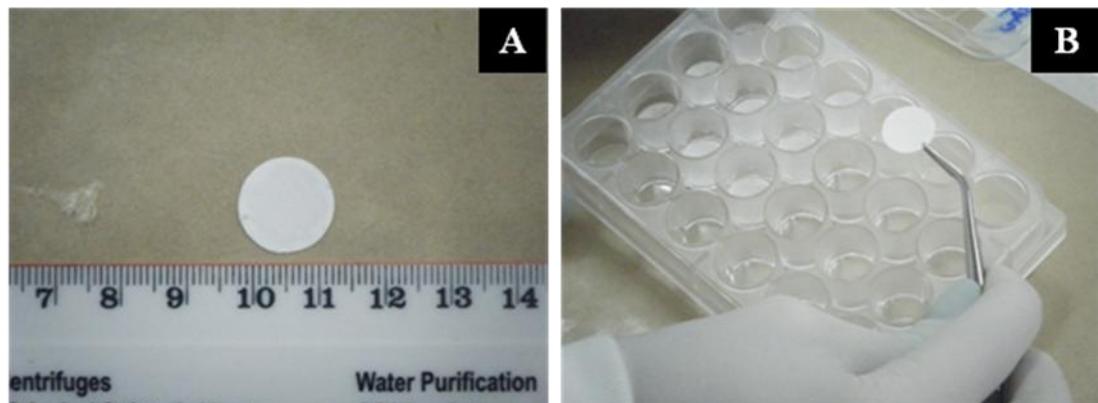


Figura 4. A e B) Matrizes de nanofibras produzidas pela técnica de *electrospinning*

4.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS

Para todos os testes descritos a seguir, foram analisadas nas matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%.

4.4.1 Morfologia

A avaliação da morfologia das matrizes foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) modelo JOEL - JSM 6060. As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 kV e faixa de magnificação de 1.000 a 20.000 x após as amostras serem

metalizadas com uma fina camada de ouro. As imagens foram realizadas em aumento de 4.000 x. Também foi realizada a análise do tamanho de poro, utilizando-se software Image J. Para essa estimativa, 10 poros de cada imagem foram analisados, sendo que 2 medidas, em direções opostas, foram tomadas de cada poro. A representação esquemática da medida do tamanho do poro pode ser observada na figura 5.

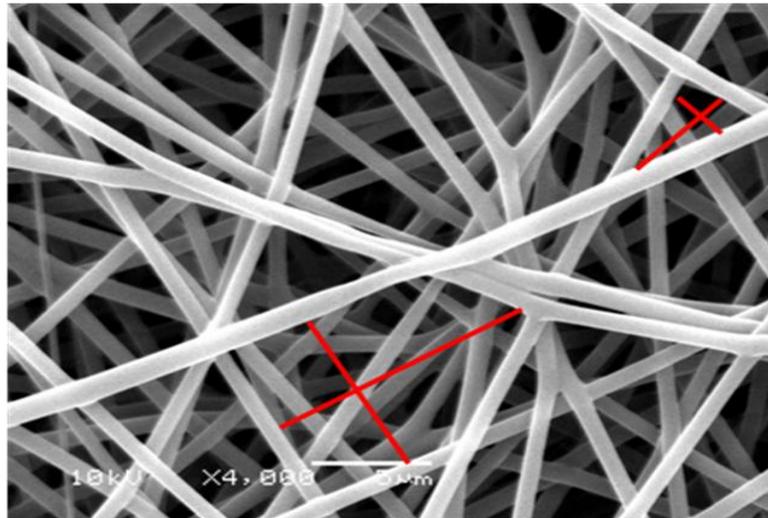


Figura 5. Micrografia esquemática da medida do tamanho de poro pelo software Image J.

4.4.2 Diâmetro das fibras

O diâmetro médio das fibras foi determinado utilizando o software ImageJ 1.38x, através da medida de 30 fibras de cada uma das imagens obtidas por MEV de 3 amostras produzidas em dias diferentes para cada grupo de matriz.

4.4.3 Teor de solvente residual

O teor de solvente residual foi avaliado através da análise termogravimétrica (TGA). As matrizes PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13% foram submetidas a uma rampa de aquecimento de 10°C/minutos até a temperatura de 500°C. Utilizou-se aproximadamente 10 a 12 mg de cada amostra para as análises. O equipamento utilizado foi o SDT Q600 – DSC – TGA simultâneo (TA Instruments).

4.4.4 Degradabilidade

Aproximadamente 30 mg de matrizes de cada grupo foram submersos em 10 ml de tampão PBS 1x e mantidos em rotação de 120 rpm a 37°C. A degradabilidade foi avaliada em diferentes períodos: 0 (matriz não submetida ao teste de degradabilidade) 7, 14 e 30 dias. As massas moleculares dos produtos de degradação foram determinadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) em um cromatógrafo GPCmax VE2001(Viscotek), equipado com detector triplo (índice de refração, viscosimétrico e por espalhamento de luz). Para as análises, 10 mg de cada amostra foram dissolvidos em 4 mL de THF, filtradas em filtros de PVDF com diâmetro de poro de 0,45 µm e analisadas à 45 °C utilizando THF como eluente, com fluxo de vazão de 1 mL.min⁻¹.

4.4.5 Caracterização das propriedades mecânicas

O perfil mecânico das diferentes matrizes foi determinado a partir do módulo de Young e da resistência à tração. Os ensaios de tensão-deformação foram realizados no Laboratório de Polímeros Avançados do Instituto de Química da UFRGS utilizando o equipamento DMA Q800 (TA Instruments) equipado com o dispositivo (*clamp*) *tension film* no modo DMA *Controlled Force*. Foram utilizados corpos de prova retangulares com aproximadamente 12 x 5 mm. A análise foi realizada a temperatura de 37°C com uma rampa de força de 0,5 N/min até 18 N sob uma força estática de 0,005 N.

4.4.6 Ângulo de Contato

A análise de ângulo de contato foi realizada em cinco amostras de cada grupo de matriz (PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%). Para isso, uma gota de água (aproximadamente 5 µL) foi instilada sobre a superfície da matriz com o auxílio de uma seringa e, em seguida, a gota foi fotografada em 4 diferentes tempos: 5 e 30 segundos, 1 e 2 minutos. Utilizando-se o *software* SurfTens 3.0, no mínimo três medidas de cada foto foram realizadas, através da utilização de 5 pontos de medida dispostos ao redor da gota. O resultado foi obtido pela média das medidas e apresentado como média ± desvio padrão. Também foi avaliado o ângulo de contato de filmes produzidos a partir das diferentes soluções poliméricas (PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%). Para a produção dos filmes poliméricos as

diferentes soluções foram vertidas em placas de *petri* e posteriormente armazenadas por 24 horas em dissecador submetido a vácuo. Nesse experimento, uma gota foi instilada em três diferentes pontos da superfície de cada filme, gerando três imagens em cada ponto. O ensaio foi realizado em quatro filmes produzidos por soluções poliméricas realizadas em dias diferentes.

4.5 ENSAIOS DE EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DO VEGF

4.5.1 Avaliação da Eficiência de Incorporação do VEGF

A matriz PLGA/BSA/VEGF foi submersa em 30 mL de solução de dissolução (uréia 5M; NaOH 0,1; SDS 0,08%; Tris 50 mM) conforme protocolo adaptado de Sahoo e colaboradores ⁶⁴. As matrizes foram mantidas em agitação a 140 rpm por 3 horas e 30 minutos, com dissolução completa das matrizes. Após esse período, todo o volume foi retirado e foi realizada a dosagem de VEGF. O cálculo da eficiência de incorporação foi realizado a partir da quantidade inicial de VEGF adicionada na emulsão (1µg de VEGF a cada 2g de solução polimérica), em comparação com a quantidade final de VEGF obtida após a dissolução das matrizes em tampão de dissolução. A verificação da concentração de VEGF foi realizada pelo ensaio colorimétrico ELISA (ELISA Kit Human VEGF, Invitrogen®) e absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, no equipamento Wallac EnVision (Perkin Elmer).

4.5.2 Avaliação da liberação de VEGF

Para avaliação da liberação de VEGF a partir das matrizes PLGA/BSA/VEGF, cerca de 192 mg ± 0,016 mg de matrizes foram imersas em 10 ml de meio DMEM contendo 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e fungizona. O mesmo ensaio foi realizado com a matriz PLGA/BSA utilizada como controle negativo, para avaliação da potencial presença de reação falso-positiva do teste de detecção de VEGF para um dos constituintes da matriz. As matrizes foram acondicionadas sobre agitação a 32g a 37°C. A concentração de VEGF foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA) (ELISA Kit Human VEGF, Invitrogen®) nos seguintes intervalos (2h, 8h, 24h, 72h, 168h, 336h e 504h). Em cada um dos pontos descritos acima, o

volume total de DMEM era retirado e a dosagem de VEGF realizada. O meio era então renovado com 10 mL de DMEM e mantido em agitação, com as subseqüentes dosagens até o tempo final de 504 h. A absorbância foi lida em espectrofotômetro Wallac En Vision (Perkin Elmer) no comprimento de onda de 450 nm para ambas as matrizes sendo a absorbância da matriz controle, descontada para os cálculos de concentração do FC. Os resultados foram expressos em porcentagem cumulativa de liberação.

4.6 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS ADSCs NAS MATRIZES DE NANOFIBRAS

Para todos os testes descritos abaixo foram utilizadas cinco culturas primárias diferentes de ADSCs e, para cada cultura celular, as análises foram realizadas em triplicata.

4.6.1 Morfologia das ADSCs aderidas às matrizes

A morfologia das células sobre as matrizes foi observada através de microscopia confocal. As células foram plaqueadas em uma densidade de 45.000 células por matriz e também foram semeadas em poços controles (células diretamente no poço da placa de cultura). Após 6h de incubação, as matrizes e poço controle foram lavados com PBS 1x, fixados com paraformaldeído 4% por 30 minutos e posteriormente foram permeabilizados com Triton X-100 0,1% por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a coloração com 50 µg/mL de faloidina conjugada com rodamina por 40 minutos, a fim de evidenciar os filamentos de actina do citoesqueleto celular. Após coloração com faloidina, as amostras foram lavadas com tampão PBS 1x e coradas com 0,5 mg/mL de DAPI durante 2 minutos. Utilizando-se microscópio confocal Olympus SV1000, fotografias de imagens representativas das diferentes amostras foram obtidas no em aumento de 10x. A partir dessas imagens, foram obtidas imagens com zoom digital de 4x em algumas regiões das matrizes e poço controle.

4.6.2 Adesão celular

A adesão celular foi analisada por coloração DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*), um marcador de núcleo celular. As ADSCs foram semeadas na densidade de 30.000 células por matriz (PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13%) e também diretamente nos poços

de placa de cultivo. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Transcorrido 6 horas após a semeadura, as células integradas às matrizes foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% e coradas com DAPI 5µg/mL em PBS por 2 minutos. Após, lavagens com tampão PBS 1x foram realizadas para a remoção do excesso de corante. As análises foram realizadas em microscópio invertido, sendo as imagens obtidas de 9 pontos aleatórios escolhidos em cada matriz com aumento de 400x. Depois de realizada a contagem do número das células nas imagens, a média de células por tipo de matriz foi avaliada e o resultado expresso como média de células por imagem aumento de 400x para cada grupo.

4.6.3 Avaliação de Células Metabolicamente Ativas

O número de células metabolicamente ativas foi avaliado pelo ensaio colorimétrico Método do sal de tretazolium (MTT) (Sigma-Aldrich®) em 1, 4, 7, 14 e 21 dias após a semeadura das células nos diferentes grupos de matrizes poliméricas e também em poços controles (células semeadas diretamente no poço da placa de cultivo). Um total de 45.000 células foi semeado por matriz em placas de 24 poços. Transcorrido o tempo de experimento com trocas de meio a cada três dias, as células foram incubadas com 0,25µg/mL de MTT em solução tampão de fosfato salina livre de cálcio e magnésio resultando em 400µL de solução por poço de cultivo, durante 2h. Após a remoção do reagente, adicionou-se 400µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço a fim de dissolver os cristais formados. A absorbância foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 560 nm e 630 nm. Os resultados foram calculados através da diferença entre os comprimentos de onda (560 nm – 630 nm) e expressos como valor médio de absorbância por grupo. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento Wallac En Vision (Perkin Elmer).

4.6.7 Citotoxicidade

A citotoxicidade celular foi avaliada através da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Labtest). O teste foi realizado em alíquotas do sobrenadante das culturas celulares e as dosagens de LDH realizadas nos seguintes tempos 4, 7, 14 e 21 dias de cultivo. Para isso, além das matrizes, também foram avaliados dois grupos controles: controle negativo, no qual as células eram aderidas diretamente nos poços, e controle positivo, no qual as células eram aderidas diretamente nos poços e no dia da dosagem adicionado Triton X-100

(Sigma-Aldrich®) na concentração de 1% (v/v). O Triton X-100 tem a função de causar a morte celular total, ou seja, verificar a liberação máxima de LDH. A leitura da absorbância foi realizada no Wallac EnVision (Perkin Elmer).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados para o ensaio de adesão, citotoxicidade e viabilidade celular foram representados através de médias e erro padrão. Os demais resultados foram representados através das médias e desvio padrão. As células metabolicamente ativas, o ensaio de citotoxicidade e o ângulo de contato foram avaliados por análises de medidas repetidas a dois fatores: tempo e grupo (Hotelling) e como pós-teste foi utilizado Bonferroni.

As análises de adesão foram avaliadas por ANOVA (One Way) e como pós-teste foi utilizado Tukey. Para critérios de decisão foi utilizado o nível de significância de 5%. Os resultados foram gerados pelo programa SPSS 16.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO ADIPOSEO-DERIVADAS

No presente estudo, o tecido adiposo extraído por lipoaspiração foi escolhido como fonte para extração de células-tronco devido à facilidade de obtenção, uma vez o mesmo é descartado como material biológico logo após o procedimento cirúrgico. Além disso, diversos estudos demonstram a abundância das ADSCs no tecido adiposo, que chegam a ter até 500 vezes mais células-tronco do que a medula óssea e ainda apresentam um percentual de proliferação em cultivo bastante elevado quando comparado com outras fontes de células-tronco^{65,13}.

As células obtidas a partir de produto de lipoaspirado foram isoladas, cultivadas e caracterizadas com sucesso. As mesmas apresentaram morfologia típica de CTM no cultivo *in vitro* e foram diferenciadas com êxito em adipócitos, condrócitos e osteócitos (Figura 6).

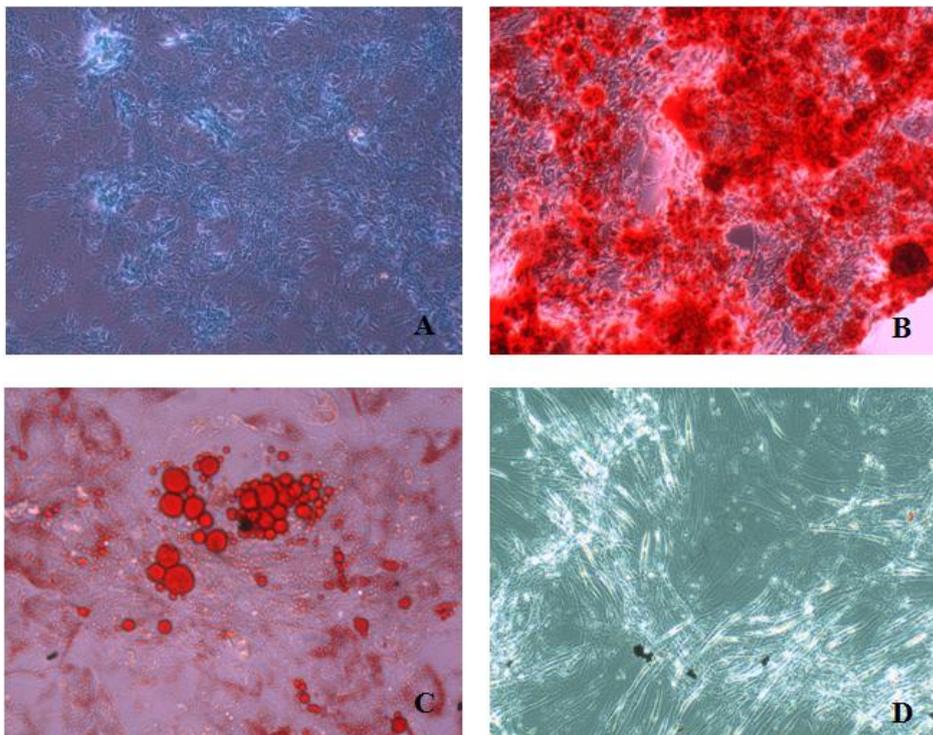


Figura 6. Diferenciação das ADSCs: A) diferenciação condrogênica por coloração com Alcian Blue, B) diferenciação osteogênica por coloração com Alizarin Red, C) diferenciação adipogênica por coloração com Oil Red e D) células não diferenciadas e

não submetidas à coloração com morfologia típica de CTMs . Imagens A, B e D foram realizadas a partir de aumento de 20x e a imagem C a partir de aumento de 40x.

Em relação à análise do perfil imunofenotípico de duas culturas primárias (n=2), as células apresentaram marcação positiva para os seguintes marcadores: CD29 ($98,2 \pm 1,1\%$), CD44 ($76,65 \pm 2,55\%$), CD73 ($83,2 \pm 15\%$) e CD90 ($90,05 \pm 8,65\%$). Alguns marcadores apresentaram baixa expressão: CD34 ($3,15 \pm 1,75\%$), CD184 ($0,6 \pm 0,6\%$) e STRO-1 ($2,8 \pm 2,5\%$) e outros se mostraram negativos: CD14, CD45 e HLA-DR. Observa-se na figura 7 o resultado parcial para uma cultura de ADSCs.

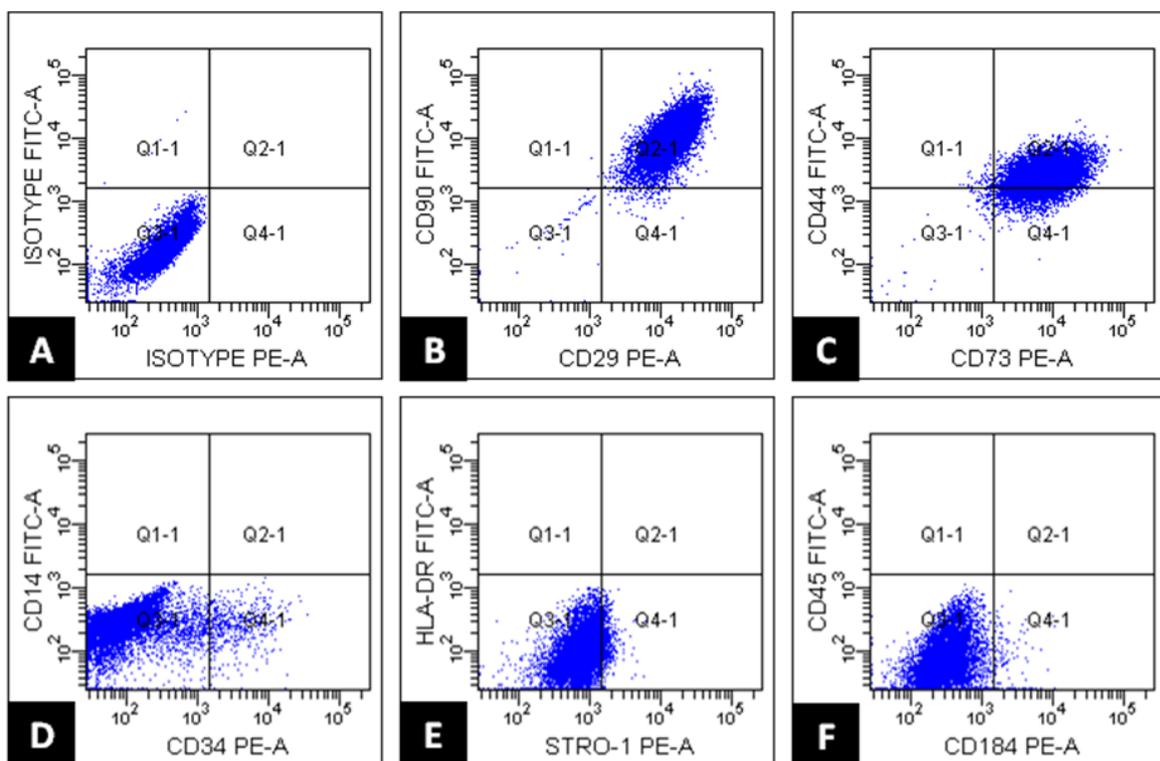


Figura 7. Análise do perfil imunofenotípico das ADSCs na quinta passagem celular. A) controles isotípicos, B) CD29/PE e CD90/FITC, C) CD44/FITC e CD73/PE, D) CD14/FITC e CD34/PE, E) HLA-DR/FITC e STRO-1/PE, e F) CD45/FITC e CD184/PE.

Os dados de imunofenotipagem, aliados aos resultados de morfologia e diferenciação das ADSCs nas três linhagens germinativas permitem a caracterização das células como CTMs conforme os critérios preconizados pela *International Society for Cellular Therapy*¹⁷.

6.2 MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS FIBRAS

No presente estudo, as fibras foram obtidas através da otimização de parâmetros tais como, concentração das soluções poliméricas, solvente utilizado, tensão aplicada, taxa de fluxo e distância entre a agulha e a placa coletora do ES.

Na análise por MEV dos três grupos de matrizes, observou-se que todas apresentaram fibras bem formadas, aleatoriamente distribuídas, sem *beads*, ou contas, e com poros interconectados (Figura 8). Os resultados do diâmetro das fibras para o grupo PLGA/BSA/VEGF foram de 588 ± 123 nm, enquanto o grupo de matrizes PLGA 13% apresentaram diâmetro de 554 ± 164 nm. Já as fibras do grupo PLGA/BSA apresentaram um diâmetro médio de fibra de 520 ± 131 nm sendo estatisticamente diferente dos demais grupos, com $p < 0,05$ para as matrizes e PLGA/BSA/VEGF e $p < 0,001$ para as matrizes de PLGA 13%.

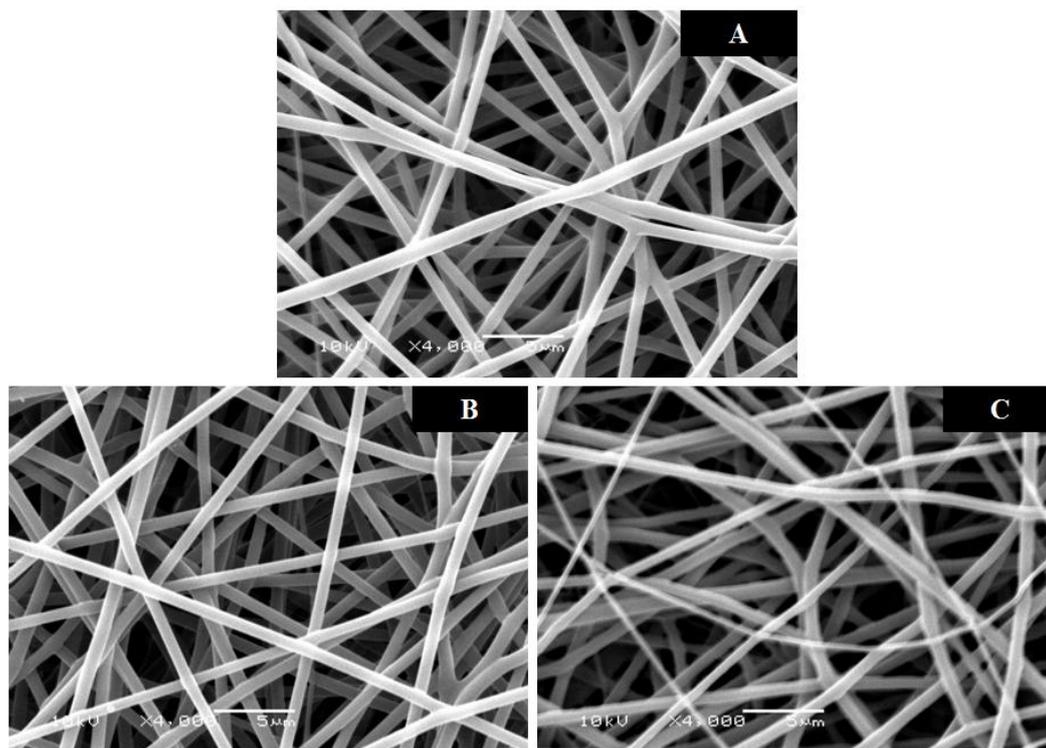


Figura 8. Fotomicrografia da morfologia das matrizes por MEV (aumento de 4.000x): A) matriz PLGA/BSA/VEGF, B) matriz PLGA/BSA e C) matriz PLGA 13%.

Na análise do gráfico de distribuição do diâmetro das fibras dos diferentes grupos, pode-se observar que as matrizes apresentaram fibras com ampla distribuição de diâmetro,

variando de (150 a 950 nm) para todos os três grupos (Figura 9), demonstrando um perfil de distribuição normal semelhante a MEC.

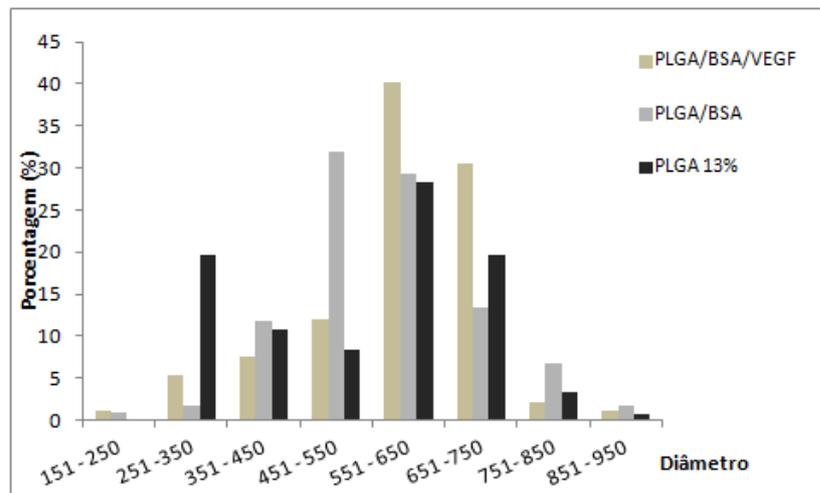


Figura 9. Demonstração da distribuição dos diâmetros das fibras com valores variando de 100 – 950 nm para os três grupos de matrizes produzidas (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

Os valores de tamanho de poro foram de $4,96 \pm 1,78 \mu\text{m}$ para as matrizes PLGA/BSA/VEGF; $4,56 \pm 2,03 \mu\text{m}$ para as matrizes PLGA/BSA e $5,01 \pm 2,19 \mu\text{m}$, para as matrizes PLGA 13%. Não se observou diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). A medida do tamanho de poro determinada pelo software Image J é bidimensional, desse modo não pode ser considerada uma medida real, uma vez que os poros são estruturas tridimensionais. Porém, essa análise permite ao menos estimar se os poros encontrados foram condizentes com o desenvolvimento celular.

O tamanho, o número e a interconectividade dos poros nas matrizes são fatores importantes na determinação da sua compatibilidade com as células⁶⁶. Tamanho de poros variando de micrômetros para a escala milimétrica afeta fortemente o tráfego celular, pois poros extremamente grandes não permitem o contato das células com o biomaterial. Em contraste poros menores que 100 nm influenciam negativamente a difusão de nutrientes e oxigênio e a eliminação de resíduos. Nesse sentido, uma difusão inadequada de nutrientes pode resultar na redução da sobrevivência celular. Desse modo, a porosidade do biomaterial necessita ser equilibrada, a fim de se obter uma boa integração com as células.⁶⁶

Assim, a análise de tamanho de poro por Image J para os três grupos de matrizes do presente estudo, mostraram-se adequadas ao cultivo celular, uma vez que os poros com

tamanhos intermediários na escala micrométrica podem possibilitar uma eficiente chegada de nutrientes e oxigênio bem como uma eficiente eliminação de resíduos.

Em relação à medida dos diâmetros das fibras, apesar de ter ocorrido diferença estatística entre os diâmetros das matrizes PLGA/BSA com os demais grupos, acredita-se que não há relevância fisiológica, uma vez que os valores são bastante semelhantes e todos os grupos apresentaram fibras na escala nanométrica, semelhantes a MEC. Ainda, a estrutura das nanofibras obtidas exibiu características ideais para a ET, pois apresentaram dimensões que se assemelham a dos componentes da MEC, cujos diâmetros variam de 100 a 600 nm ³⁵, mimetizando um ambiente adequado para a adaptação celular. Quando em contato com as células, essa estrutura permite uma elevada organização celular ⁶⁷, redução da apoptose e necrose, bem como permanência da funcionalidade das células ⁶⁸.

Além disso, as nanofibras apresentaram um elevado número de poros interconectados como pode ser observado pelas imagens de MEV, assegurando o arranjo tridimensional que pode favorecer não só a migração celular, bem como garantir as trocas de nutrientes e metabólitos com o meio externo ⁶⁹.

6.3 TEOR DE SOLVENTE RESIDUAL

Os solventes orgânicos, como por exemplo o HFIP, utilizados para a produção de matrizes de nanofibras podem ser nocivos para as células ^{70, 71}. Durante o processo de ES há evaporação do solvente no entanto, não há garantias que não permaneça uma pequena quantidade de solvente nas fibras. Desse modo, a verificação do teor de solvente residual foi realizada por análise termogravimétrica.

Por esta técnica, decréscimos de massa abaixo de 200°C geralmente referem-se à volatilização de solventes ou água presentes na amostra. O perfil desta análise pode ser observado na figura 10. As perdas de massa para os três grupos de matrizes ocorreram entre 50°C e 75°C. Os valores de perda de massa e de solvente residual encontram-se dispostos na tabela 1.

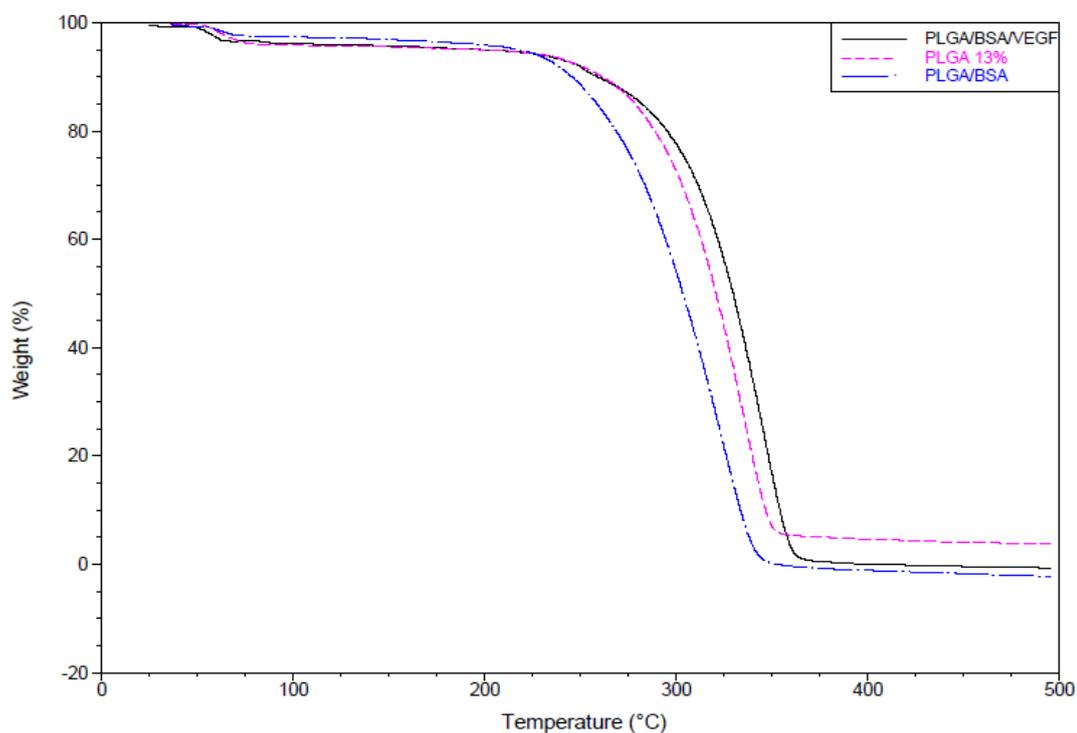


Figura 10. Gráfico obtido através de análise termogravimétrica demonstrando a percentagem de perda de massa para as matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%.

Tabela 1. Quantidade média de solvente residual nas diferentes matrizes (n=3)

| Matrizes | Solvente Residual | |
|---------------|-------------------|-----------------------------|
| | Perda de massa % | Concentração de HFIP em ppm |
| PLGA/BSA/VEGF | 2,46 ± 0,21 | 14,5 ± 1,23 |
| PLGA/BSA | 1,5 ± 0,22 | 10,4 ± 1,52 |
| PLGA 13% | 3 ± 0,45 | 29,6 ± 4,44 |

Conforme os dados da literatura, os limites de tolerância temporária de exposição (TEELs) à agentes químicos apresentam classificações que vão de TEEL-0 a TEEL-3^{72,73}. As classificações de TEEL-1, TEEL-2, TEEL-3 são derivadas e calculadas a partir de TEEL-0⁷³. Concentrações iguais ou inferiores a TEEL-0 não oferecem nenhum risco apreciável a saúde, já o TEEL-2 é classificado como a concentração máxima a qual acredita-se que quase todos

os indivíduos podem ser expostos sem desenvolver efeitos graves ou irreversíveis à saúde ⁷². O TEEL-0 para o HFIP é de 7,5 ppm e o TEEL-2 é de 157, 5 ppm, para o mesmo ⁷⁴.

Nesse estudo, os valores de solvente foram 14,5; 10,4 e 29,6 ppm para as matrizes PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%, respectivamente. Desse modo, observa-se que os valores de HFIP residual encontrados estão dentro dos valores aceitáveis estabelecidos como limite de exposição temporária e, por isso, não seria prejudicial ao desenvolvimento das células.

Ainda, Nam e colaboradores (2007), devido ao fato de não encontrarem dados na literatura referentes ao impacto do solvente residual HFIP em matrizes para cultivo celular, desenvolveram um estudo no qual avaliaram a quantidade de HFIP residual em matrizes de PCL produzidas por ES. Esse estudo demonstrou que valores de até 250 ppm desse solvente não acarretaram toxicidade para condrócitos *in vitro* ⁷⁵. Embora as ADSCs e condrócitos sejam células totalmente distintas, em analogia ao trabalho de Nam e colaboradores, os valores encontrados de solvente residual, no presente estudo, mostraram-se muito inferiores a 250 ppm. Desse modo pode-se sugerir que as matrizes não apresentaram citotoxicidade para as células. Ainda, correlacionando esse achado ao teste de citotoxicidade pela dosagem de LDH, desenvolvido no presente trabalho e citado a seguir, observa-se que as matrizes para todos os grupos analisados não acarretaram nenhum efeito negativo para as células. Observou-se que as dosagens de LDH em todos os grupos de matrizes foram muito semelhantes ao controle negativo de citotoxicidade, dados que serão posteriormente apresentados. Por fim, ainda cabe destacar que o organismo apresenta mecanismo para eliminação urinária do HFIP através da sua conjugação com o ácido glucurônico via citocromo P450 ⁷⁶.

6.4 DEGRADABILIDADE

O ensaio de degradabilidade foi realizado simulando condições fisiológicas a 37°C em tampão PBS 1x pH 7,4. Aos 30 dias de análise, a taxa de degradação para o grupo PLGA/BSA/VEGF foi de aproximadamente 25%, sendo de 22% para o grupo PLGA/BSA e 25% para as matrizes de PLGA 13%. Na análise temporal, não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados ($p > 0,05$).

Analisando-se a figura 11, observa-se que o processo de degradação nos diferentes grupos de matrizes inicia após o 7º dia de ensaio, ou seja, a partir desse período iniciou-se a quebra das cadeias moleculares, com um decréscimo na massa molecular.

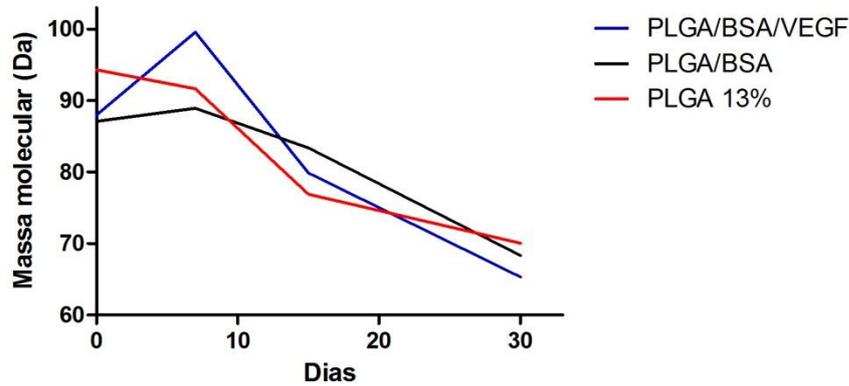


Figura 11. Perda de massa molecular avaliada por cromatografia de permeação em gel, em diferentes períodos: 0 (não submetido ao processo de degradação), 7, 14 e 30 dias. (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

A degradabilidade de um biomaterial *in vivo* envolve uma vasta gama de mecanismos, tanto físico-químicos como eventos biológicos^{77,78}. Dentre as propriedades físico-químicas, a solubilidade do material desempenha um papel importante na degradação. Biomateriais altamente solúveis são rapidamente reabsorvidos pelos fluídos biológicos não acompanhando a regeneração do tecido. Assim, biomateriais com baixa solubilidade apresentam uma reabsorção ineficiente permanecendo no local da lesão por longos períodos de tempo, o que pode acarretar a não regeneração ou regeneração inadequada do tecido. Desta forma, a degradação é um ponto importante que deve ser avaliado de acordo com o local onde se quer regenerar, ou seja, a taxa de degradabilidade do biomaterial deve ser semelhante à taxa de regeneração do tecido⁷⁷.

Com relação aos resultados apresentados anteriormente, a degradação dos três tipos de matrizes produzidas foi relativamente rápida, uma vez que em 30 dias observou-se uma taxa de degradação de aproximadamente 25%. Deve-se considerar que *in vivo*, a taxa de degradação provavelmente será ainda maior, uma vez que outros componentes plasmáticos podem acelerar este processo. Com isso, considera-se que as matrizes produzidas podem ser boas candidatas à regeneração de tecidos com rápida taxa de regeneração, ou até mesmo para processos que visem uma cicatrização funcional, uma vez que o processo de cicatrização é bastante rápido⁷⁹. Ainda, considerando o uso dessas matrizes como dispositivos de liberação controlada de FC, sugere-se que o ideal é uma rápida degradação, pois após a *burst* inicial, a liberação dos agentes bioativos ocorre à medida que as matrizes vão sendo degradadas⁵⁷.

Nesse sentido, caso as matrizes tivessem uma degradação lenta, o FC não seria liberado em tempo hábil para promover a regeneração tecidual.

6.5 ÂNGULO DE CONTATO

Outra característica importante dos biomateriais é obtida pela medição do ângulo de contato. Esse ângulo é a medida do ângulo formado entre uma gota de água e a superfície do material em análise. Essa medida pode ser utilizada para determinar as características de hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade. Os materiais são considerados hidrofílicos quando a medida do ângulo de contato for inferior a 90° e hidrofóbicos quando esta medida for superior a 90°. Estudos demonstram que ângulos de contato moderados com valores entre 40° a 70° são ideais para a aderência celular⁸⁰.

O ângulo de contato foi avaliado nos três tipos de matrizes produzidas por ES. Também foi analisado o ângulo de contato em filmes poliméricos produzidos a partir das emulsões PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e solução polimérica PLGA 13%. Os resultados que se seguem foram divididos em dois tópicos para um melhor entendimento.

6.5.1 Ângulo de contato nas matrizes de nanofibras

Foi realizada a medida dos ângulos de contato das matrizes em diferentes períodos 5, 30, 60 e 120 segundos com intuito de verificar uma possível mudança no ângulo de contato com o passar do tempo. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Medidas de ângulo de contato nas matrizes PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13% e em diferentes períodos de tempo em segundos (n = 4).

| | Angulo de Contato (°) | | | |
|----------------------|-----------------------|---------------|---------------|--------------|
| | 5s | 30s | 60s | 120s |
| PLGA/BSA/VEGF | 121,12 ± 4,4 | 89,8 ± 6,5 | 126,22 ± 5,11 | 121,6 ± 6,61 |
| PLGA/BSA | 103,3 ± 6,26 | 102,7 ± 7,57 | 101 ± 8,64 | 98,7 ± 8,94 |
| PLGA 13% | 108,6 ± 2,61 | 107,21 ± 2,72 | 107,25 ± 2,84 | 105,7 ± 3,4 |

Na análise temporal, as matrizes produzidas nos três grupos demonstraram um perfil hidrofóbico em praticamente todos os períodos avaliados, exceto em 30 segundos para as matrizes PLGA/BSA/VEGF, na qual se observa um ângulo condizente com materiais hidrofílicos. Porém, essa diferença parece aleatória uma vez que não ocorre nos tempos seguintes, para os quais se observa novamente um perfil hidrofóbico. Em relação aos resultados obtidos, alguns estudos demonstram que as matrizes produzidas a partir de emulsões apresentam uma redução significativa na medida do ângulo de contato, o que não foi observado nesse estudo^{81, 82}. Alguns estudos demonstram, que materiais com estruturas porosas e rugosas apresentam características hidrofóbicas, devido a grande quantidade de ar presente nos poros desses materiais^{83, 84}. Assim, uma hipótese para os valores hidrofóbicos encontrados nesse estudo, seria a grande quantidade de poros presentes nas matrizes produzidas por ES o que pode ter afetado a medição do ângulo de contato, provocando a hidrofobicidade dos biomateriais.

6.5.2 Ângulo de contato nos filmes poliméricos

O ângulo de contato analisado nos filmes poliméricos foi medido em três pontos escolhidos aleatoriamente em cada uma das amostras estudadas. Os três tipos de filmes produzidos apresentarem perfil hidrofílico com ângulos de contato inferiores a 90°. Os filmes produzidos a partir da solução PLGA/BSA/VEGF apresentaram o perfil mais hidrofílico com ângulo de contato de 55,22 ± 3,22, sendo este estatisticamente menor (p<0,05) que o ângulo encontrado para os filmes PLGA 13% 62,73 ± 4,66. Os filmes de PLGA/BSA apresentaram ângulo de contato intermediário 61,72 ± 4,3 não demonstrando diferença estatística em relação aos outros grupos (p >0,05) (Figura 12).

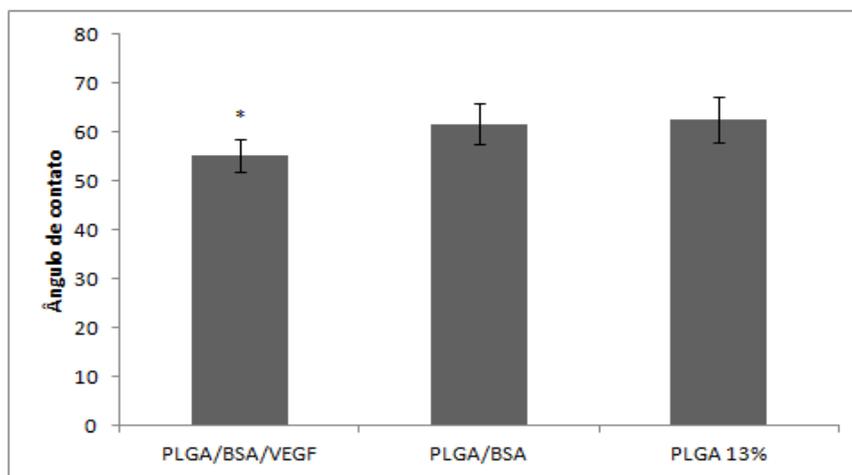


Figura 12. Ângulo de contato nos filmes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13% com valores médios de 55,22° ± 3,22°; 61,72° ± 4,3° e 62,73° ± 4,66°, respectivamente.

Embora os três tipos de filmes produzidos apresentem perfil hidrofílico, o menor ângulo de contato, ou seja, a maior hidroflicidade, encontrada nos filmes PLGA/BSA/VEGF, sugere que estas matrizes proporcionem melhores resultados na adesão celular, uma vez que, conforme estudos anteriores, as células apresentam uma maior adesão e crescimento em materiais hidrofílicos, portanto esses são os mais recomendados para uso em aplicações biomédicas^{85, 86, 87}. De fato, esses resultados corroboram com os dados de adesão celular obtidos, que serão posteriormente apresentados.

6.6 PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS MATRIZES

O ensaio de tração foi realizado nos três grupos de matrizes a fim de avaliar possíveis mudanças no comportamento mecânico. O perfil dinâmico-mecânico das diferentes matrizes foi demonstrado a partir do módulo de Young e da tensão máxima de deformação. O comportamento mecânico das matrizes pode ser observado na figura 13.

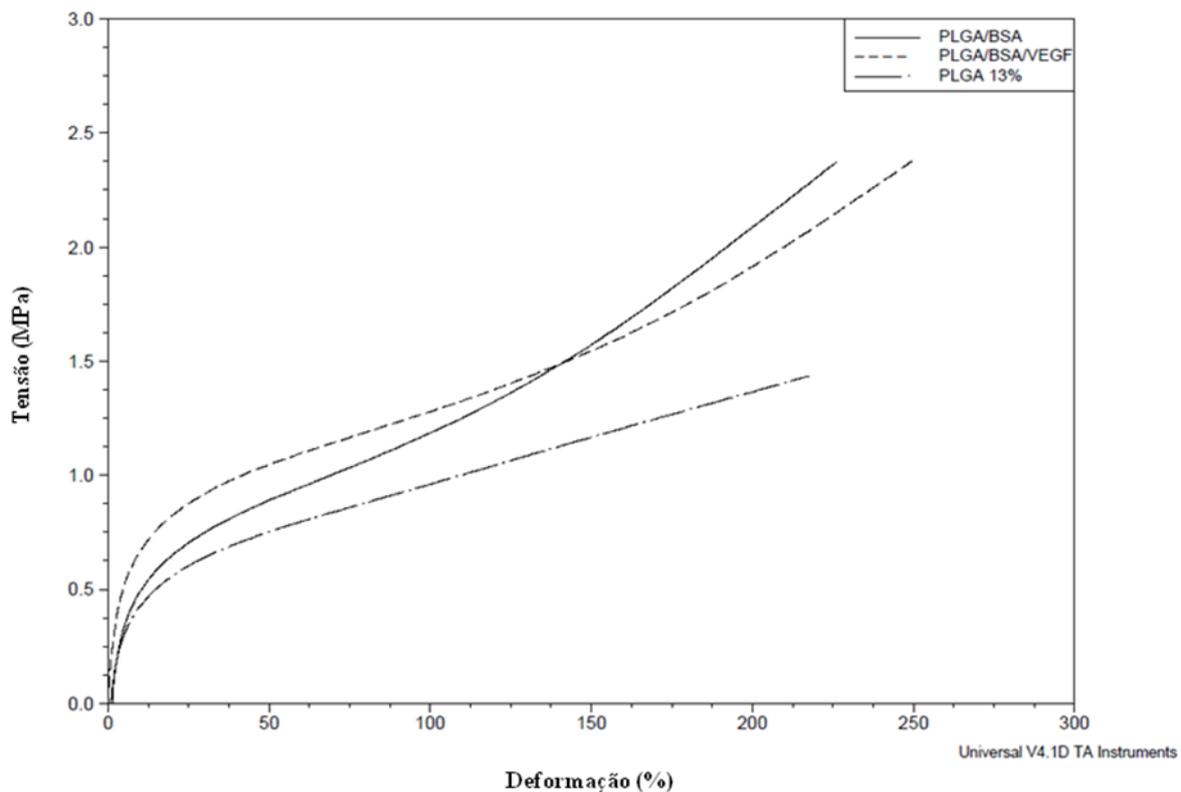


Figura 13. Imagem representativa do perfil dinâmico-mecânico das diferentes matrizes em função da tensão X deformação. (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

O módulo de Young e a tensão máxima de deformação para as matrizes PLGA/BSA/VEGF foram de $25,3 \pm 5,59$ e $2,2 \pm 0,13$, respectivamente. As matrizes PLGA/BSA apresentaram módulo de Young médio de $20,4 \pm 5,02$ e tensão máxima de deformação de $2,4 \pm 0,44$. O grupo de matriz PLGA 13% apresentou valores de $15,41 \pm 5,41$ e $1,5 \pm 0,20$ de módulo de Young e tensão máxima de deformação, respectivamente. Cabe destacar que nenhuma das amostras sofreu ruptura.

Tanto o módulo de Young quanto a tensão máxima de deformação foi maior nas matrizes PLGA/BSA/VEGF quando comparadas ao controle PLGA 13% ($p < 0,05$). As matrizes PLGA/BSA apresentaram valores intermediários para o módulo de Young, não tendo diferença estatística em relação a nenhum outro grupo. Porém, deve-se destacar que a mesma também apresentou uma tensão máxima de deformação maior que o PLGA 13% ($p < 0,05$) e não obteve diferença estatística com a matriz PLGA/BSA/VEGF (Figura 14).

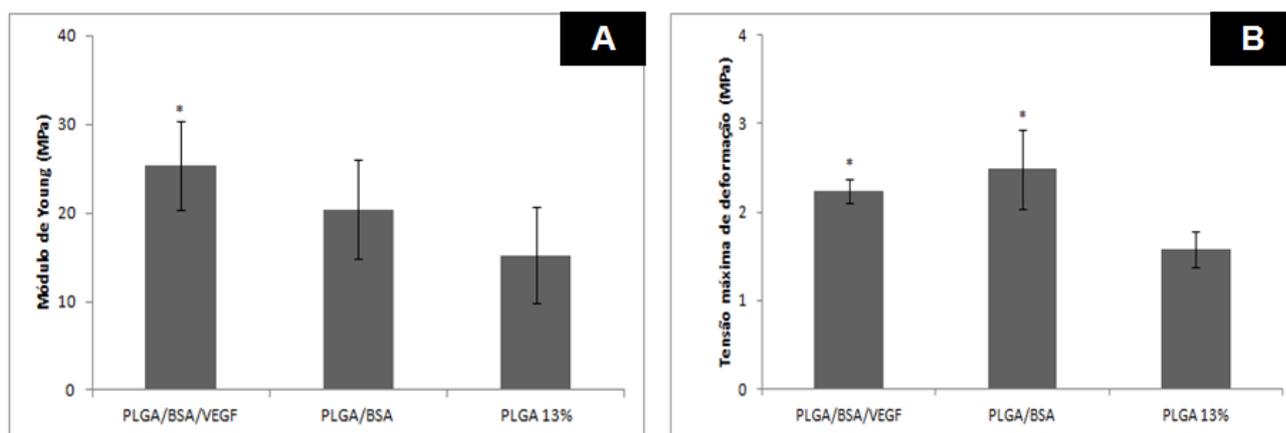


Figura 14. A) Média dos valores de módulo de Young para os diferentes grupos de matrizes, B) tensão máxima de deformação. (matrizes de PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%).

O módulo de Young das matrizes PLGA/BSA não apresentou diferença estatística com as matrizes de PLGA 13% e PLGA/BSA/VEGF. No entanto, de modo geral, pode-se observar que as matrizes produzidas a partir de emulsão apresentaram um maior módulo de Young e também uma maior tensão máxima de deformação. Dessa forma, essas matrizes mostraram-se mais resistentes que as matrizes PLGA 13%. Esse aumento na resistência à tração nas matrizes, produzidas a partir de emulsão, pode ser relacionado à presença de nanopartículas de Span-80 contidas na emulsão, que podem ter se ligado às nanofibras atuando como um reforço na resistência das mesmas. Esse resultado é corroborado por um estudo anterior de Xiaoqiang e colaboradores (2008), no qual ocorreu um aumento no módulo de Young nas matrizes produzidas a partir de emulsão contendo o surfactante Span-80⁸¹.

6.7 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO E ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO VEGF

Na análise do grupo de matrizes PLGA/BSA/VEGF, a taxa de incorporação do FC à matriz foi de $3,47 \pm 0,96$ % (n=3). Um achado semelhante foi observado por Chew e colaboradores (2005) que encontraram resultados de eficiência de incorporação de 3,10% para o fator neural growth factor (NGF)⁸⁸. Outro estudo utilizando matrizes de PLGA produzidas a partir de emulsão, mas que não incorporou fator de crescimento, mas a proteína BSA, demonstrou uma eficiência de incorporação de 1,56% para a mesma⁸⁹.

Deve-se destacar que a grande maioria dos trabalhos que realizam testes de liberação controlada de biomoléculas, tais como fatores de crescimento, que é o foco do presente estudo, não demonstram os resultados dos testes de eficiência de incorporação, indicando apenas o perfil de liberação acumulado ao longo do tempo^{82, 90, 91-92}. Desse modo, são raros os estudos com possibilidade de comparação dos resultados obtidos no presente trabalho. A ausência dos dados na literatura sobre a eficiência de encapsulamento ou incorporação de FC pelo método de *electrospinning* de emulsão é um limitante no momento de definir o método para incorporação de FC para o cultivo de células-tronco. O fato de apenas dados sobre a cinética de liberação ser publicados, sem eficiência de incorporação ser demonstrada induz os pesquisadores a escolherem um método não muito eficiente para a incorporação de tais moléculas. Por outro lado. Os fatores de crescimento são moléculas muito instáveis, com uma meia-vida muito curta, o que dificulta o processo de incorporação dessas moléculas de modo a manter a sua atividade. Por esse motivo, é fundamental que o FC seja incorporado às nanofibras através de um método que possa manter a maior quantidade possível desse fator nas fibras, para minimizar o problema da perda da atividade biológica do fator.

A maioria dos estudos descritos na literatura concentram seus experimentos no perfil de liberação, demonstrando que matrizes produzidas a partir do *electrospinning* de emulsões apresentam um perfil de liberação mais controlado com duração variando de dias até semanas. Nesses estudos, a liberação controlada foi atribuída ao fato de que matrizes produzidas a partir de emulsões geram fibras com os agentes bioativos dispersos por toda a sua estrutura e não apenas na superfície. Assim essas fibras permitiriam um maior controle da liberação dos agentes bioativos. Em geral esses sistemas foram definidos, por diversos autores na literatura, como eficazes para a liberação controlada de agentes bioativos. Ainda, esses dispositivos foram caracterizados como promissores para o uso na ET^{82, 90, 91, 93}. Com os resultados obtidos no presente estudo, observou-se que o *electrospinning* de emulsão é um método adequado para o cultivo de células-tronco, porém não se mostrou eficiente para a incorporação de fatores de crescimento.

Com isso, observa-se que a baixa eficiência de incorporação do FC encontrada pode ter ocorrido devido à instabilidade do VEGF durante os diversos processos para a produção das matrizes⁵⁷. Inicialmente, a própria metodologia apresenta uma elevada perda de componentes durante sua realização, o que pode ser comprovado pela observação da formação de fibras fora da placa coletora. Para a obtenção das matrizes de nanofibras na

espessura e tamanhos adequados são necessários em torno de 40 minutos de realização do ES o que acarreta perda considerável de material.

Além disso, a produção das fibras envolve outras etapas que podem contribuir para a perda da bioatividade da proteína, devido a alterações na conformação das estruturas proteicas em contato com a solução polimérica. Nesse sentido, destaca-se o processo de homogeneização mecânica da emulsão, o contato com o solvente orgânico e a alta tensão (18kV) a qual a solução polimérica é submetida durante o processo de fabricação da matriz. Ainda deve-se considerar que os fatores de crescimento solúveis, em geral, são rapidamente degradados e desativados por enzimas, reações químicas ou físicas apresentando uma meia-vida bastante reduzida ⁵⁷. O VEGF, por exemplo, apresenta uma meia-vida de aproximadamente 53 minutos após administração por via endovenosa ⁹⁴.

Algumas estratégias vêm sendo utilizadas com a intenção de minimizar os efeitos descritos acima garantindo a bioatividade e a funcionalidade dos FC. Dentre essas, pode-se destacar a utilização de aditivos hidrofílicos como poli(etileno glicol) (PEG) e o poli (óxido de etileno) (PEO) na solução aquosa contribuindo para a estabilidade das proteínas ⁵⁷. A adição de surfactantes como, por exemplo, o Span-80 também vem sendo utilizada com o intuito de internalizar a fração aquosa contendo a proteína e assim, diminuir o contato com o solvente orgânico ⁸¹, conforme foi realizado no presente estudo. A adição de outras proteínas como a albumina já foram descritas como estabilizadores dos FC durante o processo de ES. No presente estudo, algumas estratégias foram adotadas para minimizar os efeitos do ES sobre o VEGF. Inicialmente, foi adicionada albumina à solução aquosa com o intuito de diminuir a instabilidade do VEGF. Aliado a isso, adicionou-se o surfactante Span-80 na fase oleosa da emulsão, a fim de diminuir a exposição do VEGF ao solvente orgânico HFIP. Porém, como foram observadas, essas estratégias foram pouco eficazes para a incorporação do FC.

Um ponto destacado pelo trabalho de Chew e colaboradores para explicar a baixa incorporação encontrada, o que também poderia explicar o resultado obtido no presente trabalho, seria o fato de que as forças eletrostáticas atuariam de forma diferente em ambas as fases da solução polimérica, ejetando, deste modo, as duas fases com velocidades diferentes, não sendo possível incorporar o FC às nanofibras ⁸⁸.

Para aumentar a biodisponibilidade do fator uma alternativa seria utilizar a técnica de *electrospinnig coaxial*, que por utilizar dois canais separados para as diferentes soluções (polimérica e aquosa) poderia ser superior na manutenção da atividade funcional do FC,

quando comparado com a técnica de emulsão de *electrospinning*⁹⁵. Alguns estudos demonstram mais de 90% de eficiência de incorporação de biomoléculas por matrizes produzidas por *electrospinning coaxial*^{95, 96}. Porém, embora esse método mostre uma eficiência de encapsulamento mais alta, isso não garante que o fator encontre-se ativo dentro das nanofibras.

Por fim cabe destacar, que durante a regeneração tecidual utilizando-se CTMs há ação parácrina das mesmas com liberação de fatores de crescimento, dentre eles o VEGF. Segundo Parekkadan e colaboradores (2010), 10^6 CTMs *in vitro* produzem aproximadamente 100 pg de FC em 24 horas, ou seja, nesse período cada célula libera cerca de 0,1 fg de FC. Logo, estima-se que para obter 10.000 pg de FC a partir de CTMs seriam necessárias 100 milhões de células. No presente estudo, obteve-se uma eficiência de incorporação média nas matrizes PLGA/BSA/VEGF de aproximadamente 3,5%, ou 35.000 pg. Considerando os fatos anteriormente citados, fisiologicamente a quantidade de VEGF presente na matriz polimérica seria equivalente à infusão de 350 milhões de CTMs. Portanto, apesar do baixo valor de eficiência de incorporação, o VEGF incorporado na matriz poderia ser suficiente para atingir um resultado fisiológico⁹⁷.

No presente estudo, embora a eficiência de incorporação tenha sido baixa, as matrizes de PLGA/BSA/VEGF apresentaram-se como bons dispositivos de a liberação controlada do FC. Do total de VEGF incorporado à fibra, houve uma liberação média de 91,37% em um período de 504 horas (21 dias) (n=3). Observou-se um pico de liberação (*burst*) nas primeiras 8 horas, com aumentos crescentes na liberação até 72 horas, quando parece ter havido o estabelecimento de um platô a partir de 72h (3 dias) (Figura 15).

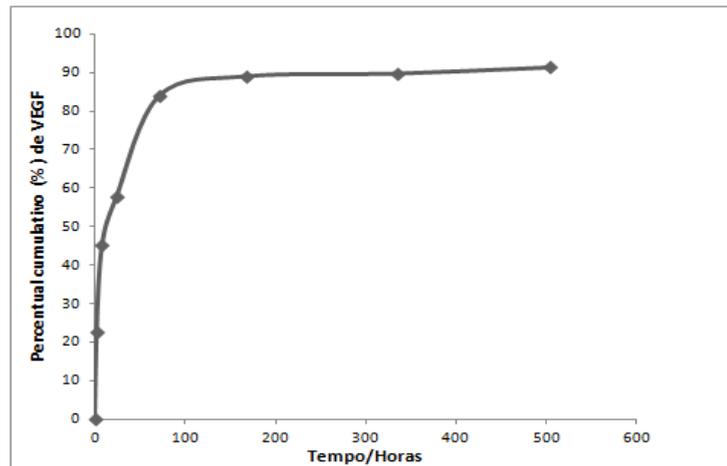


Figura 15. Curva de Liberação de VEGF in vitro a partir de matrizes de PLGA/BSA/VEGF.

O perfil de liberação do VEGF foi semelhante a outros publicados na literatura que descrevem uma típica curva de liberação, na qual se observou um pico de liberação nas primeiras horas, seguido de uma liberação sustentada dos agentes bioativos.^{57, 98}. Diversos trabalhos indicam que o *burst* inicial ocorre dentro de aproximadamente 24h, independentemente do polímero utilizado^{88,99,100,92}.

Esse pico inicial de liberação está associado à proteína que não se difundiu pela nanofibra permanecendo na sua superfície. Após o *burst* inicial, a liberação se dá de forma mais lenta e gradual, por difusão do FC e/ou pela degradação do polímero⁵⁷. O ideal é que o dispositivo de liberação seja capaz de liberar inicialmente parte da dosagem contida na matriz (*burst* inicial) seguido de um modelo mais linear no qual o FC incorporado é liberado de forma mais controlada^{40,57}. Levando em consideração que a meia-vida dos FC no soro é, em geral, bastante pequena, há necessidade de uma quantidade maior de FC logo após a lesão, a fim de se obter uma concentração terapêutica eficaz nesse primeiro momento mais crítico da regeneração, seguido de uma liberação mais controlada com doses sustentadas que serão liberadas à medida que o novo tecido vai se formando. Dessa forma, de acordo com o sistema proposto, apesar a incorporação ter sido baixa, a forma de liberação foi adequada.

6.8 MORFOLOGIA E ADESÃO DAS ADSCs NAS MATRIZES

A adesão celular é o primeiro passo na sequência de eventos da interação células/biomateriais. Essa etapa é crucial para a subsequente proliferação e diferenciação celular³⁵. Segundo Lee e colaboradores, existem três graus de adesividade (1) adesão inicial, na qual as células estão ligadas à MEC, mas não ocorre o espalhamento celular; (2) adesão intermediária, caracterizada pelo espalhamento das células, mas sem adesão focal e (3) adesão final, na qual se observa não só o espalhamento, mas também a adesão focal e emissão de feixes de actina pelas células¹⁰¹.

Os mecanismos de adesão focal não são completamente compreendidos. No entanto, sabe-se que esses focos de adesão iniciam-se quando as integrinas (proteínas de adesão presentes na superfície celular) ligam-se pontualmente à MEC e iniciam uma série de eventos de sinalização que conduzem à contração do citoesqueleto e, posteriormente, emissão de feixes de actina¹⁰².

Considerando os fatos anteriormente citados, as ADSCs cultivadas sobre as diferentes matrizes (PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13%) apresentaram-se bem distribuídas ao longo das mesmas, com proeminentes prolongamentos de actina em todas as direções (Figura 16). Esse achado indica que as células adaptaram-se de forma satisfatória às matrizes, dando início ao processo de adesão celular. Aliado a esse fato, as células semeadas nas matrizes apresentaram morfologia semelhante ao controle (células aderidas diretamente no poço da placa de cultivo celular) dado este que também justifica uma satisfatória adesão celular sobre as matrizes.

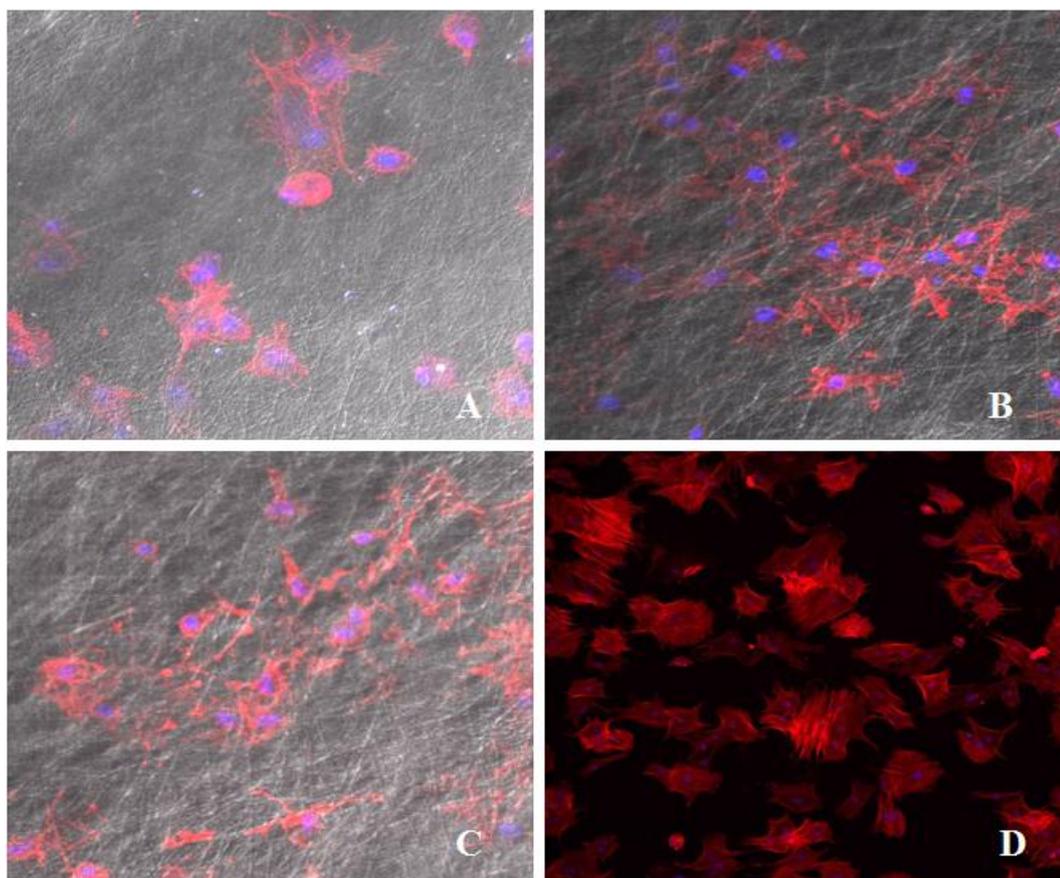


Figura 16. Morfologia das ADSCs avaliada por microscopia confocal: A) matriz PLGA/BSA/VEGF, B) matriz PLGA/BSA, C) matriz PLGA 13% D) células cultivados diretamente no poço da placa de cultivo. Legenda: em vermelho, marcação do citoesqueleto marcado com faloidina conjugada com rodamina; em azul, marcação nuclear com DAPI. Imagens A, B e C aumento de 40x com zoom digital de 1x e imagem D aumento de 10x com zoom digital de 1x.

O ensaio de adesão realizado por coloração com DAPI mostrou que as células apresentaram uma maior tendência de adesão, embora não estatisticamente significativa ($p > 0,05$), nas matrizes PLGA/BSA/VEGF quando comparadas com os outros dois grupos de matrizes (PLGA/BSA e PLGA 13%) e grupo controle (células cultivados diretamente no poço da placa de cultivo) (Figura 17).

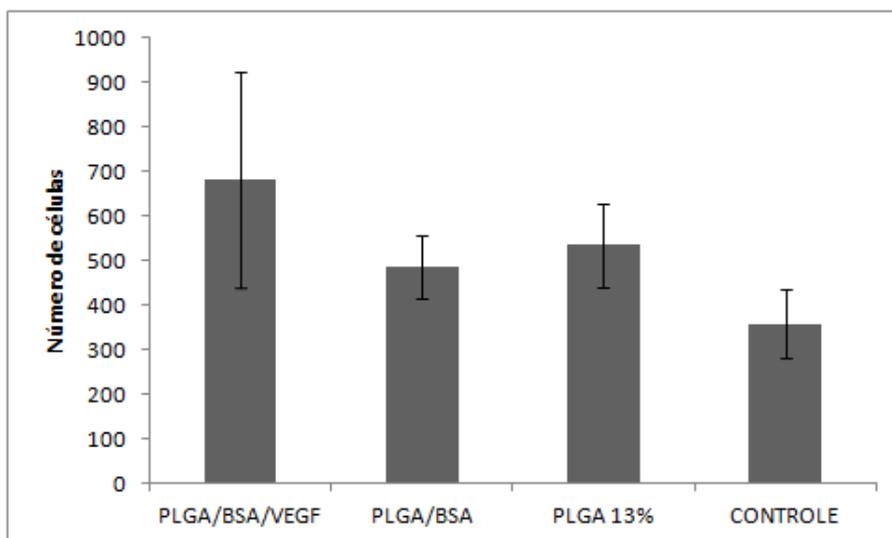


Figura 17. Adesão celular após 6 horas de cultivo *in vitro* para 5 culturas primárias de ADSCs testadas sobre os seguintes grupos de matrizes: PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13% e grupo controle (células cultivadas diretamente no poço da placa de cultivo). Os resultados foram expressos através de média e erro padrão.

Os biomateriais devem promover a adesão celular, a qual é fundamental para a sobrevivência das células. A ausência desse contato célula/matriz pode desencadear mecanismos de morte celular programada ¹⁰³. Nesse sentido, pode-se observar que todos os grupos de matrizes apresentaram uma satisfatória adesão celular, uma vez que, quando comparados com o grupo controle, observam-se altos valores de adesão.

Embora não tenha ocorrido diferença estatística entre os quatro grupos avaliados observa-se uma tendência maior de adesão ao grupo PLGA/BSA/VEGF. Esse comportamento pode estar correlacionado ao fato de que os filmes produzidos a partir da solução polimérica PLGA/BSA/VEGF apresentaram o perfil mais hidrofílico e, portanto, mais adequado à adesão celular. Ainda, os FC desempenham um papel importante no comportamento celular. A adesão, a proliferação e a diferenciação são em grande parte ditadas pela presença de FC solúveis na MEC ³⁵. Nesse sentido, o VEGF presente nas matrizes pode ter aumentado a bioatividade da matriz PLGA/BSA/VEGF e conseqüentemente favorecido a adesão celular nas mesmas.

6.9 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS METABOLICAMENTE ATIVAS NAS MATRIZES DE NANOFIBRAS

Embora o uso de emulsões seja amplamente difundido pela literatura, ainda há questionamentos sobre um possível efeito negativo no crescimento das células cultivadas sobre matrizes que contenham surfactantes, como por exemplo o Span-80⁸¹.

O metabolismo celular para os grupos PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA e PLGA 13% durante os 5 períodos avaliados não apresentou diferença estatística. O grupo controle (células diretamente nos poços) apresentou a maior viabilidade quando comparado com os demais grupos em todos os tempos analisados ($p < 0,001$) (Figura 18).

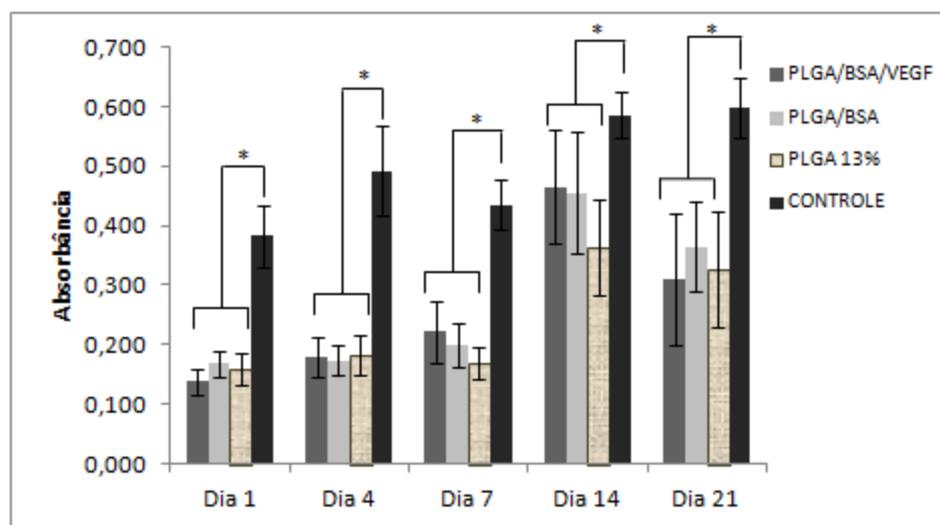


Figura 18. Avaliação das células metabolicamente ativas por MTT testadas sobre os seguintes grupos de matrizes: PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13% e grupo controle (células cultivadas diretamente no poço da placa de cultivo).

Quando os resultados obtidos foram analisados, observou-se que a adição de Span-80, BSA e VEGF às matrizes não interferiu na viabilidade celular, uma vez que quando comparada com as matrizes PLGA 13% (preparadas apenas com o polímero PLGA dissolvido em HFIP) não foi observada diferença no crescimento celular. A maior quantidade de células metabolicamente ativas presente no grupo controle já era esperada uma vez que as células apresentam elevada taxa de proliferação nestas superfícies. A rugosidade e a topografia de placas de cultivo celular, quando comparadas com superfícies 3D, podem ser mais facilmente controladas, diminuindo a variabilidade nas respostas celulares. Nesse sentido as placas de

cultivo podem favorecer o crescimento celular ³⁵. Porém, as mesmas não mimetizam a MEC das células e, portanto não conseguem substituir em complexidade os tecidos *in vivo*.

Analisando a viabilidade em relação ao tempo de cultivo, observou-se que no 14º dia houve o maior número de células metabolicamente ativas ($p < 0,001$) comparada com os demais períodos, com exceção do dia 21 de análise, onde não houve diferença estatística ($p = 1,000$). Esses dados sugerem que após o 14º dia de cultivo houve estagnação na proliferação das células, provavelmente em função da saturação no poço de cultivo, ou seja, as células não apresentavam mais espaço físico para sua multiplicação e, provavelmente, por isso não houve aumento no número celular. Esse resultado foi corroborado com a análise microscópica das culturas na qual se observou saturação do poço devido a grande quantidade de células.

6.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro* são testes preditivos utilizados para uma variedade de biomateriais, desde materiais poliméricos até metais e cerâmicos ¹⁰⁴.

No presente estudo, a citotoxicidade celular foi avaliada através da dosagem da enzima LDH que é encontrada em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo. Sua atividade se dá pela ação catalítica, na qual há a conversão de piruvato à lactato ¹⁰⁵. Trata-se de uma enzima intracelular e sua presença no meio extracelular pode ser indicativa de dano celular. O aumento da concentração dessa enzima é proporcional ao aumento da morte celular ⁶⁸.

No ensaio de citotoxicidade as dosagens de LDH nas diferentes matrizes produzidas encontram-se apresentadas na figura 19. As dosagens de LDH para os três grupos de matrizes foram semelhantes ao grupo controle negativo (células cultivadas diretamente nos poços de cultura) ($p > 0,05$). Ainda, todas as matrizes apresentaram dosagens de LDH muito inferiores ao grupo Triton 1% (controle positivo), que representa a liberação máxima de LDH, ou seja, a morte total. Além disso, o grupo Triton 1% foi o único que apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de dosagem da enzima LDH ao longo dos períodos de análise. Portanto, é possível afirmar que os três tipos de matrizes produzidos não possuem potencial citotóxico para as ADSCs, dados que são corroborados por um achado semelhante em matrizes de PDLLA contendo a microalga *Spirulina*, no qual as matrizes demonstraram um perfil citotóxico semelhante a esse estudo ⁶⁸.

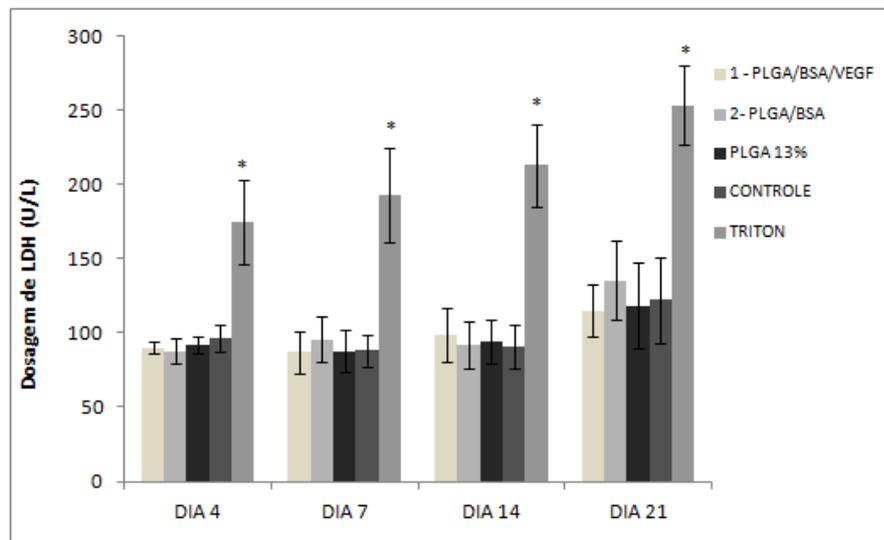


Figura 19. Dosagem de LDH em sobrenadante de culturas primárias de ADSCs testadas sobre os seguintes grupos de matrizes: PLGA/BSA/VEGF, PLGA/BSA, PLGA 13%, grupo controle negativo (células semeadas diretamente no poço da placa de cultivo) e grupo controle positivo (Triton).

Embora não exista um valor de LDH pré-determinado para culturas celulares, os valores médios de LDH encontrados para os três grupos de matrizes nos diferentes dias encontram-se dentro dos valores de referência para esta enzima no soro ou plasma de pacientes adultos saudáveis (80 a 240 U/L).

Em relação ao período analisado, o 21º dia foi o que apresentou maior nível de dosagem da enzima LDH em todos os grupos avaliados ($p < 0,05$), sugerindo uma maior morte celular. Esse achado pode ser correlacionado com a diminuição do metabolismo celular entre o 14º e 21º dia de cultivo celular, observada pelo ensaio MTT. Embora a dosagem no 21º dia tenha sido maior do que nos outros dias avaliados, ainda assim os valores encontram-se dentro dos valores de referência para soro e plasma humano. Desse modo, observa-se que as matrizes produzidas a partir de emulsão mostraram-se atóxicas para as células-tronco, demonstrando a biocompatibilidade dos biomateriais produzidos. Com isso, essas matrizes podem ser descritas como uma boa estratégia para uso combinado com células-tronco.

7. CONCLUSÃO

As células utilizadas no presente estudo foram isoladas e cultivadas com sucesso, observando-se a sua caracterização como células-tronco mesenquimais. As matrizes desenvolvidas a partir de emulsão apresentaram fibras lisas, bem distribuídas, na escala nanométrica com uma estrutura porosa semelhante à MEC das células. Desse modo, mostraram características apropriadas para a cultivo celular quando aplicados na ET.

Em relação ao ângulo de contato observou-se um perfil hidrofóbico para todos os grupos de matrizes, possivelmente devido a grande quantidade de poros das matrizes produzidas por ES. Ao analisar o ângulo de contato dos filmes poliméricos observou-se que os filmes que continham VEGF apresentaram o menor ângulo de contato, ou seja, mostraram-se mais hidrofílicos.

Essas matrizes mostraram-se seguras para uso clínico uma vez que os valores de solvente residual ficaram dentro dos limites de exposição temporária. As matrizes obtidas por emulsão apresentaram uma maior resistência à tração quando comparadas às matrizes controle, esse achado possivelmente foi decorrente da adição de surfactante Span-80 à emulsão. Além disso, as matrizes apresentaram uma rápida degradação, característica ideal para dispositivos de liberação quando aplicados na ET.

Em relação às propriedades biológicas, os filmes contendo VEGF apresentaram uma maior hidrofiliabilidade o que pode ter conduzido a uma melhor taxa de adesão das ADSCs nas matrizes PLGA/BSA/VEGF quando comparada somente ao biomaterial PLGA. Um aspecto relevante foi o fato das matrizes produzidas por ES de emulsão, com ou sem o VEGF mostrarem-se atóxicas para as células-tronco. Em relação a viabilidade celular por MTT, as matrizes PLGA/BSA/VEGF foram semelhantes a matriz PLGA 13%, observando-se que a emulsão não afetou as células.

As matrizes contendo VEGF apresentaram uma liberação sustentada do FC, porém não há como afirmar que a mesma comportou-se como um eficaz dispositivo de liberação, uma vez que a eficiência média de incorporação foi de apenas 3,47%. Ainda cabe destacar que muitos estudos não mostram a eficiência de incorporação dos agentes bioativos, demonstrando apenas o perfil de liberação controlado dos mesmos. A falta de informações referente à eficiência de incorporação, ou seja, o quanto de fato incorporou-se do agente bioativo às matrizes pode prejudicar estudos futuros, que tomam como base essas referências.

Apesar da eficiência de incorporação de FC pela técnica de *electrospinning* de emulsão não ter apresentado uma alta eficiência, espera-se que a quantidade de VEGF incorporada às matrizes possa de fato contribuir para a regeneração tecidual. Desse modo, ensaios *in vivo* devem determinar se quantidades mesmo que pequenas possam de fato contribuir para a regeneração tecidual, uma vez que essas moléculas atuam em concentrações muito reduzidas no organismo.

Como prospectiva desse trabalho, estudos em modelos animais serão realizados para confirmar a hipótese de que matrizes contendo VEGF possam de fato contribuir para um aumento da vascularização e conseqüentemente uma melhora na regeneração tecidual. Além disso, outras estratégias como o encapsulamento do VEGF através da técnica de *electrospinning coaxial* também serão realizadas. Portanto, pode-se concluir que o *electrospinning* de emulsão não se mostrou como uma técnica eficaz para incorporação de fator de crescimento. Porém, essa alternativa apresentou características adequadas para o cultivo de células-tronco, mantendo a liberação controlada do fator de crescimento e demonstrando uma boa biocompatibilidade do biomaterial desenvolvido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hench LL. *Biomaterials* 1998;19:1419-23.
2. SANTOS ARW, M. L. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2007;17:308-17.
3. Langer R, Vacanti JP. *Science* 1993;260:920-6.
4. Cenni E, Perut F, Baldini N. *Acta Pharmacol Sin* 2011;32:21-30.
5. Davies NH, Schmidt C, Bezuidenhout D, Zilla P. *Tissue Eng Part A* 2012;18:26-34.
6. Lokmic Z, Mitchell GM. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14:87-103.
7. Hlushchuk RM, A.N.; Djonov, V. *The International Journal Developmental Biology* 2011;55:563-7.
8. Tomanek RJ, Schatteman GC. *Anat Rec* 2000;261:126-35.
9. Rivron NC, Liu JJ, Rouwkema J, de Boer J, van Blitterswijk CA. *Eur Cell Mater* 2008;15:27-40.
10. Singh S, Wu BM, Dunn JC. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1819-30.
11. Fuchs S, Ghanaati S, Orth C, et al. *Biomaterials* 2009;30:526-34.
12. Nardi NB, Meirelles LdS. *HEP* 2006;Sect. 249-82.
13. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:793823.
14. Vindigni V, Michelotto L, Lancerotto L, et al. *Neurol Res* 2009.
15. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
16. Mizuno H, Hyakusoku H. *J Nihon Med Sch* 2003;70:300-6.
17. Wang S, Qu X, Zhao RC. *J Hematol Oncol* 2012;5:19.
18. Strioga M. *Stem cells and development* 2011.
19. Ansboro SG, U.; Barry, F.; Murphy, M. *European Cells and Materials* 2012;23:310-319.
20. Mao F, Xu WR, Qian H, et al. *Inflamm Res* 2010;59:219-25.
21. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, et al. *Exp Hematol* 2008;36:1014-21.

22. Meyerrose TE, De Ugarte DA, Hofling AA, et al. *Stem Cells* 2007;25:220-7.
23. Chevallier N. *Bio materials* 2009;43:1-9.
24. Barry FM, J. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36:568-84.
25. Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. *Front Immunol* 2012;3:126.
26. Dominici M. *Cytherapy* 2006;8:315-7.
27. Fossett E, Khan WS. *Stem Cells Int* 2012;2012:465259.
28. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, et al. *Exp Cell Res* 2005;308:283-90.
29. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. *Biochimie* 2005;87:125-8.
30. Qayyum AA, Haack-Sorensen M, Mathiasen AB, Jorgensen E, Ekblond A, Kastrup J. *Regen Med* 2012;7:421-8.
31. Djouad F, Bony C, Canovas F, et al. *Cloning Stem Cells* 2009;11:407-16.
32. da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. *Tissue Eng Part A* 2009;15:221-9.
33. Yarak S, Okamoto OK. *An Bras Dermatol* 2010;85:647-56.
34. Davis ME, Hsieh PC, Grodzinsky AJ, Lee RT. *Circ Res* 2005;97:8-15.
35. Zhang N, Kohn DH. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2012;96:63-81.
36. Patel MN, Atala A. *ScientificWorldJournal* 2011;11:2567-78.
37. Barbanti SHZ, C.A.C. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 2005;15:13-21.
38. Boudriot UG, B.; Dersch, R.; Greiner, A.; Wendorff, J-H. *Macromol Symp* 2005;225:09-16.
39. Venugopal JR, Prabhakaran MP, Mukherjee S, Ravichandran R, Dan K, Ramakrishna S. *J R Soc Interface* 2012;9:1-19.
40. Quaglia F. *Bioinspired tissue engineering: International Journal of Pharmaceutics* 2008;364:281-97.
41. Oréface RLP, M.M.; Mansur, S.H. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. 2006.
42. Ziabari MVH, A.k. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2009;26:53-62.

43. R Dinarvand RS, N.; Manoochehri, S.; Rouhani, H.; Atyabi, F. *International Journal of Nanomedicine* 2011;6:877–95.
44. Lakshmi SC, N.; Laurencin, T. *Progress in Polymers Science* 2007;32:762–98.
45. Fredenberga SW, M.; Reslowc, M.; Axelssona, M. *International Journal of Pharmaceutics* 2010;415:34-52.
46. Bhardwaj N, Kundu SC. *Biotechnol Adv* 2010;28:325-47.
47. Hong JK, Madihally SV. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17:125-42.
48. Bendrea AD, Cianga L, Cianga I. *J Biomater Appl* 2011;26:3-84.
49. Teng YD, Lavik EB, Qu X, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3024-9.
50. Dersh RG, A; Wendorff, J.H. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 2004.
51. Lim SH, Mao HQ. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:1084-96.
52. Greiner A, Wendorff JH. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007;46:5670-703.
53. Shin SHP, O.; Castano, O.; Planell, J.A.; Kim, H.W. *Journal of Tissue Engineering* 2012;3:1-11.
54. Badylak SF. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:377-83.
55. Chan G, Mooney DJ. *Trends Biotechnol* 2008;26:382-92.
56. Lu H, Hoshiba T, Kawazoe N, Koda I, Song M, Chen G. *Biomaterials* 2011;32:9658-66.
57. Ji W, Sun Y, Yang F, et al. *Pharm Res* 2011;28:1259-72.
58. Lu Y, Jiang H, Tu K, Wang L. *Acta Biomater* 2009;5:1562-74.
59. Tayalia P, Mooney DJ. *Adv Mater* 2009;21:3269-85.
60. Salvolini E, Orciani M, Lucarini G, Vignini A, Tranquilli AL, Di Primio R. *Eur J Clin Invest* 2011;41:23-9.
61. Schmidt TC, P. *Hematology* 2011:1-8.
62. Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. *PLoS Comput Biol* 2009;5:e1000622.
63. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. *Nat Biotechnol* 2001;19:1029-34.

64. Sahoo SA, L.T.; Goh, J.TH.; Toh, S.L. Journal of Biomedical Materials Research 2010;93A:1539-50.
65. Mizuno H. J Nihon Med Sch 2009;76:56-66.
66. Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. J Biomater Appl 2011;26:383-417.
67. Ye Z, Mahato RI. Nanomedicine (Lond) 2008;3:5-8.
68. Steffens DL, M. ; Rosa, A.; Scher, C.; Crestani, T.; de Moraes, M. G.; Costa, J. A. V.; Pranke, P. . A New Biomaterial of Nanofibers whit the Microalga Spirulina as Scaffolds to Cultive whit Stem Cells for Use in Tissue Engineering. "no prelo" 2012.
69. Dutta RC, Dutta AK. Biotechnol Adv 2010;28:764-9.
70. Lannutti JR, D.; Ma, T.; Tomasko, D.; Faron, D. Materials Science and Engineering 2007;27:504–9.
71. Dalton PD, Lleixa Calvet J, Mourran A, Klee D, Moller M. Biotechnol J 2006;1:998-1006.
72. EMISIG. Protective Action Criteria (PAC) Rev 24B based on applicable AEGLs, ERPGs, or TEELs (Chemicals listed By CASRN). (09/2010).
73. Washington USDoE. Doe Handbook Temporary Emergency Exposure Limits for Chemicals: Methods and Praticce. 2008.
74. EMISIG. Protective Action Criteria (PAC) Rev 26 based on applicable 60-minute AEGLs, ERPGs, or TEELs. The chemicals are listed in alphabetical order. . (09/2010).
75. Nam JH, Y.; Agarwal, S.; Lannutti, J. Journal of Applied Polymer Science 2007:1547-54.
76. Kharasch ED. Anesth Analg 1995;81:S27-38.
77. Navarro MA, C.; Charles-Harris, M., Ginebra, M.P.; Engel, E.; Planell, J.A. Advances in Polymer Science 2006;200:209–31.
78. Vanin MS, C.C.; Torriani, L.I.; Privelic, T.; Duek, E.A.R. Polímeros: Ciência e Tecnologia 2004;14:187-93.
79. Mendonça RJC, J. Aspectos celulares da cicatrização. Anais Brasileiros de Dermatologia 2009;84:257-62.
80. Arima Y, Iwata H. Biomaterials 2007;28:3074-82.
81. Li XS, Y.; He, C.; Wang, H.; Fong, H.; Mo, X. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2008:878-85.

82. Li X, Su Y, Liu S, Tan L, Mo X, Ramakrishna S. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;75:418-24.
83. Lin J, Cai Y, Wang X, Ding B, Yu J, Wang M. *Nanoscale* 2011;3:1258-62.
84. Miwa MN, A.; Fujishima, A.; Hashimoto, K.; Watanabe, T. *Langmuir* 2000;16:5754-60.
85. Yang X, Zhao K, Chen GQ. *Biomaterials* 2002;23:1391-7.
86. Kwok SCW, J.; Chu. K. *Diamond & Related Materials* 2005;14:78– 85.
87. Anselme K. *Biomaterials* 2000;21:667-81.
88. Chew SY, Wen J, Yim EK, Leong KW. *Biomacromolecules* 2005;6:2017-24.
89. Li-li WX-r, L.; Hua, L.; Xiao-yan, Y. *Chem Res Chinese Universities* 2011;27:708-11.
90. Yana SX, L.; Shuipinga, L.; Xiumeia, M.; Ramakrishna, S. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009;73:376–81.
91. Qi H, Hu P, Xu J, Wang A. *Biomacromolecules* 2006;7:2327-30.
92. Zeng J, Aigner A, Czubayko F, Kissel T, Wendorff JH, Greiner A. *Biomacromolecules* 2005;6:1484-8.
93. Liao Y, Zhang L, Gao Y, Zhu ZT, Fong H. *Polymer (Guildf)* 2008;49:5294-9.
94. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, et al. *Circulation* 1996;94:1074-82.
95. Ji W, Yang F, van den Beucken JJ, et al. *Acta Biomater* 2010;6:4199-207.
96. Liao IC, Chew SY, Leong KW. *Nanomedicine (Lond)* 2006;1:465-71.
97. Parekkadan B, Milwid JM. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:87-117.
98. Nie H, Soh BW, Fu YC, Wang CH. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:223-34.
99. Yan LH, J. Kangjie, Z. *J Mater Sci: Mater Med* 2008;19:827-32.
100. Fu YC, Nie H, Ho ML, Wang CK, Wang CH. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:996-1006.
101. Lee JW, Kim YH, Park KD, Jee KS, Shin JW, Hahn SB. *Biomaterials* 2004;25:1901-9.
102. Sarkar S. *Curr Biol* 1999;9:R428.

103. Streuli CH. J Cell Sci 2009;122:171-7.
104. Coleman D. IN VITRO BLOOD-MATERIALS INTERACTIONS: A MULTI-TEST APPROACH. 1996:1-186.
105. Goldberg E, Eddy EM, Duan C, Odet F. J Androl 2010;31:86-94.

ANEXO I

4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Cerca de 100 mL de tecido adiposo foram obtidos de pacientes submetidos à lipoaspiração no Hospital Santa Clara do Complexo Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre pelo número de protocolo 3500-11, de 14 de março de 2011. O produto do lipoaspirado foi transportado até o laboratório sobre refrigeração (2°C a 8°C), sendo processado até 24h após a coleta.

O lipoaspirado foi lavado extensivamente com tampão PBS 1x até a retirada total de sangue. O mesmo foi submetido a tratamento enzimático com colagenase Tipo I 0,075% a 37°C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Após, a colagenase foi neutralizada com o meio Dulbecc's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). A suspensão obtida foi centrifugada a 800g por 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão PBS 1x por 10 minutos a 400g. O *pellet* celular foi ressuspendido em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de gentamicina e plaqueado em garrafas de cultura de 25 cm² mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após, atingida a confluência de aproximadamente 90%, as culturas foram dissociadas utilizando 0,25% Tripsina/EDTA. As células foram expandidas até a quinta passagem (P5) quando foram realizados os ensaios biológicos.

ANEXO II

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ADSCs COMO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (ANEXO II)

4.2.1 Análise morfológica das culturas celulares

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

4.2.2 Perfil Imunofenotípico

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

4.2.3 Diferenciação celular *in vitro*

Na quinta passagem celular (P5), as células foram avaliadas quanto à sua capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, através de meios indutores específicos descritos por Meirelles e colaboradores (2006). Os meios foram renovados a cada

3 dias e utilizou-se células não submetidas à diferenciação como controle negativo de diferenciação. As mesmas eram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de gentamicina.

- **Diferenciação adipogênica**

As células foram cultivadas por 2 semanas em meio IMDM contendo 20% de plasma humano, dexametasona (10^{-7} M), insulina (2,5 $\mu\text{g/ml}$), indometacina (5 μM), rosiglitazona (5 μM) e heparina sódica (10 unidades/mL). Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora e lavadas 3 vezes com água deionizada. Os adipócitos foram observados ao microscópio após coloração com o corante Oil Red O.

- **Diferenciação condrogênica**

Para a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em meio de diferenciação durante 30 dias. O meio indutor utilizado foi DMEM suplementado com 15 mM Heps, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de insulina, 10 ng/mL TGF- β 1 e 50 nM da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavadas com água deionizada. A condrogênese foi demonstrada pela coloração com *Alcian Blue*.

- **Diferenciação osteogênica**

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