

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITO A BASE
DE POLICAPROLACTONA E NANOTUBO DE
CARBONO PARA A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE
CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DO TECIDO ADIPOSEO**

EMERSON ALBERTO DA FONSECA

**Belo Horizonte
2014**

EMERSON ALBERTO DA FONSECA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITO A BASE
DE POLICAPROLACTONA E NANOTUBO DE
CARBONO PARA A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE
CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DO TECIDO ADIPOSEO**

**ORIENTADO: EMERSON ALBERTO DA FONSECA
ORIENTADOR: RODRIGO RIBEIRO RESENDE**

**Belo Horizonte
2014**

"O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma ciência rigorosa não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a alcançar um fim de modo pertinente. Nesse sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido homem de ciência." (Nietzsche, 1878)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Resende pela oportunidade, e confiança depositada em mim.

Aos colegas de trabalho Bruna Raphaela, Anderson Kennedy e Ricardo Cambraia pela camaradagem e ajuda durante todo esse período.

Ao Professor Luiz Orlando Ladeira pela colaboração no desenvolver deste projeto.

Aos colaboradores Agda Linero, Érick Ávila, Anderson Peres, Tadeu e Dr^a. Samyra Nassif Lacerda.

Ao Professor. Dr Miguel Ortega e à Prof^a. Dr^a Silvia Guatimosim por gentilmente disponibilizarem a infra-estrutura de seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Aos demais integrantes do laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas.

À minha família que não sabe o que eu faço mas acredita nas minhas escolhas.

À Mariana Megale pela paciência e pela força que me deu durante os 3 anos de pesquisa.

Aos meus amigos e confidentes Douglas Vitor, Daniel Ferreira e Vânia Goulart.

À Darwin, Mendel, Einstein.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMO	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR.....	16
Células-troncos Hematopoiéticas.....	17
Células-tronco e Medula Óssea.....	18
Células-tronco derivadas de tecido adiposo.....	19
A tríade Substrato - Topografia - Células-tronco.....	20
BIOMATERIAIS E ENGENHARIA TECIDUAL.....	22
NANOTUBOS DE CARBONO E NEURODIFERENCIAÇÃO.....	27
OBJETIVOS.....	30
Objetivo Geral	31
Objetivos específicos	31
MATERIAIS E MÉTODOS	32
PRODUÇÃO DA NANOFIBRA DE PCL.....	33
PRODUÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO.....	33
FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO.....	33
PRODUÇÃO DO NANOCOMPÓSITO.....	34
MANTA DE PCL E NANOCOMPÓSITO: CARACTERIZAÇÕES.....	35
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
Termogravimetria (TG).....	35
Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	36

Espectroscopia Raman	36
Ensaio de Eletroresistividade.....	38
ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO (hASCs)	41
Processamento do Lipoaspirado e Isolamento de hASCs	41
TESTE DE MULTIPOTENCIALIDADE.....	42
Diferenciação de hASC em adipócito, condrócito e osteócito.....	42
Imunofenotipagem - Caracterização das hASC por Citometria de Fluxo.....	43
CULTIVO DE hASC EM NANOCOMPÓSITO DE NTC.....	45
Teste de Biocompatibilidade	45
Avaliação Morfológica por MEV	45
Avaliação da Expressão de marcador neuronal e glial por Imunofluorescência	46
Registro de eletrofisiologia para verificação de fenótipo neuronal.....	47
RESULTADOS	49
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS.....	50
OBTENÇÃO DAS hASCs	58
TESTE DE MULTIPOTENCIALIDADE.....	59
IMUNOFENOTIPAGEM	60
TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	61
Avaliação Morfológica por MEV das hASC sobre PCL e NC.....	62
AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO DAS hASC.....	64
IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	64
ENSAIO DE ELETROFISIOLOGIA	65
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	76
PERSPECTIVAS FUTURAS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da capacidade de diferenciação das células-tronco	17
Figura 2 - Representação esquemática da síntese de policaprolactona	25
Figura 3 - Representação esquemática dos Nanotubos de carbono	28
Figura 4 - Representação esquemática da máquina de <i>Eletrospinning</i>	33
Figura 5 – Representação de modo RBM e TM de nanotubos	37
Figura 6 - Representação esquemática do aparato feito para medição da eletroresistividade dos biomateriais	38
Figura 7 - Produção do Nanocompósito.....	50
Figura 8 – Microscopia Eletrônica dos biomateriais	51
Figura 9 – Gráfico de Termogravimetria.....	52
Figura 10 – Gráfico de FTIR.....	53
Figura 11 – Gráfico Raman	55
Figura 12 – Figura dos biomateriais montados no aparato para medição de eletroresistividade	57
Figura 13 – Cultura de hASCs.....	58
Figura 14 – Teste de Multipotencialidade das hASCs.....	59
Figuro 15 - Imunofenotipagem	60
Figura 16 – Tese de Biocompatibilidade	62
Figura 17 – Microscopia Eletrônica de hASCs cultivadas sobre os biomateriais.....	63
Figura 18 - Imunofluorescência das hASCs cultivadas sobre os biomateriais.....	64
Figura 19 – Gráfico do ensaio de eletrofisiologia.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para a Imunofenotipagem	44
Tabela 2 – Anticorpos utilizados para a Imunofluorescência	47
Tabela 3 – Resistividade Elétrica	57
Tabela 4 – Caracterização de Células-tronco por Citometria de Fluxo	60

LISTA DE ABREVIATURAS

3D = Três dimensões;

ASCs = *Adipose-derived stem cells* (células-tronco derivadas de tecido adiposo);

ATR = *attenuated total reflection* (reflectância total atenuada);

hASCs = *human Adipose-derived stem cells* (células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo)

BM-MSC = *Bone Marrow Stem Cell* (Células-tronco mesenquimais da Medula Óssea);

BSA = *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino);

CD = *Cluster of differentiation* (grupos de diferenciação);

CsT = Células-Tronco;

Col = Colágeno;

CVD = *Chemical Vapor Deposition* (Deposição Química a Vapor);

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado por Dulbecco);

EDTA = *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilendiaminotetracético);

eV = elétron Volt;

FAs = *focal adhesion* (adesão focal);

FBS = *Fetal bovine serum* (Soro fetal bovino);

FTIR = *fourier transform infrared spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier);

GFAP = *Glial Fibrillary Acidic Protein* (Proteína Ácida Fibrilar Glial);

bFGF = *basic Fibroblast growth factor* (fator básico de crescimento fibroblástico);

hASC = *Human adipose stem cell* (células-tronco derivadas de tecido adiposo humano);

hMSCs = *Mesenchymal Stem Cells* (células-tronco mesenquimais humanas);

HSC = *Hematopoietic Stem Cell* (Células-tronco Hematopoéticas);

GΩ = Gigaohms;

LEPCom = Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos;

MAP2 = *Microtubule-Associated Protein-2* (Proteína Associada ao Microtubulo-2);

MEC = *extracellular matrix - ECM* (Matriz Extracelular);

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

mW = MiliWatts

mΩ = Miliohms;

mol/L = Mol por Litro;

mmol/L = Milimol por Litro

MSC = *Mesenchymal Stem Cell* (Células-tronco mesenquimais);

ms = Milisegundos;

MWCNTs = *multi-wall carbon nanotubes* (nanotubos multicamadas ou de paredes múltiplas);

mV = Milivolts;

NC = Nanocompósito

nm = nanômetros;

nA = Nanoampere;

NTCs = *Carbon Nanotubes* – CNTs (nanotubos de carbono)

KV = Kilo Volts;

pA = picoampere;

PET = tereftalato de polietileno;

PBS = *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato);

PCL = *poly(caprolactone)*, (poli(caprolactona));

PLA = *poly(lactic acid)*, (ácido poliglicólico);

PLGA = *poly (lactic-co-glycolic acid)* (poli (ácido láctico-co-glicólico);

PLCL = *poly(L-lactic acid)-co-poly-(3-caprolactone)* (poli(L-ácido Láctico)-co-poli-(3-caprolactona));

PU = Poliuretano;

RGD = arginina–glicina–aspartato;

SC = *Stem Cell*;

STRO-1 = *Stromal precursor antigen-1* (Precursor estromal de antígeno-1);

SWCNTs = *single-wall carbon nanotubes* (nanotubos de paredes simples);

SVF - *Fraction of the Vascular Stroma* (fração de estroma vascular)

TG = Termogravimetria;

TuJ-1 = Beta-Tubulina classe III;

UV = Ultravioleta;

RESUMO

Os biomateriais são materiais biodegradáveis usados como implantes induzindo a regeneração do tecido lesionado pela promoção do aumento da proliferação, diferenciação e atividades celulares. Com o incremento da nanotecnologia os biomateriais puderam ser melhorados resultando em materiais mais versáteis para a terapêutica. Os nanotubos de carbono são um dos nanomateriais que aparecem nesse cenário e demonstram excelente biocompatibilidade além de promoção da espontânea neuro-diferenciação de progenitores neurais. Com o emprego das células-tronco adultas para terapia celular é possível a complexação dos biomateriais implantáveis (scaffolds) como abordagem mais eficaz na engenharia tecidual. Nesse trabalho, nós desenvolvemos um nanocompósito empregando um biomaterial de uso clínico/comercial, policaprolactona, e nanotubos de carbono de paredes múltiplas para cultivo e neurodiferenciação de células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo. As propriedades intrínsecas dos nanotubos, como dimensões, eletrocondutividade e o substrato nanométrico formado por ele é comprovadamente capaz de estimular a neuro-diferenciação de células-tronco. Nossos resultados mostraram que o nanocompósito desenvolvido foi capaz de sustentar o crescimento e proliferação celular mostrando-se biocompatível, eletrocondutor e foi capaz de sustentar o início do processo de diferenciação neuronal demonstrado pela expressão da proteína GFAP.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono; Biomateriais; Células-tronco adultas; Diferenciação neuronal.

ABSTRACT

Biomaterials are biodegradable materials used in implants which are able to promote regeneration of injured tissue by stimulating proliferation, differentiation and cell activity. With the development of nanotechnology, the biomaterials have been improved resulting in more versatile materials for therapy. Carbon nanotubes are one of the nanomaterials that appear in this scenario and demonstrate excellent biocompatibility besides promoting spontaneous neuronal differentiation of neural progenitors. With the use of adult stem cells in cell therapy allows the complexation of implantable biomaterials as scaffolds. This is the most effective approach in tissue engineering. In this work, we developed a nanocomposite biomaterial using polycaprolactone and carbon nanotubes multi-walled to support the growing and differentiation of stem cells derived from adipose tissue. The intrinsic properties of the nanotubes, such as dimensions, electroconductivity and substrate formed show that nanotubes are able to stimulate stem cell neuro differentiation. Our results showed that the nanocomposite developed was able to support cell growth and proliferation proving to be biocompatible, electro-conductive and efficient in starting the process of neuronal differentiation that was demonstrated by expression of GFAP protein.

Keywords: Carbon nanotubes; Biomaterials; Adult stem cells; Neuronal differentiation.

INTRODUÇÃO

CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

Células-Tronco (CsT) (do inglês, *Stem Cell*, SC) é, talvez, a linha de pesquisa atual mais intensa que tem trazido à luz do conhecimento o desenvolvimento celular bem como perspectivas de tratamento para doenças e problemas de saúde diversos. Em um trabalho que data de 1961, Till J.E. trouxe-nos os primeiros conceitos de CsT, que são: capacidade de auto-renovação (*self-renewal*), auto-geração, e que seja multipotente, a saber, capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares (Till and Mc 1961).

Desde o isolamento da primeira célula-tronco derivada de embrião de camundongo em 1981 (Evans and Kaufman 1981) a pesquisa com as CsT tem sofrido considerável expansão. O primeiro trabalho com CsT derivada de embrião humano data de 1998 (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998).

Seguido os conflitos éticos que o tema tocava, a pesquisa com CsT ganhou outra dimensão após a descoberta das CsT adultas (Pelacho, Mazo et al. 2011). Em 1999, Mark F. Pittenger e colaboradores demonstraram o potencial de células-tronco mesenquimais adultas humanas derivadas da medula óssea (do inglês, *Bone Marrow Mesenchymal Stem cell*, BM-MSC) de se diferenciarem em linhagens diversas, *in vitro*, constatando o potencial multipotente das CsT adultas (Pittenger, Mackay et al. 1999).

As células-tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) adultas são encontradas virtualmente em todos os tecidos (Tuan, Boland et al. 2003) e têm um importante papel na manutenção da homeostasia em caso de injúria ou doença e na renovação do repertório celular.

Não por menos, as MSCs são hoje a promessa para a medicina regenerativa, pela sua facilidade de cultivo *in vitro*, alta taxa de proliferação e sua versatilidade em se diferenciar em vários tipos celulares, desde os mais bem estabelecidos como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Pittenger, Mackay et al. 1999) até hepatócitos (Lee, Kuo et al. 2004), neurônios (Black and Woodbury 2001, Tropel, Platet et al. 2006, Resende, Adhikarid et al. 2010, Resende, da Costa et al. 2010) e glia (Tohill, Mantovani et al. 2004) (**Figura 1**).

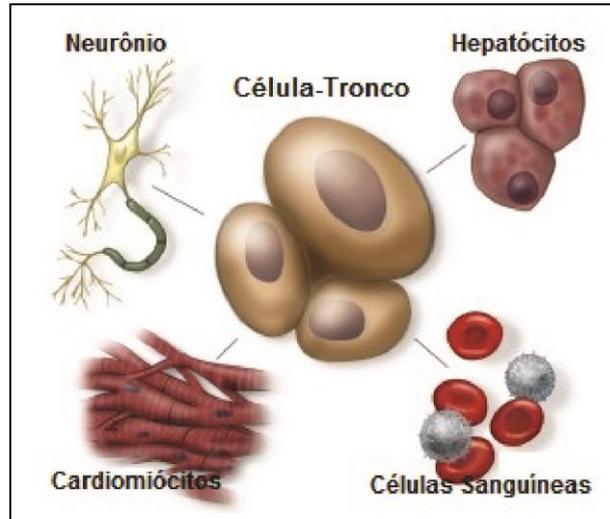


FIGURA 1. Desenho esquemático das potencialidades de diferenciação das células-tronco. Adaptado do California Surgical Institute.

A terapia com *MSCs* é uma abordagem que tem se mostrado promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas, reparação tecidual e alguns tipos de cânceres (Clarke, Dick et al. 2006, Sousa, Parreira et al. 2014).

DAS FONTES DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

Células-tronco Hematopoéticas (*Hematopoietic Stem Cells, HSCs*)

Há mais de 50 anos sabe-se que a medula óssea é fonte de Células-Tronco Hematopoéticas (*HSCs*) responsáveis pela geração e manutenção de células sanguíneas (Becker, Mc et al. 1963). Till, J.E. e McCullough em 1961 depletaram o sistema hematopoético de camundongos após submetê-los a altas doses de irradiação. Após o que, os animais receberam células da medula óssea e tiveram seu sistema hematopoético reconstituído, demonstrando dessa forma que as células presentes na medula óssea são responsáveis pela produção de células sanguíneas (Till and Mc 1961). As *HSCs* encontram-se no sangue circulante e na medula óssea e apresentam altas taxas de renovação. São produzidas bilhões de novas células sanguíneas por dia (Ogawa 1993). Acredita-se que uma em cada 10.000 a 25.000 células da medula óssea seja célula-tronco, enquanto no sangue, esse número muda

de uma para cada 100.000 (Department of Health and Human Services. June 2001). Pesquisas mostram que as *HSCs* residem na região endóstea (Calvi, Adams et al. 2003, Zhang, Niu et al. 2003) e próximo aos vasos sanguíneos na medula (Kiel, Yilmaz et al. 2005). Essa região é formada por osteoblastos (Xie, Yin et al. 2009), células reticulares (Sugiyama, Kohara et al. 2006), células-tronco expressando marcador de células nervosas (Mendez-Ferrer, Michurina et al. 2010), células de *Schwann* (Yamazaki, Ema et al. 2011), e células perivasculares (Ding, Saunders et al. 2012).

Células-Tronco da Medula Óssea

A medula óssea é fonte não somente de *HSCs*, mas também das chamadas *mesenchymal stem cell* ou *Bone Marrow Stem Cell (BM-MSC)* ou *Bone marrow stromal cells (BMSCs)* (Friedens.Aj, Piatetzki et al. 1966, Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970, Owen 1988, Dominici, Le Blanc et al. 2006). São nomes diferentes que denominam o mesmo tipo celular. Os primeiros relatos de *BM-MSCs* foram de Friedenstein e colaboradores em 1966, isoladas a partir da medula óssea de camundongos (Friedens.Aj, Piatetzki et al. 1966), onde se observou então a forma fibroblástica das *BM-MSCs* (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976). O trabalho de 1974 foi definitivo para a constatação das *BM-MSCs* denominadas de “Células fibroblastoides” (*fibroblast-like cells*) pela semelhança com estas células (Friedenstein, Chailakhyan et al. 1974, Dennis, Merriam et al. 1999). As células-tronco mesenquimais humanas (*hMSCs*) foram isoladas por Pittenger e colegas em 1999, a partir da crista ilíaca da pelve (Pittenger, Mackay et al. 1999). Murphy et al., em 2002, e D’Ippolito et al., também no mesmo ano, isolaram *hMSCs* da tíbia e da região femoral, respectivamente (Digirolamo, Stokes et al. 1999, D’Ippolito, Schiller et al. 2002, Murphy, Dixon et al. 2002). Assim como as *HSCs* que corresponde a uma pequena fração de células aderentes, as *BM-MSCs*, cultivadas *in vitro*, são prioritariamente aderentes e, por definição, capazes de se diferenciar em osteoblasto, condrócito e adipócito (Phinney 2002).

Entretanto, diversos estudos têm mostrado a capacidade das *BM-MSCs* de se diferenciarem não somente nos tipos celulares de origem mesodérmica, mas também do folheto germinativo ectodérmico (Black and Woodbury 2001,

Resende, Adhikarid et al. 2010, Resende, da Costa et al. 2010). Pesquisadores já obtiveram células da glia, células musculares e hepáticas a partir de *BM-MSCs* (Azizi, Stokes et al. 1998, Ferrari, Cusella-De Angelis et al. 1998, Petersen, Bowen et al. 1999).

Células-tronco derivadas de tecido adiposo (*Adipose-derived Stem Cells, ASCs*)

O tecido adiposo é uma fonte abundante e acessível de células-tronco. Enquanto na medula óssea a proporção é de, aproximadamente, 1 célula-tronco para cada 25.000 (Department of Health and Human Services. June 2001), no tecido adiposo as células-tronco correspondem a aproximadamente 2% do total de células residentes (Strem, Hicok et al. 2005).

A *International Fat Applied Technology Society* adotou o termo "células-tronco derivadas de tecido adiposo" (*ASCs*, do inglês *adipose-derived stem cells*) para identificar a população de células isoladas deste. Esta população é caracterizada por células aderentes e multipotentes (Zuk, Zhu et al. 2001, Zuk, Zhu et al. 2002, Konno, Hamabe et al. 2013). *ASCs* são células-tronco mesenquimais, por conseguinte, são progenitores de tipos celulares derivados da mesoderma, também chamadas de células estromais. Em passagens tardias, culturas de *ASCs* são homogêneas e apresentam morfologia fibroblastoide (Levi and Longaker 2011).

O tecido adiposo é composto, principalmente por células de gordura organizadas em lóbulos, sendo composto por adipócitos maduros, em mais de 90% do volume do tecido, e por uma fração de estroma vascular (*SVF*, do inglês *Fraction of the Vascular Stroma*), onde são encontrados pré-adipócitos, fibroblastos, células vasculares do músculo liso, células endoteliais, monócitos/macrófagos residentes, linfócitos e *ASCs* (Weisberg, McCann et al. 2003, Xu, Barnes et al. 2003). A relação de descendência entre *MSCs* e pericitos (células mesenquimais justapostas aos vasos) existe como base para os diferentes fenótipos de células-tronco do tecido adiposo (Zimmerlin, Donnenberg et al. 2012). O tecido adiposo do abdômen inferior é a região que contém a maior porcentagem de *ASCs* comparadas a outros sítios. Adicionalmente, o tecido conjuntivo fibroso, que contém mais tecido adiposo branco, tem um conteúdo mais elevado de *ASCs*.

Rodbell, em 1964, foi o primeiro pesquisador a descrever a técnica para isolar as ASCs do tecido adiposo (Rodbell 1964, Gimble, Katz et al. 2007). Neste trabalho, blocos de gordura foram removidos de ratos e lavados sucessivamente para remover as células hematopoiéticas presentes no tecido. Em seguida, o tecido foi incubado e digerido com colagenase para liberar a população de células. Adipócitos maduros e ASCs foram separados por centrifugação, encontrados na fração superior e inferior, respectivamente. A seleção final é alcançada pela aderência das células-tronco ao plástico, assim, as demais células, como as células do sangue periférico são descartadas na manutenção das condições de cultura de ASCs (Rodbell 1964, Gimble, Katz et al. 2007).

Um protocolo semelhante foi utilizado no isolamento de células-tronco humanas (Zuk, Zhu et al. 2001). Blocos de gordura humanos também foram utilizados, mas avanços nos procedimentos cirúrgicos têm simplificado esse processo.

Assim como as células-tronco da medula óssea, as derivadas do tecido adiposo mostram-se capazes de, sob estímulos ideais, diferenciarem em células nervosas, apresentando marcadores específicos de neurônios e ou células da glia. Usando um coquetel contendo hidroxianisol butilado, ácido valpróico, forskolina, hidrocortisona e insulina, Safford e grupo imprimiram fenótipo neural em ASCs, murinas e humanas. As células apresentaram expressão de proteínas neuro-específicas além de morfologia de célula nervosa (Safford, Hicok et al. 2002). Outros trabalhos mostraram iguais resultados com diferentes coquetéis para neuro-indução (Fujimura, Ogawa et al. 2005, Anghileri, Marconi et al. 2008). Ademais, as ASCs são capazes de se diferenciarem em células da glia (*Schwann*) usando distintos coquetéis de indução (Kingham, Kalbermatten et al. 2007, Xu, Liu et al. 2008, Wei, Gong et al. 2010).

A tríade Substrato - Topografia - Células-tronco

Estudos recentes têm mostrado que as células-tronco mesenquimais têm suas funções definidas pelas suas formas, com alterações na adesão celular e posterior tensão do citoesqueleto modulando linhagem (Engler, Sen et

al. , McBeath, Pirone et al.). Há evidências demonstrando a importância da tensão intracelular em CsT com um estado de alta tensão induzindo diferenciação (McBeath, Pirone et al. , Kilian, Bugarija et al. 2010). Avanços recentes são indicativos da exigência de um nível intermediário de tensão celular para auto-renovação de CsT (Gilbert, Havenstrite et al. 2010, McMurray, Gadegaard et al. 2011). Os mecanismos pelos quais os sinais nanotopográficos influenciam a proliferação e diferenciação das CsT não são muito bem compreendidos, mas parece envolver alterações na organização e estrutura do citoesqueleto, potencialmente, em resposta à geometria e tamanho dos elementos subjacentes da MEC (Guilak, Cohen et al.). Alterações nas dimensões características do substrato pode influenciar o agrupamento de integrinas e outras moléculas de adesão celular, alterando assim, o número e distribuição de adesão focal - *Fas (focal adhesion)* podendo, por conseguinte, controlar a adesão e disseminação de células (Pelham and Wang 1997, Santos, Tonelli et al. 2013).

Ao que parece, o comportamento celular pode ser controlado por mecanismo modulados pelo substrato por dois diferentes, mas simultâneos mecanismos de vias de sinalização, produzidos através da interação das células com a matriz extracelular (Silver, Siperko et al. 2003, Karamichos, Brown et al. 2006, Dado and Levenberg 2009). Um primeiro está relacionado com uma sinalização mediada por ligante de receptor MEC, que por sua vez, é mediado pela ligação de integrinas, denominado a sinalização induzida por ligação dependente de superfície química da MEC; e o outro, é uma sinalização ativada por tração, que depende de estímulos mecânicos transmitidos através da MEC. A importância da mecânica matricial no comportamento celular individual e função semelhante a sinais bioquímicos foram também estudados. Especificamente, os sinais mecânicos, tais como a pressão, o fluxo de fluido, a tensão de cisalhamento, e rigidez são importantes reguladores do desenvolvimento embrionário e têm sido demonstrados que afetam o desenvolvimento e padronização de tecidos de muitos órgãos. O mesmo tipo de célula pode induzir a resposta diferente dependendo da topografia da superfície. Isto tem implicações importantes para a utilização de *scaffolds* como um controlador auto-suficiente da função das células (Nur-E-Kamal, Ahmed et al. 2006). Estudos com CsT cultivadas em plataformas com

diferentes simetrias e graus de desordens mostram que nanotopografia influenciam a adesão celular, a migração e morfologia. Mais importante ainda, nanotopografia pode ser utilizado como reguladores para modular a organização do citoesqueleto e deformação nuclear, eventualmente, influenciar outras funções celulares tais como a proliferação e diferenciação (Dalby, Gadegaard et al. 2007).

BIOMATERIAIS E ENGENHARIA TECIDUAL

Regeneração e produção de tecido funcional é o objetivo principal em Engenharia de Tecidos. O corpo humano se desenvolve a partir de uma única célula diploide chamada zigoto e contém cerca de 85 trilhões de células na idade adulta, das quais mais de 150 bilhões são renovadas a cada dia. Os trilhões de células dividem-se em cerca de 260 diferentes fenótipos, que muitos deles irão continuar com a proliferação, diferenciação, capaz de auto montar-se em sistemas complexos e integrados de tecidos e órgãos ao longo do tempo e do espaço (Dutta and Dutta 2009). Os biomateriais artificiais são projetados para suportar o crescimento celular e tecidual para recriar a complexidade em nano e micro escala, observados em órgãos reais ao nível da interação célula-matriz (Tonelli, Santos et al. 2012, Resende, Fonseca et al. 2014).

Esses materiais são biodegradáveis de uso disseminado no tratamento de feridas e lesões. O mercado de biomateriais e o emprego desses na terapêutica têm aumentado cada vez mais, devido a sua incrível habilidade de iniciar e acelerar o processo de regeneração. A habilidade dos biomateriais de serem metabolizados pelo corpo permite que seja gradualmente substituído por novas células para formar tecidos funcionais (Seal, Otero et al. 2001, Gunatillake and Adhikari 2003).

O uso de biomateriais é observado desde civilizações antigas. Olhos artificiais, orelhas, dentes e narizes foram encontrados na Múmias egípcias (Williams et al. 1979). Chineses e indianos utilizavam ceras, colas e, tecidos na reconstrução de partes do corpo com defeitos. Ao longo dos séculos, os avanços na materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização têm permitido o uso de biomateriais de muitas maneiras (Park, 1984). A prática

médica hoje utiliza um grande número de dispositivos e implantes. Biomateriais, sob a forma de implantes (ligamentos, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares, implantes dentários, etc) e dispositivos médicos (marca-passos, biossensores, corações artificiais, etc) são amplamente usadas para substituir e / ou restaurar a função de tecidos ou órgãos traumatizados ou degenerados, e, assim, melhorar a qualidade de vida do paciente. Nas primeiras abordagens da ciência contemporânea, todos os tipos de materiais naturais tais como madeira, cola e borracha, e tecidos biológicos, materiais fabricados, tais como ferro, ouro, zinco, vidro foram usadas como “biomaterial”. As respostas do hospedeiro para estes materiais foram extremamente variado. Sob certas condições (características dos tecidos do hospedeiro e procedimento cirúrgico) alguns materiais foram tolerados pelo corpo, enquanto os mesmos materiais foram rejeitados em outra situação. Ao longo dos últimos 30 anos, um progresso considerável foi feito na compreensão das interações entre os tecidos e os materiais. Foi reconhecido que existem profundas diferenças entre não-vida (avital) e (vitais) materiais vivos (Patel, Gohil, 2012).

Há décadas, miríades de trabalhos vêm mostrando o desenvolvimento de biomateriais e sua capacidade de manutenção, estimulação, proliferação, migração, e mais recentemente, diferenciação de culturas celulares diversas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hench 1998, Gunatillake and Adhikari 2003). Os chamados *scaffolds* ou suportes feitos a partir dos mais diversos polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e bioabsorvíveis viraram um nicho de pesquisa aplicada, incrivelmente explorado nos últimos anos (Place, Evans et al. 2009).

Para fins de conceito, biomaterial compreende qualquer substância destinada a interagir com sistemas biológicos, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não servir como veículo, suporte ou estimulador para crescimento do novo tecido (Williams 1999). Os biomateriais que servem como análogos para a matriz extracelular nativa – MEC (do inglês, *extra cellular matrix, ECM*) são largamente utilizados pela medicina e medicina dentária. Matrizes de polímeros têm sido utilizadas para a regeneração de osso, cartilagem, fígado, pele e outros tecidos (Seal, Otero et al. 2001).

A estrutura em nanoescala da MEC é representada como uma rede natural de nanofibras intrincadas que suportam as células e especificam o seu comportamento através de sua própria estrutura e componentes. Fibras do MEC em nano e micro escala revelam detalhes que não são encontrados em materiais artificiais. Há muitas fibras diferentes, com papéis distintos que participam da estrutura da MEC proporcionando condições adequadas para as células para formar tecidos complexos e diferentes, como cérebro, coração, fígado e ossos (Reichardt and Tomaselli 1991, Bosman and Stamenkovic 2003, Santos, Tonelli et al. 2013, Resende, Fonseca et al. 2014).

Assim, uma matriz ideal deve apresentar características mais próximas possíveis da MEC; ter porosidade suficiente para a difusão de nutrientes e eliminação de resíduos, e ter estabilidade mecânica adequada para suportar cargas e de transferência. Outros fatores importantes na determinação da regeneração de tecidos e órgãos é a superfície química do material e a energia de superfície (Zhao, Schwartz et al. 2005) (Bujia 1994, Resende, Fonseca et al. 2014).

A química da superfície do material deve permitir a adesão das células e os eventos celulares. O substrato deve ser biocompatível de modo a que as células sejam capazes de expressar o seu fenótipo normal. Além disso, tamanhos de poro e das interligações entre os poros do substrato podem afetar o crescimento interno de tecido nos implantes e por isso devem ser levados em consideração (Mikos, Bao et al. 1993, Bujia 1994, Resende, Fonseca et al. 2014).

Com o aumento da expectativa de vida e do repertório de doenças crônicas e funcionais, a morbidade tem sido cada vez mais experimentada pela população mundial e igualmente combatida pela medicina regenerativa. Em todo o mundo, a demanda por transplantes de órgãos é muito superior à oferta de doadores. As últimas décadas de pesquisa científica trouxeram a possibilidade, pela primeira vez na história da humanidade, de se recriar tecidos biológicos em laboratórios, bem como estimular, diretamente no paciente, o crescimento e regeneração dos tecidos através de implantes biodegradáveis (Hench 1998, Orlando, Baptista et al. 2011). Com a descoberta

e o domínio da manipulação das células-tronco e os avanços na área de Engenharia de Polímeros é atualmente possível promover a regeneração de tecidos humanos com implantes de biomateriais associados às CsT (Marcacci, Kon et al. 2007, d'Aquino, De Rosa et al. 2009, Thesleff, Lehtimäki et al. 2011).

Poliésteres como Biomaterial

Os poliésteres são a vasta maioria de polímeros biodegradáveis usados e estudados como *scaffolds* na engenharia tecidual. Dentre os vários poliésteres podemos destacar as polilactonas sendo a poli(caprolactona) (PCL) (**Figura 2**) a mais estudada da família (Gunatillake and Adhikari 2003).

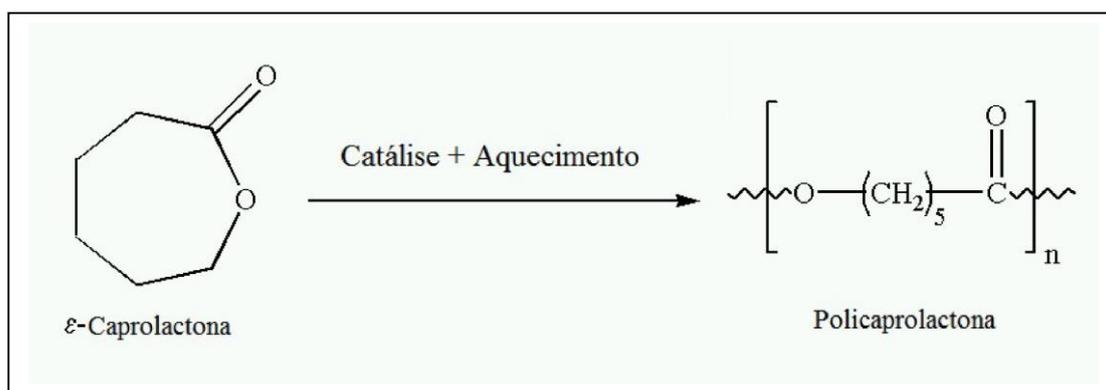


FIGURA 2. Representação esquemática da síntese de policaprolactona por polimerização de abertura de anel (*Ring-Opening Polymerization - ROP*) do ε-caprolactona. Adaptado de R.Sravanthi, 2009 (Fonte: <http://ethesis.nitrkl.ac.in/1458/>).

O PCL é um polímero semi-cristalino com uma temperatura de transição vítrea de cerca de $-60^{\circ}C$. O polímero tem uma temperatura de fusão baixa (59 a $64^{\circ}C$) e é compatível com uma gama de outros polímeros. Sua taxa de degradação é muito menor do que a do ácido poliglicólico (PLA), outro polímero muito usado com *scaffolds* na regeneração tecidual (Chiono, Tonda-Turo et al. 2009). O PCL é um polímero de base, útil para o desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas implantáveis. O homopolímero de PCL tem uma biodegradação de dois a três anos, e sua biocompatibilidade é atestada por inúmeros estudos (Kronenthal 1975, Pitt, Chasalow et al. 1981, Gunatillake and Adhikari 2003) sendo esse polímero um dos liberados para uso em humanos

pelo *Food and Drug Administration* – FDA (equivalente à ANVISA no Brasil). Substrato em três dimensões (3D) à base de PCL foi usado para cultivo de fibroblastos e apresentou excelente resposta celular com intensa colonização (Hutmacher, Schantz et al. 2001). Todavia, a hidrofobicidade do PCL pode reduzir a eficiência de adesão e resposta celular, para tanto, a combinação desses com outros grupos funcionais ou outras biomoléculas pode ser uma abordagem para contornar esse empecilho na busca de um *scaffold* ideal. Abordagens como a adição de grupos amina (NH₂) e conjugação com outras biomoléculas como colágeno, quitosana, lamina mostram melhora significativa no cultivo e resposta celular sobre substratos de PCL (Zhu, Gao et al. 2002, Dai, Williamson et al. 2004). Várias estruturas produzidas por diversos tipos de síntese demonstraram que os biomateriais, e dentre eles o PCL, cumprem bastante bem o papel de substrato para cultivo celular e engenharia tecidual. Estruturas porosas em forma de colmeia sustentaram proliferação de linhagem celular de osteoblastos (Kweon, Yoo et al. 2003). Donald e colaboradores desenvolveram uma membrana ultrafina de PCL (6 µm) que foi capaz de suportar efetivo cultivo e proliferação de células epiteliais, apontando como promissor *scaffold* para transplante de conjuntiva (Ang, Cheng et al. 2006).

Com o advento da técnica de *electrospinning*, a engenharia de biomateriais ficou mais próxima da reprodução de estruturas similares à matriz extracelular, com variados graus de porosidade (Doshi and Reneker 1995). Foi possível assim, produzir nanofibras de espessuras variáveis, o que tem mostrado ótimos resultados para cultivo celular e engenharia tecidual (Huang, Zhang et al. 2003). No *electrospinning* um campo eléctrico é usado para criar um jacto de solução de polímero carregado. Como este jato viaja no ar, o solvente evapora deixando para trás uma fibra que pode ser coletada em variadas plataformas. As fibras com uma variedade de formas das secções transversais e tamanhos podem ser produzidas a partir de uma variedade de polímeros produzindo fibras de polímero com diâmetros que variam de 2 nm a vários micrômetros (Doshi and Reneker 1995, Ahn, Park et al. 2006).

Em um trabalho de Danielson e grupo, cultura primária de condrócitos apresentaram aumento na expressão de genes associados à cartilagem, excelente adesão e proliferação celular quando cultivados sobre nanofibras de

PCL produzidas por *electrospinning* (Li, Danielson et al. 2003). Cultivo de células endoteliais em substrato de PCL e Poliuretano (PU) mostrou-se uma combinação interessante na busca de *scaffolds* para revascularização (Williamson, Black et al. 2006).

Recentemente, usando o sistema *E-Jetting* (*electrohydrodynamic printing*), técnica que utiliza campo elétrico necessário para criar fluxos de fluido para a entrega de tintas a um substrato, foi produzido *scaffold* 3D de PCL conjugado com colágeno (PCL/Col) para cultivo de condrócitos, que apresentou elevada produção de glicosaminoglicanas e elevada expressão de colágeno tipo II (Cai, Li et al. 2013). Não obstante, PCL também tem sido explorado para cultivo de neurônios e células de *Schwann* (Schnell, Klinkhammer et al. 2007). Células-tronco embrionárias cultivadas sobre nanofibras de PCL foram capazes de se diferenciarem em neurônios (Mahairaki, Lim et al. 2011).

Em outro trabalho, poli(L-ácido Lático)-co-poli-(3-caprolactona) associado ao Colageno (PLCL/Col) foi capaz de sustentar de maneira mais eficiente a neurodiferenciação de CsT (*Prabhakaran, Venugopal et al. 2009*). Em modelo murino de injúria do nervo ciático, Frattini e grupo demonstraram que a conjugação entre neurotubo de PCL enriquecido com células-tronco mesenquimais resultou em maior nível de fibras de mielina e maior inervação do que o controle (Frattini, Lopes et al. 2012).

Somados, esses e outros trabalhos suportam que PCL é um versátil e eficiente biomaterial para diversas aplicações na medicina regenerativa.

NANOTUBOS DE CARBONO E NEURODIFERENCIAÇÃO

Os nanomateriais, em geral, são atraentes para aplicações variadas porque se diferenciam de forma dramática dos seus precursores “*bulk*”. As propriedades destes materiais são determinadas pelo tamanho e pela morfologia, originando uma fascinante sintonia entre suas propriedades físico-químicas (Siegel 1993). Talvez os exemplos mais ilustrativos desses fenômenos possam ser tomados da ciência do carbono.

Os nanotubos de carbono (*Carbon Nanotubes – CNTs*) são formados a partir de uma folha de grafeno enrolada em forma cilíndrica, com “um átomo de espessura” (Iijima 1991) (**Figura 3**). Essas estruturas de carbono são bastante versáteis por se integrarem a diferentes áreas do conhecimento e são capazes de alcançar uma enorme inter/multidisciplinaridade. Atualmente, as pesquisas com nanotubos de carbono cruzam as fronteiras da física, da química, das ciências dos materiais, da biologia e desenvolvem-se rapidamente no campo da farmacologia. O advento do campo da nanotecnologia tem estimulado o interesse na criação de materiais nanocompósitos para uma variedade de propostas, incluindo aplicações biomédicas.

Os nanotubos de carbono (NTCs), quanto ao número de camadas, podem ser classificados em duas formas: nanotubos multicamadas ou de paredes múltiplas (“*multi-wall carbon nanotubes - MWCNTs*”) e camada simples (“*single-wall carbon nanotubes - SWCNTs*”) com variado tamanho e espessura não superior a 100nm, para os *MWCNT* e 0,4 a 2nm para os *SWCNT*, (Smart, Cassady et al. 2006) (**Figura 3**).

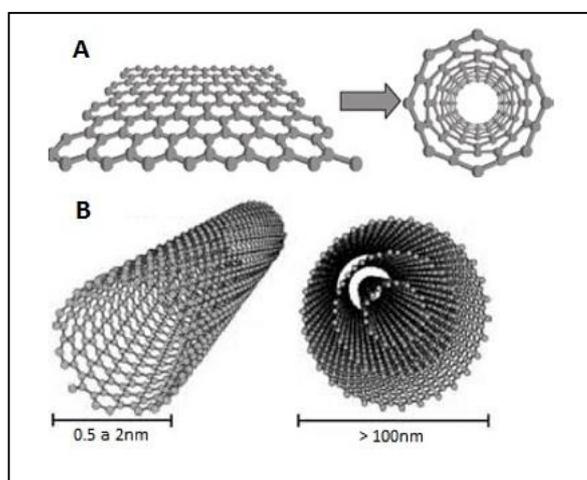


FIGURA 3. Esquema ilustrando formação de nanotubos de carbono (A) a partir da folha de grafeno, B, SWCNT e MWCNT. Adaptado de *The Journal of Nuclear Medicine* (Reilly 2007).

Estudos iniciais utilizando compósitos de polímeros sintéticos e NTCs têm demonstrado promissoras aplicações desse nanomaterial na engenharia de tecidos neural e ortopédico. Os NTCs podem ser facilmente funcionalizados com grupos funcionais e moléculas biológicas, permitindo assim seu uso como substrato para cultivo celular (Wong, Joselevich et al. 1998) (McKenzie, Waid et al. 2004).

Desde que Mattson *et al.*, em um trabalho pioneiro, demonstrou a biocompatibilidade de substrato de *MWCNTs* para o cultivo de neurônios (Mattson, Haddon et al. 2000), uma miríade de estudos atestam a aplicação dos NTCs como substrato para cultivo celular, para os mais diversos tipos celulares (McKenzie, Waid et al. 2004).

Surpreendentemente, as células apresentam preferência pelos NTCs como demonstrado em um elegante trabalho de Gabay e grupo, no qual culturas de neurônios se organizavam exclusivamente sobre as “ilhas” de NTCs (Gabay, Jakobs et al. 2005). Em função da sua propriedade elétrica, rugosidade, espessura e rigidez, e promoção de adesão de moléculas biológicas, trabalhos mostram que os NTCs, quando em substrato, levam à neuro-diferenciação de células-tronco mesenquimais (Tay, Gu et al. 2010, Chen and Hsiue 2013).

Neste contexto, os NTCs se apresentam como uma promissora alternativa para o incremento de plataformas para cultivo celular, enriquecimento de biomateriais e na regeneração do tecido nervoso e outros.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver um nanocompósito a base de poli(caprolactona) e NTCs para crescimento e diferenciação neuronal de células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (*hASCs*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Produzir e caracterizar uma manta de PCL;
- ✓ Funcionalizar os nanotubos de carbono;
- ✓ Produzir o nanocompósito conjugando a manta de poli(caprolactona) e o NTCs;
- ✓ Caracterizar o nanocompósito;
- ✓ Isolar e caracterizar as *hASCs*;
- ✓ Cultivar as *hASCs* sobre o nanocompósito e avaliar a biocompatibilidade/citotoxicidade;
- ✓ Avaliar a diferenciação neuronal de células *hASCs* cultivadas sobre o nanocompósito produzido.

MATERIAL E MÉTODOS

1º PARTE – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

PRODUÇÃO DA NANOFIBRA DE PCL

As nanofibras de PCL foram obtidas pelo processo de *electrospinning* utilizando um equipamento instalado no Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom) da UFMG através da eletrofiação de uma solução de ácido acético e PCL (16% em peso de PCL massa molar 80.000 a 90.000) com um fluxo de 3,0mL/h, distância agulha/coletor de 8cm e tensão aplicada de +20kV (**Figura 4**).

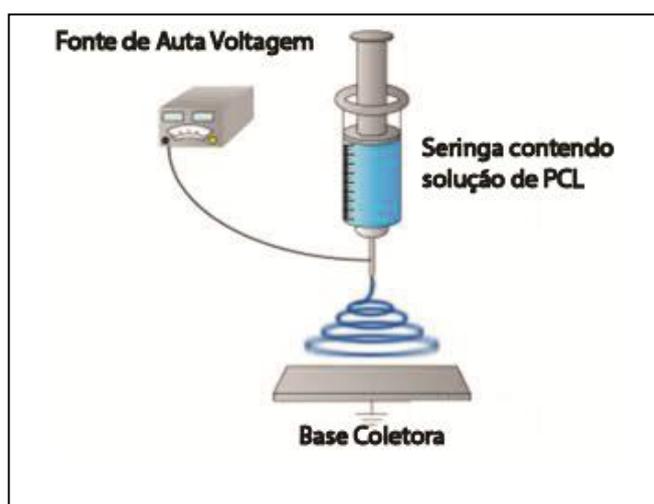


Figura 4. Desenho esquemático da máquina de *electrospinning*.

PRODUÇÃO DA NANOTUBOS DE CARBONO

Os nanotubos de carbonos usados nesse trabalho foram cedidos pelo Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física – ICEX – UFMG.

Os NTCs foram sintetizados pelo método de CVD (*Chemical Vapor Deposition*), utilizando-se de etileno como fonte de carbono e catalizador de cobalto e ferro. Temperatura interna da fornalha de 750°C. Foi utilizado nesse trabalho apenas nanotubos de paredes múltiplas.

FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO

O processo de funcionalização ideal além de eliminar outras formas de carbono e resíduos metálicos, devem criar defeitos nas paredes dos nanotubos, a fim de que a estabilidade seja alterada, de forma a ser possível funcionalizar com grupos carboxila e hidroxila, que novamente trarão estabilidade ao NTCs tornando-os hidrofílicos. Para funcionalizar NTCs, procedeu-se sonicação por 10 minutos em solução de ácido nítrico/sulfúrico ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), após a solução foi aquecida em micro-ondas por 15 minutos. A solução foi deixada em temperatura ambiente para resfriar e então foi lavada com água deionizada e seguindo secagem em estufa à 60°C.

PRODUÇÃO DO NANOCOMPÓSITO (NC)

Mantas de PCL foram cortadas em pedaços redondos de diâmetros ~2.5 e 1.5 cm e acomodadas em placas de 6 (10cm²/poço) e 24 poços (2cm²/poço) respectivamente. As mantas foram mantidas presas com arroelas improvisadas feitas de placas de cultura de 35mm ou falcon 15mL. NTCs foram ressuspensos em água com 25% de álcool, em concentração de 1mg/ml. A dispersão da solução foi feita com sonificador de ponta (SONICS Vibra-Cell™), a uma amplitude de 20%, e pulsos de 20 segundos e intervalos de 25 segundos. A solução homogênea foi então adicionada sobre as mantas, volume de ~2mL e de 250µL por poço de 10cm² e 2cm², respectivamente. As placas foram acondicionadas em estufa à 37°C para secagem da solução. Esse procedimento foi repetido em média 2 vezes, até que se obtivesse uma camada negra e homogênea de NTCs sobre a manta.

Após, as mantas de nanocompósitos foram transferidas para uma placa de petri de vidro e dispensado acetona, ~50 µL a 200µL, espalhadamente, sobre a superfície para adesão da camada de NTC ao polímero. As mantas de PCL foram pesadas antes e depois da deposição para obter a relação NCT/PCL em porcentagem de massa.

MANTA DE PCL E NANOCOMPÓSITO: CARACTERIZAÇÕES

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens para o estudo da morfologia das amostras foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura com elétrons secundários. As amostras foram montadas em suporte de alumínio padrão, fixadas com fita dupla face e submetidas ao processo de metalização por ouro. Para aquisição de imagens, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por efeito de campo modelo DSM 960A (Zeiss) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI / UFMG.

Termogravimetria (TG)

A técnica de Termogravimetria (TG) analisa a perda de massa da amostra ao ser gradualmente aquecida resultando em uma visualização gráfica de %massa x Temperatura (°C). Para se obter estes dados, o equipamento é dotado de uma balança muito sensível na base de cada cadinho. Desta forma, qualquer composto que durante a faixa de temperatura estabelecida é liberado da amostra, em sua maioria na forma de gases, reflete diretamente na massa da amostra inicial. Essa análise é realizada, principalmente, para verificar se a membrana possui traços de solvente após o processamento. Essa certificação é de extrema importância, pois os solventes que são utilizados devem ser eliminados totalmente durante o processo, uma vez que exibem caráter tóxico se entrarem em contato com material biológico. O ensaio de Termogravimetria das amostras (manta de PCL e NC) foram realizadas em equipamento DTG - 60H da Shimadzu a uma taxa de aquecimento de 10°C/min da temperatura ambiente até 500°C sob atmosfera oxidante de ar sintético sob fluxo de 100mL/min.

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é uma ferramenta poderosa no estudo das propriedades estruturais dos materiais, independente do seu caráter amorfo ou cristalino. A radiação infravermelha é caracterizada por comprimentos de onda entre 800 e 1.000.000 nm. Nas moléculas, os átomos e os grupos atômicos estão em

contínuo movimento, uns em relação aos outros (vibrações moleculares). Quando as moléculas são sujeitas à radiação infravermelha com energia semelhante à correspondente a essas vibrações, elas podem alterar o seu estado de vibração (excitação), absorvendo a radiação correspondente à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado. Essas vibrações podem ter amplitudes e velocidades diferentes e ocorrem em torno das ligações covalentes que une os átomos ou grupos de átomos. A energia das vibrações é quantizada.

Assim, através da comparação dos valores de energia da radiação infravermelha para os quais há absorção, é possível identificar as moléculas ou os tipos de moléculas presentes nas amostras (AYRES 2006). A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para caracterizar a presença de grupos químicos específicos nas manta de PCL e no NC. Este método de caracterização auxiliou na investigação da composição química dos compósitos dando-nos informações sobre a estrutura molecular a partir de espectros vibracionais pela absorção de energia para o estiramento (deformação axial) e flexão (deformação angular) das ligações entre átomos de diferentes grupos funcionais.

As amostras foram caracterizadas utilizando um espectrômetro FTIR (Thermo scientific Fisher, Nicolet 6700). O método analítico utilizado foi o de reflectância total atenuada (ATR) que funcionam na faixa de $600 - 4.000\text{cm}^{-1}$, usando o acessório OMNI Smart accessory e 64 varreduras foram adquiridas a uma resolução de 4 cm^{-1} com intervalos de 2cm^{-1} . Os espectros de FTIR foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas com grupos químicos.

Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman ressonante assistida por microscopia ótica é uma espectroscopia do tipo vibracional. É capaz de permitir identificação de materiais de maneira não invasiva e não destrutiva, através de excitação do alvo por um laser e obtenção dos dados do perfil de deslocamento de energia (*energy-shifting*) em número de onda; estes são como impressão digital do material em análise (White 2009). As principais características do espectro Raman dos nanotubos de carbono são o modo de respiração radial (RBM) ~

200 cm^{-1} no qual todos os átomos vibram em fase na direção radial (Samsonidze, Saito et al. 2003), os modos tangenciais de estiramento (TM) $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ (**Figura 5**) que formam a banda G do espectro, e a banda D $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$, atribuída à presença de estruturas desordenadas, como nanotubos defeituosos e carbono não cristalino (Dresselhaus, Dresselhaus et al. 2004).

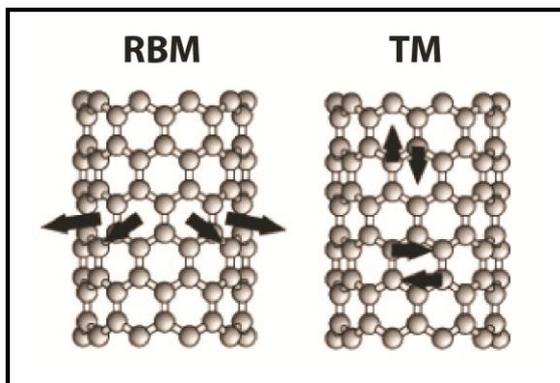


FIGURA 5. Representação esquemática do modo de respiração radial (RBM) e do modo tangencial de estiramento, este último forma a banda G e D observadas por espectro Raman, Adaptado de Dresselhaus et al. (Dresselhaus, Dresselhaus et al. 2004).

Essa técnica foi realizada com a finalidade de se observar as bandas típicas G ($\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$), devido às vibrações de estiramento simétrico C-C no plano (Anton, Santosh et al. 2008); e banda D ($\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$) dos NTCs, sua pureza e ainda detectar se há interação covalente entre esse e o polímero.

A manta de PCL, o nanocompósito e os nanotubos de carbono tiveram então os espectros Raman coletados por meio de um espectrômetro de Dilor XY equipado com um laser de Ar-Kr na faixa de energia de excitação a 2,41 eV (514,5 nm). O feixe de laser foi focado por uma objetiva de 100x e a potência do laser foi mantida $\sim 1 \text{ mW}$, a fim de evitar o aquecimento da amostra por exposição a laser.

Ensaio de Eletroresistividade

Para avaliarmos o nível de resistividade do nanocompósito, um aparato de vidro foi improvisado, usando-se uma lâmina e uma lamínula cortada em pedaços retangulares de 2cm x 0.4cm. A manta de PCL, o nanocompósito e um pedaço de igual dimensão, 1 x 1cm, de um *scaffold* comercial (*later Neurotube®*, Synovis, www.synovismicro.com) foram acondicionadas sobre uma lâmina e fixadas com o pedaço de lamínula. Nas 4 extremidades foram soldados com cola metálica tinta prata fio de cobre 0.3mm (**Figura 6**).

Foi utilizado um equipamento fonte de corrente KEITHLEY, modelo 237, com distância entre as extremidades (fio de cobre) de 3,4mm. Os filmes foram cortados em pedaços de 1,0 x 1,0 cm com espessura de aproximadamente 0,25; 0,25; 0,6mm para PCL, NC e *Neurotube®* comercial, respectivamente, (medidos com paquímetro).

A resistividade foi obtida pela aplicação de uma corrente de 10 nA. As medidas foram obtidas após estabilização da voltagem (aproximadamente 5 minutos depois do contato com as pontas), comparadas invertendo o sentido da corrente, e realizadas em duplicata, em duas direções da amostra em cada lado do filme.

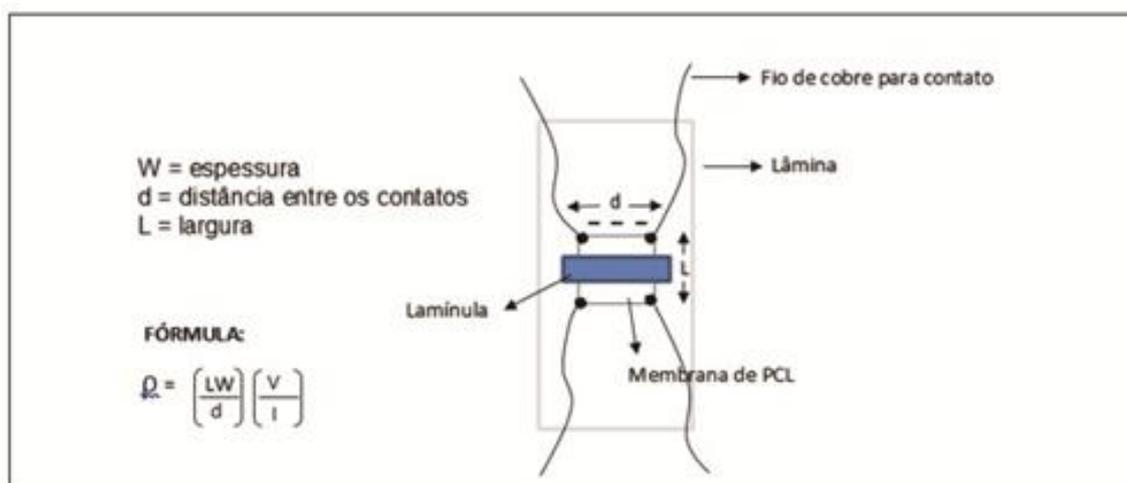


Figura 6. Representação esquemática do aparato para medição da resistividade elétrica dos biomateriais.

O cálculo foi feito seguindo a fórmula:

$$\rho = \left(\frac{LW}{D} \right) \left(\frac{V}{I} \right)$$

Na qual ρ = resistência

W = espessura

d = distância entre os contatos

L = largura.

2° - PARTE – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO

ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO (hASC)

As hASC foram isoladas a partir de amostras de tecido adiposo retiradas durante procedimentos cirúrgicos de lipoaspiração. Esses procedimentos foram realizados na Clínicas de Cirurgia Plástica Dr. Luiz Lamana, em Belo Horizonte, Minas Gerais. O lipoaspirado de diferentes partes do corpo (flancos esquerdo e direito, regiões supra e infra-umbilical) foi acondicionado em quatro seringas esterilizadas de 20mL e encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular do professor Alfredo Góes, que gentilmente nos cedeu para o desenvolvimento desse trabalho.

Todos os procedimentos de coleta, transporte e processamento foram realizados de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer: ETIC 623/09).

Processamento do Lipoaspirado e Isolamento de hASCs

Em capela de fluxo laminar, a amostra do tecido adiposo, recém obtida, foi transferida para tubos de centrifugação 50mL, acrescida de PBS pH7,2 e lavada por homogeneização, seguida de centrifugação por 10 minutos à 28°C. Após a centrifugação, a fase superior contendo fração adipocitária foi transferida para outro tubo de centrifugação e tratada com colagenase I (0,075%) (Sigma) por 2 horas, em estufa a 37°C e 5% CO₂. A cada 15 minutos, as amostras foram vigorosamente homogeneizadas. Transcorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 350g a 21°C para separação da fração adipocitária da fração estromal vascular do tecido adiposo. A fração superior adipocitária foi desprezada e a fração estromal vascular foi suspensa em meio de cultura basal DMEM suplementado com 5mM de Bicarbonato de Sódio 10% de soro bovino fetal (Gibco), penicilina G100U/mL, estreptomicina 100U/mL (Invitrogen), distribuída em garrafas de cultura T-25 e mantidas em estufa à 37°C e 5% CO₂.

Após 2 dias, o meio de cultura foi recolhido, centrifugado nas mesmas condições anteriormente descritas, o precipitado foi então ressuspensionado em

meio basal e transferido para nova placa T-25 e mantido em cultivo. A cada 2 dias as células foram lavadas com PBS e meio de cultura novo foi adicionado.

Ao atingirem confluência ~90%, as células foram lavadas com PBS e tratadas com 1mL de tripsina-EDTA (0,25%) (Invitrogen), por 5 minutos em estufa à 37°C 5% CO₂. Seguida de adição de 8mL de meio de cultura e o volume transferido para uma garrafa T-75. A cada dois dias o meio de cultivo foi trocado; e o procedimento de expansão prosseguiu da mesma forma. Esse procedimento foi realizado até as células alcançarem a 4^o passagem, para a partir de então serem utilizadas neste trabalho (Zuk, Zhu et al. 2001).

TESTE DE MULTIPONTENCIALIDADE

Diferenciação de hASC em adipócito, condrócito e osteócito

Para demonstrar a capacidade de diferenciação das hASC, células na 5^a passagem, foram cultivadas em placas de 24 poços por 21 dias em estufa a 37°C e 5% CO₂ aproximadamente 2.6×10^4 células por poço. O meio de diferenciação foi usado seguindo a recomendação conforme o fabricante. Após os 14 e 21 dias a diferenciação foi analisada de acordo.

- Kit de diferenciação osteogênica (Gibco): A substituição do meio de cultura se deu a cada 4 dias. Após os 21 dias de cultivo, a diferenciação foi avaliada pela incubação com *Alizarin Red S* (Milipore). As células foram fixadas com solução de formaldeído 4% por 30 minutos. Após fixação, as células foram lavadas com água destilada e coradas com 2% *Alizarin Red S Solution* por 3 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com água destilada e visualizadas em microscópio para captura de imagens.
- Kit de diferenciação condrogênica (Gibco): A substituição do meio de cultura se deu a cada 2 dias. Após os 21 dias de cultivo, a diferenciação foi avaliada pela incubação com *Alcian Blue* (Sigma). As células foram lavadas e fixadas com solução de 4% formaldeído por 30 minutos. A seguir, as amostras foram lavadas com PBS e coradas com 1% de *Alcian Blue Solution* por 30 minutos. Após 3 lavagens com 0.1 N HCL, a

acidez foi neutralizada com água destilada e as células foram visualizadas em microscópio para captura de imagens.

- Kit de diferenciação adipogênica (Milipore): A substituição do meio de cultura se deu a cada 2 dias, alternado entre meio de indução e manutenção de acordo com instruções do fabricante. Após os 21 dias de cultivo, a diferenciação foi avaliada pela incubação com *Oil Red O* (Milipore). O meio foi aspirado e as células fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos. Após fixação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e adicionado 500µL *Oil Red O Solution*. Após 50 minutos de incubação, as células foram lavadas com água destilada e tiveram os núcleos corados com solução de hematoxilina por 10 minutos e visualizadas em microscópio para captura de imagens.

Imunofenotipagem - Caracterização das hASC por Citometria de Fluxo

As hASC foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise de moléculas de superfície celular específicas. Para tanto, hASC na 5^o passagem e em densidade de 5×10^5 , foram incubadas com anticorpos primários, por 30 minutos a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário policlonal por 30 minutos a 4°C. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. As células foram novamente lavadas com PBS e depois fixadas em formaldeído 4%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário (Tabela 1).

Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade, para se estabelecer a população a ser analisada. A obtenção dos dados foi realizada utilizando-se o programa CELLQuest (BD *Facscalibur*). Foram adquiridos 20.000 eventos e os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa *FlowJo*. A partir do gráfico de tamanho *versus* granulosidade gerado pela análise das células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação, a população de células a ser estudada foi delimitada.

Em seguida, um gráfico de histograma foi criado para delimitar a região do controle negativo de fluorescência, referente à células que foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. A partir da definição destes parâmetros, foram realizadas as análises das células marcadas com os anticorpos primários e secundários, segundo descrito por Zuk e colaboradores (Zuk, Zhu et al. 2001).

TABELA I. Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Marca
CD14	monoclonal	Coelho		abcam
CD13	monoclonal	camundongo	Allophycocyanin	abcam
CD30	monoclonal	coelho	-	abcam
CD31	monoclonal	Camundongo	PE-Dyomics® 590	abcam
CD34	monoclonal	coelho	-	abcam
CD45	monoclonal	Rato	PE/Cy5®	abcam
CD73	monoclonal	Camundongo	Allophycocyanin	abcam
CD90	monoclonal	Rato	PE/Cy5®	abcam
CD105	monoclonal	camundongo	Phycoerythrin	abcam
CD147	monoclonal	Camundongo	FITC	abcam
PTCH	Monoclonal	Cabra	-	Millipore
STRO-1	monoclonal	Camundongo	FITC	biolegend
PTCH	monoclonal	Cabra	-	Millipore
Anti-cabra	policlonal	Macaco	Cy5®	Millipore
Anti-coelho	policlonal	Macaco	Rodamina	Millipore

CULTIVO DE *hASC* EM NANOCOMPÓSITO DE NTC

Teste de Biocompatibilidade - Live/Dead

Para todos os experimentos de cultivo de *hASC* em manta de PCL e NC, a esterilização dos biomateriais (e das arrolas de fixação) foi feita por lavagem em água deionizadas e álcool seguida de esterilização em UV por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido 4 vezes.

Células cultivadas sobre PCL e NC, em placas de 24 poços, com meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de antibiótico/fungicida, foram avaliadas quanto a sua viabilidade. Nos intervalos de 3, 7 e 14 dias, as células foram coradas com homodímero de etídio (*Ethidium homodimer-1 – EthD-1*) e calceína, para visualizar a população de células vivas e mortas. Resumidamente, as células cultivadas sobre os biomateriais foram incubadas em tampão fosfato contendo 2 mol/L de *calcein-AM* e 2 mmol/L de *EthD-1* (*Live / Dead Viability/Cytotoxicity Kit, Invitrogen*) durante 30 minutos para análise de viabilidade celular.

As células vivas são distinguíveis pela atividade de esterases intracelulares que convertem enzimaticamente a calceína AM não fluorescente em um subproduto com forte fluorescência verde. Por outro lado, *EthD-1* penetra na membrana de células mortas e se liga ao DNA, o qual exibe fluorescência vermelha. Após o tratamento, as *hASC* foram visualizadas microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse Ti).

Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de se observar a morfologia que as células apresentam sobre os biomateriais e confirmar a adesão celular, foi feita visualização de cultura por microscopia eletrônica de varredura. As mantas de PCL e o NC, com dimensões aproximadas de 2,4 cm de diâmetro, foram esterilizados conforme metodologia já citada. Seguidamente, os dois materiais foram acondicionados em placas de 24 poços e fixados com anéis de plásticos, improvisados a partir de tubos de centrifugação 15mL e incubados com meio basal por 24 horas. Após esse período, o meio foi retirado, e seguiu-se incubação com PBS por 24

horas. As *hASC* em confluência de 10^4 por cm^2 foram cultivadas por 14 dias com meio basal 1% de soro fetal bovino. A cada 7 dias o meio foi trocado. As amostras

foram então recolhidas, lavadas duas vezes em PBS e fixadas com glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M por um período de 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado Tetróxido de ósmio 1% por 2 horas à 4°C, sempre protegido da luz. Ao término deste processo, as amostras foram lavadas 5 vezes com água destilada. Seguiu-se com imersão em álcool etílico por 15 minutos para desidratação e álcool absoluto por 1 hora. Finalizada a desidratação, as amostras permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO_2 . A secagem em ponto crítico é o processo pelo qual o álcool é substituído pelo CO_2 evitando dano à célula causado pela tensão superficial durante o processo da evaporação natural. Após a secagem em ponto crítico de CO_2 , as amostras foram montadas em suporte de alumínio padrão e submetidas ao processo de metalização por ouro. Para aquisição de imagens, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por efeito de campo modelo DSM 960^a (Zeiss) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI / UFMG

Avaliação da Expressão de Neuromarcador por Imunofluorescência

Para avaliarmos se o cultivo de *hASC* sobre o NC foi capaz de estimular a expressão de marcadores de células nervosas, *hASC* cultivadas por 7 e 14 foram fixadas em 4% paraformaldeído por 15 minutos, seguindo-se lavagem com Triton 0,5% em PBS por 3 vezes com intervalos de 5 minutos para permeabilização da membrana celular. Após a permeabilização, as células foram lavadas novamente com PBS e feito o bloqueio com 3% BSA/PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos (**Tabela 2**) primários e secundários, diluídos em PBS/1%BSA.

Outro grupo experimental foi submetido à estimulação química/biológica de neurodiferenciação com fator de crescimento de fibroblasto básico (*basic fibroblast growth factor - bFGF*) e forskolina (*forskolin*), segundo Jang e grupo (Jang, Cho et al. 2010).

Resumidamente, foi adicionando ao meio de cultura, com 1% de soro fetal bovino, 100ng/ml de *bFGF*. Após 7 dias de cultivo, o meio foi trocado e enriquecido com forskolina 10µm/mL e cultivadas por mais 7 dias.

TABELA II. Anticorpos utilizados para a imunofluorescência

Marcador	Tipo	Espécie	Conjugado	Marca
MAP2	Policlonal	galinha	-	abcam
GFAP	Policlonal	cabra	-	abcam
TUJ-1	Policlonal	camundongo	Alexa Fluor 488	Millipore
Anti-cabra	monoclonal	Coelho	Cy5	abcam
Anti-galinha	monoclonal	Camundongo	Cy3	abcam

Registro eletrofisiológico – Patch Clamp

Para averiguar se as *hASC* apresentariam potencial de ação de células nervosa, após cultivo sobre o NC, foi feito um ensaio de eletrofisiologia. As células ficaram em uma câmara de perfusão preenchida com solução de banho montada em um microscópio invertido (TS-100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Os registros foram realizados com pipetas de vidro (1,5 mm d.e., 1,0 mm d.i. Perfecta, São Paulo, SP) preenchidos com uma solução interna. Quando colocadas na solução de banho, essas pipetas tinham uma faixa de resistência de 1,5 a 3 MΩ e conectados por um fio de Ag-AgCl a um amplificador EPC-10 (HEKA Elektronik, Germany). O movimento da pipeta foi controlado por um micromanipulador (MP-285, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) acoplado ao microscópio.

Após a formação do selo (resistência superior à $1\text{ G}\Omega$) a capacitância de membrana e resistência do selo foram medidas através de rotinas pré-programadas no software de aquisição utilizado (PatchMaster, HEKA Elektronik, Germany) e a capacitância e resistência em série foram compensadas eletronicamente através de comandos existentes no próprio amplificador. As correntes de vazamento foram subtraídas do sinal da corrente iônica através de um protocolo P/4 (Bezanilla and Armstrong 1977).

Para o registro do potencial de membrana, as células foram mantidas em potenciais próximas a -70 mV através da injeção de uma corrente negativa. As células foram estimuladas com pulsos despolarizantes (200 a 500 pA) com duração de 300ms e observado a geração do potencial de ação. Já para a medida das correntes iônicas, todas as células foram mantidas em um potencial de “*holding*” de -80 mV quando não estimuladas. Foram realizados experimentos utilizando um protocolo onde a célula é despolarizada até 0 mV a partir de um potencial de -100 mV durante 300ms para a obtenção das correntes iônicas dependentes de voltagem.

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (20 a 25°C).

RESULTADOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

Produção do Nanocompósito

Os NCTs foram funcionalizados e ressuspensos em água e álcool 25%. As membranas de PCL foram acondicionadas às placas de cultura e procedeu-se a deposição da solução (Figura 7E) de NCTs, seguido de secagem por 24h em estufa a 40°C. Como mostra a figura abaixo, as arrolas de fixação das membranas às placas de 6 e 24 poços (7A e B), a membrana de PCL antes (C) e depois (D) da deposição de NTC (**Figura 7**).

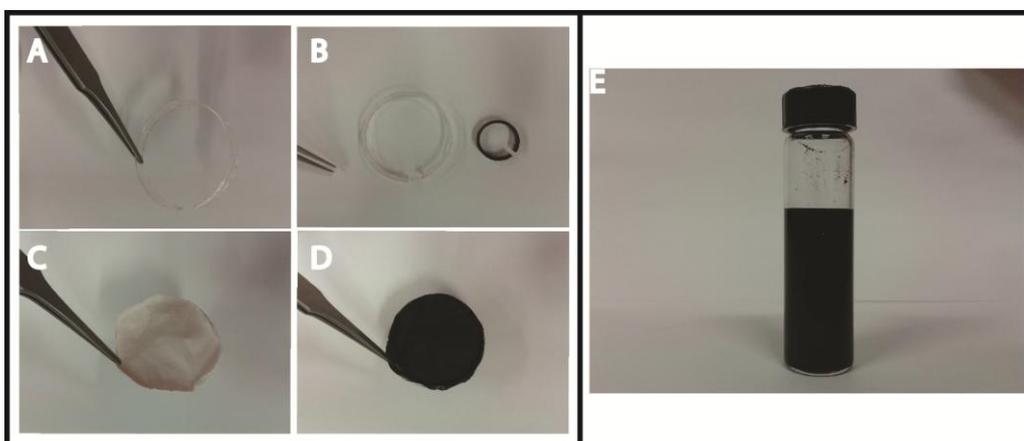


FIGURA 7. Produção do Nanocompósito. A e B, arrolas para fixação da manta de PCL em placa de cultura, improvisadas a partir de placas de cultura 35mm e tubo de centrifugação 15ml. C, manta de PCL; D, nanocompósito; E, suspensão de nanotubos de carbono em água deionizada e 25% de álcool.

Caracterização da manta de PCL e do nanocompósito

Estudo Morfológico - Microscopia Eletrônica de Varredura

As nanofibras de poli(caprolactona) foram obtidas pelo processo de *electrospinning*. Análises das imagens de microscopia eletrônica de varredura revelam que a manta de PCL apresenta nanofibras emaranhadas com alta porosidade e espessura variada (Figura 8A, B e C). O NC apresentou redução drástica da porosidade e tamanho de poros. É possível observar um tapete emaranhado de NCT formado sobre a nanofibras de PCL (**Figura 8E**). Nas figuras **8H, I e J** é possível observar a interface das nanofibras de PCL e a camada de nanotubos de carbono.

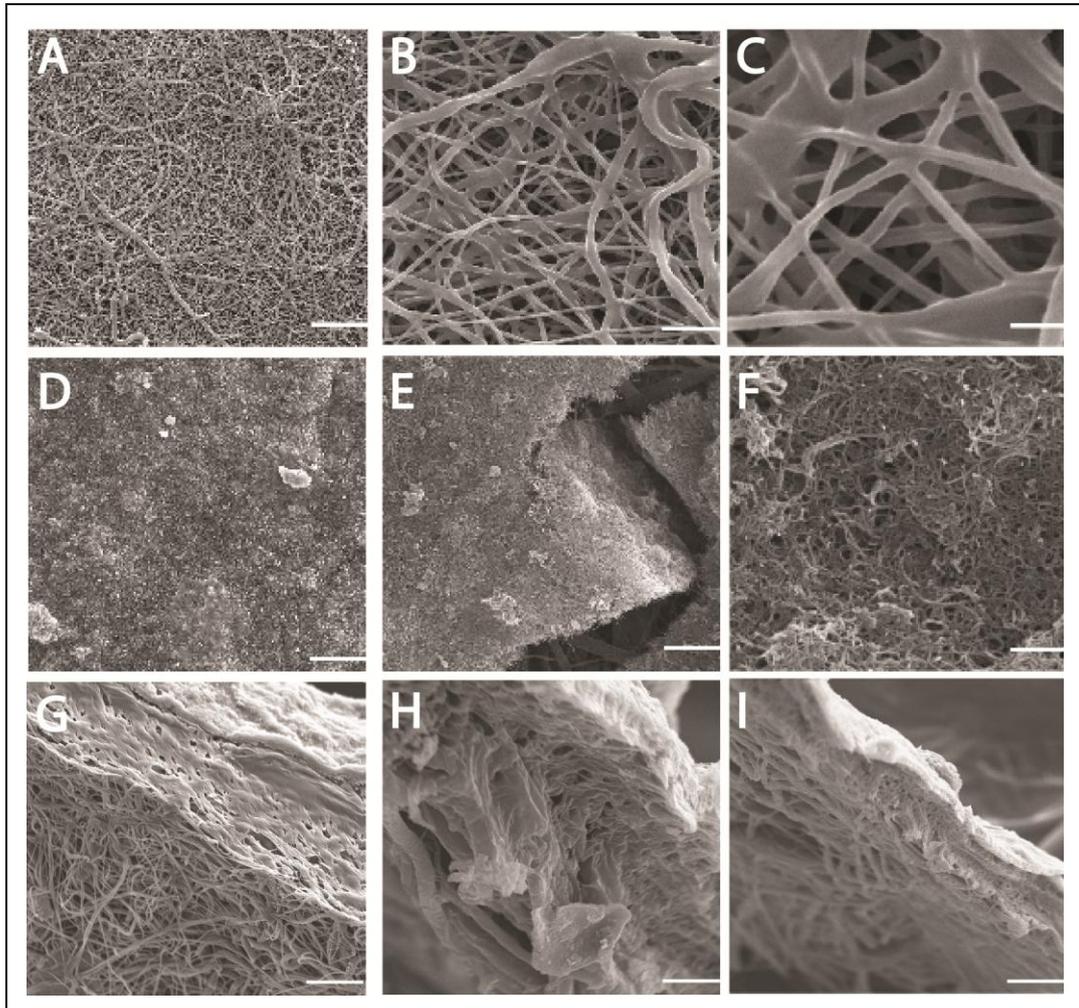


Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura da manta de PCL e do Nanocompósito. A, B e C. Manta de PCL. Barra corresponde a 30, 45 e 1.5 micrômetros, respectivamente. **Em C, D e F;** Nanocomósito. **G, H, I;** Nanocompósito em visão lateral. Observar-se em **E**, o tapete formado por nanotubo de carbono com quebra mostrando abaixo as fibras de PCL. **A e D; B e E; C e F**, em aumento de 500x, 3000x e 10000x, barra corresponde a 30, 45 e 1.5 micrômetros, respectivamente. **G, H, I**, aumentos de 1000x, 2000x e 500x; barra corresponde a 15, 7,5 e 30 micrômetros, respectivamente.

Ensaio de Termogravimetria

As curvas de TG da manta de PCL e do NC, intervalo de temperatura entre 25°C a 400°C, são mostradas na figura 8. As nanofibras de PCL eletrofiadas apresentaram uma perda de massa inicial menor que 1% em $T_{pico} \sim 76^\circ\text{C}$ referente a presença dos solventes utilizados durante o processamento e uma perda de massa em $T_{pico} \sim 392^\circ\text{C}$ devido a decomposição total da policaprolactona (**Figura 9**). Esse resultado indica que o biomaterial produzido não contém contaminantes.

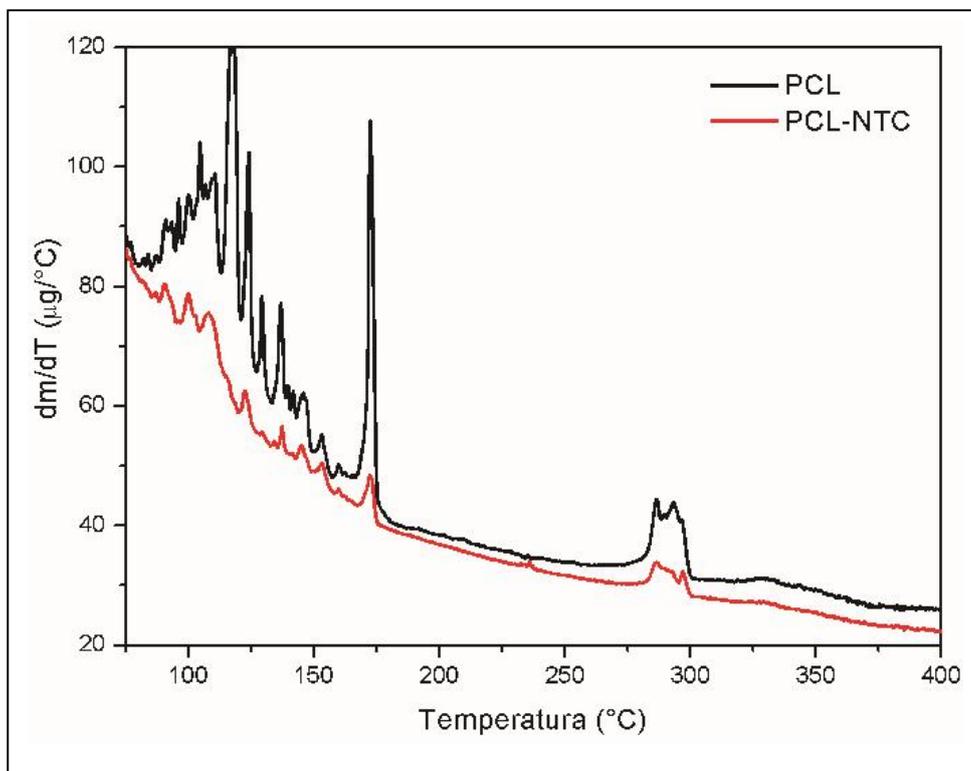


FIGURA 9. Ensaio de Termogravimetria (TG). Curva de TG para a manta de PCL (preto) e para o nanocompósito (vermelho).

Espectroscopia de absorvância na região do infravermelho

Nanocompósitos poliméricos contendo carbono como material de preenchimento são opticamente opacos e conseqüentemente difíceis de analisar através de FTIR usando a técnica de transmissão, a menos que as medidas sejam feitas com filmes ultrafinos (50-100 μm) (Matos 2011). Nesse sentido, o método de refletância total atenuada (ATR) tem se mostrado bastante adequado, uma vez que para a realização das medidas não é necessário nenhuma forma de preparo prévio da amostra (**Figura 10**).

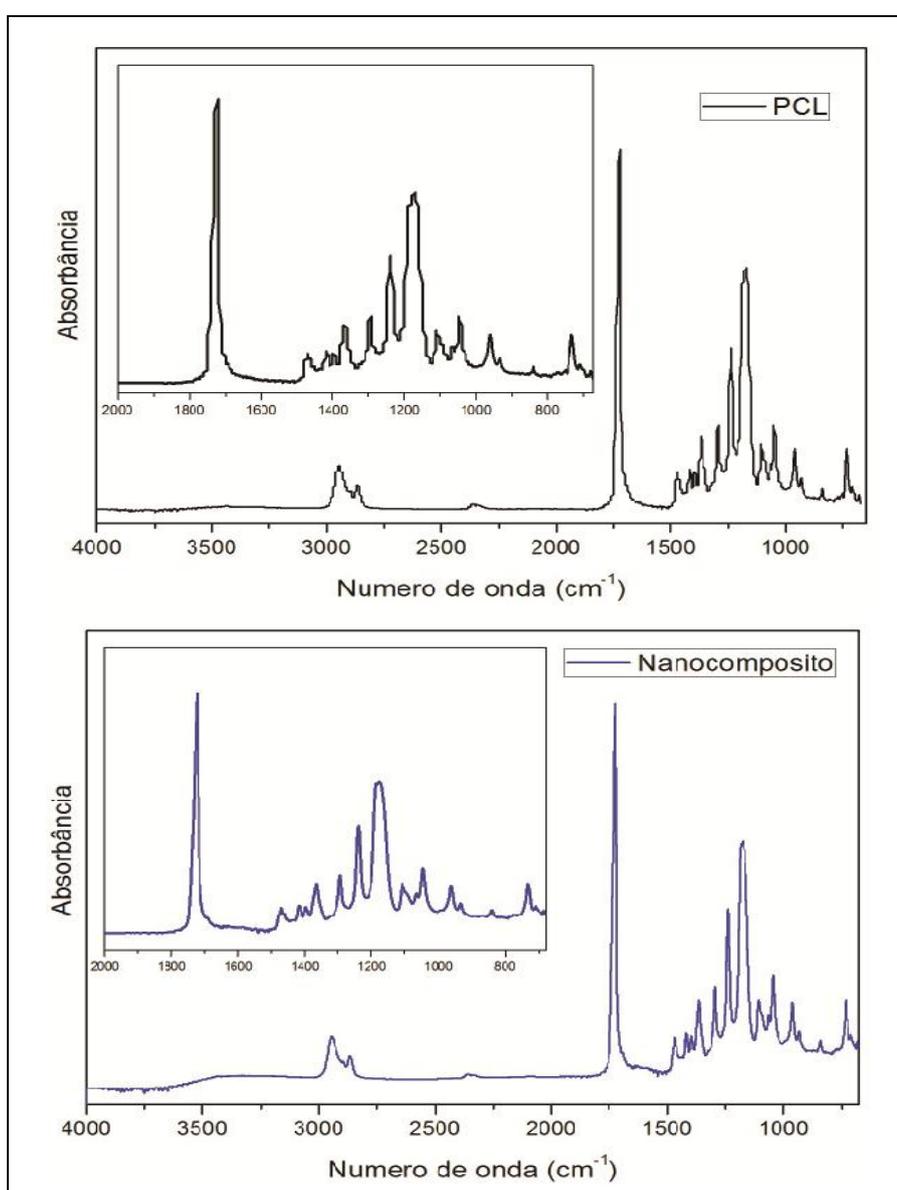


Figura 10. Plot de FTIR. Espectro de absorvância na região do infravermelho da manta de PCL e do Nanocomposito.

A Figura 10 apresenta os espectros de FTIR do biomaterial PCL e do nanocompósito, obtidos na região de 4000 e 600 cm^{-1} e normalizados em função da intensidade da banda em 700 cm^{-1} .

Foram observadas as seguintes bandas de absorção no infravermelho: em 2949 cm^{-1} e 2865 cm^{-1} , associadas ao estiramento assimétrico e simétrico de CH_2 respectivamente; a 1727 cm^{-1} , associada ao estiramento da carbonila; em 1293 cm^{-1} ao estiramento C-O e C-C na fase cristalina; em 1240 cm^{-1} associado ao estiramento assimétrico COC; e 1170 cm^{-1} associado ao estiramento simétrico COC (Elzein, Nasser-Eddine et al. 2004). Os resultados de FTIR mostram os picos característicos de poli(caprolactona) (Elzein, Nasser-Eddine et al. 2004) aferindo também a propriedade e pureza do polímero.

Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman apresentou picos característicos do *MWCNT* (DiLeo, Landi et al. 2007) e de PCL, não identificando outros contaminantes nas amostras de NC e PCL. Não se observou picos referentes ao PCL na figura 10B, em função da sobreposição do NTC que tem uma intensidade na emissão ressonante muito maior, camuflando assim o PCL. Os espectros Raman, normalizados em função da banda G, estão representados na Figura 11.

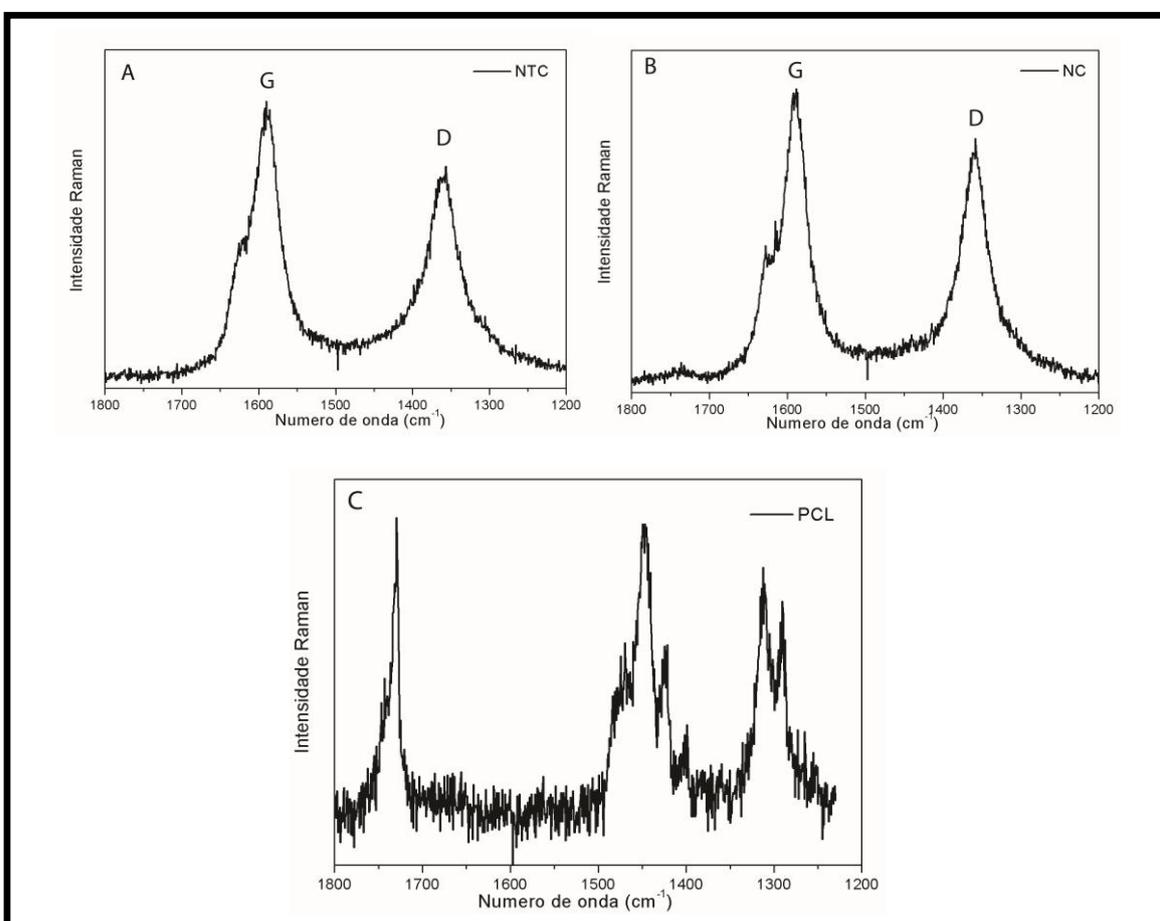


FIGURA 11. ESPECTRO RAMAN. A, nanotubos de carbono; **B**, nanocompósito, **C**, manta de PCL.

Os espectros de Raman do nanotubo de carbono e do nanocompósito apresentam as bandas características de NTCs: a banda G (1578cm^{-1}), devido às vibrações de estiramento simétrico C-C no plano (Anton, Santosh et al. 2008); banda D (1335cm^{-1}), modo que se torna ativo no Raman devido à relaxação induzida por defeitos, (heteroátomos, vacâncias) (Dresselhaus, Dresselhaus et al. 2004, Datsyuk, Kalyva et al. 2008) (Figura 9A e B). Na figura 10C, observa-se picos característicos de PCL $\nu\text{C} = \text{O}$ a 1727 cm^{-1} ; δCH_2 a $1421, 1444, 1469\text{ cm}^{-1}$; ωCH_2 a $1287, 1308\text{ cm}^{-1}$, também foram observados (Ku and Park 2010).

Ensaio de Eletroresistividade

A resistividade elétrica dos biomateriais (PCL, NC, *Neurotube*® comercial) foi medida usando-se um aparato de vidro, improvisado a partir de lâminas e lamínulas (**Figura 12**). Ao biomaterial foram conectados fios de cobre que foram acoplados a uma fonte de corrente KEITHLEY. Os NCs apresentaram diminuição da resistividade elétrica, $1,89 \times 10 \Omega \cdot \text{cm}$, em contrapartida, a membrana de PCL apresentou resistividade de $0,31 \times 10^9 \Omega \cdot \text{cm}$, e o neurotubo comercial (feito a partir de ácido láctico) resistividade de $5,24 \times 10^2 \Omega \cdot \text{cm}$ (**Tabela 3**).

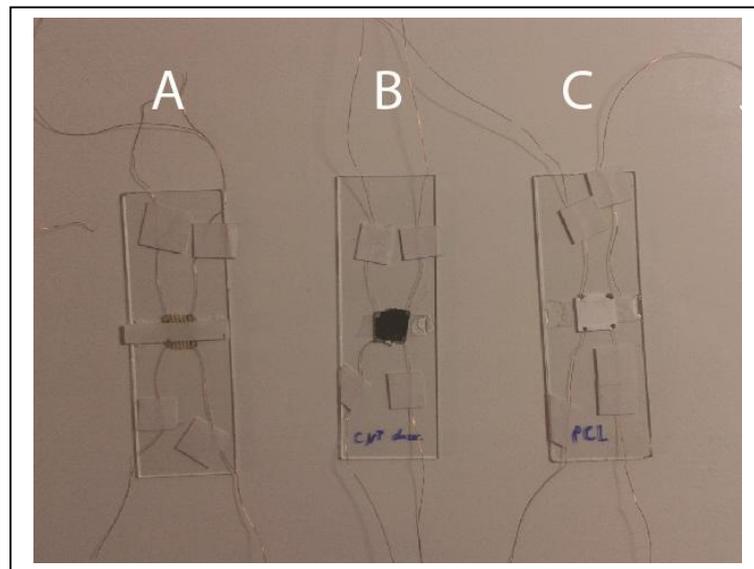


Figura 12. Aparato para medição da resistividade dos biomateriais. A, *Neurotube* comercial. B, NC. C, PCL.

TABELA 3. RESISTIVIDADE ELÉTRICA

Substrato	Resistividade
<i>Neurotube</i>	$5,24 \times 10^2 \Omega \cdot \text{cm}$
PCL	$0,31 \times 10^9 \Omega \cdot \text{cm}$
NC	$1,89 \times 10 \Omega \cdot \text{cm}$

OBTENÇÃO DE *hASC* - TESTE DE MULTIPONTENCIALIDADE

O processamento e isolamento das *hASC* a partir do lipoaspirado foi feito com sucesso e as células-tronco foram adquiridas e expandidas para o desenvolvimento do projeto. A figura 13 mostra *hASCs* em placa de cultura em franca expansão, apresentando a morfologia fibroblastóide típica de célula-tronco mesenquimal. A presença de células com aspecto fibroblastóides indica que as células isoladas são mesmo *hASC* (**Figura 13**).

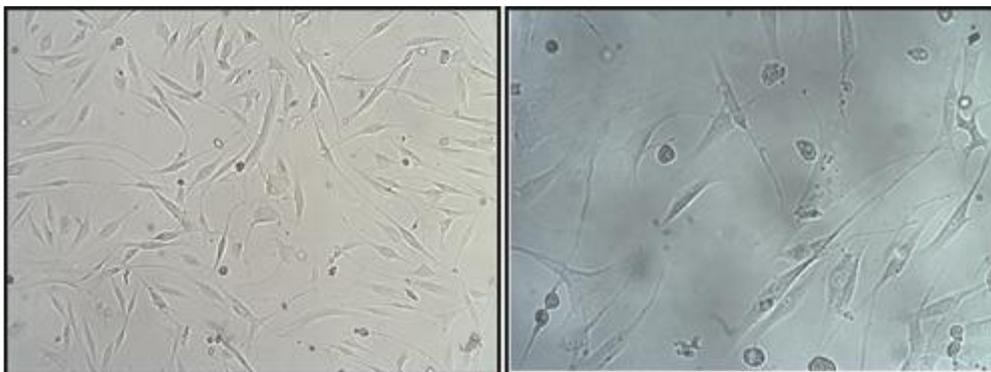


Figura 13. Cultura de *hASC* em 4 passagem. Células com aspecto fibroblastóide, alongada. Aumentos de 10x (painel da esquerda) e 20x (painel da direita).

Para confirmar se as células *hASC* isoladas são capazes de se diferenciar foram realizados experimentos de indução de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócito. Para prover essa caracterização das células isoladas de lipoaspirado, as mesmas foram induzidas por *kits* comerciais. Com estes kits foi possível diferenciar as células *hASC* adipócitos (Figura 14B), em osteoblasto (Figura 14D) e em condrócitos (Figura 14F). Além de expressar marcadores específicos na superfície celular, as células-tronco devem ser capazes de se diferenciar em vários tipos celulares. Com isso, foi comprovada a pluripotência da cultura obtida.

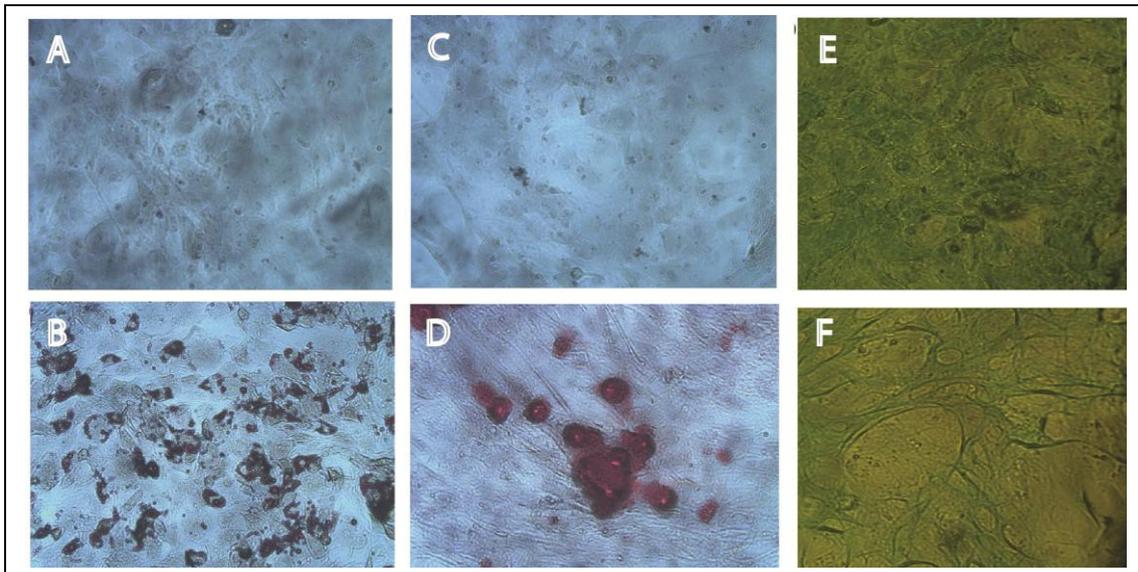


Figura 14. Diferenciação de células-tronco diferentes linhagens. Ensaio de Oil Red®. **A**, hASC controle e **B**, hASC diferenciadas em adipócito. Ensaio de Alizarin Red®, **C**, hASC controle e **D**, hASC diferenciadas em osteoblasto. Ensaio de Alcian Blue®, **E** hASC controle e **F** hASC condrócitos.

Esses resultados confirmam que as células isoladas, utilizadas na 5ª passagem são capazes de sofrer diferenciação para osteoblasto, condrócito e adipócito, confirmando sua multipotencialidade (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

As hASCs isoladas foram então caracterizadas por marcadores de superfície celular. As análises foram realizadas por citometria de fluxo. Os marcadores positivos utilizados foram CD13, CD73, CD90, CD105 e CD147, os marcadores negativos CD45, CD34, CD31, CD14, CD30 e STRO-1. Como esperado, as células apresentaram-se positivas para CD90, CD73, CD13, CD105 e negativas para os demais, STRO-1, CD30, CD31, CD34, e PCTH (**Figura 15**) (Zuk, Zhu et al. 2001, Zuk, Zhu et al. 2002, Sousa, Parreira et al. 2014) (**Tabela 4**). Assim, a caracterização das células-tronco foi efetiva.

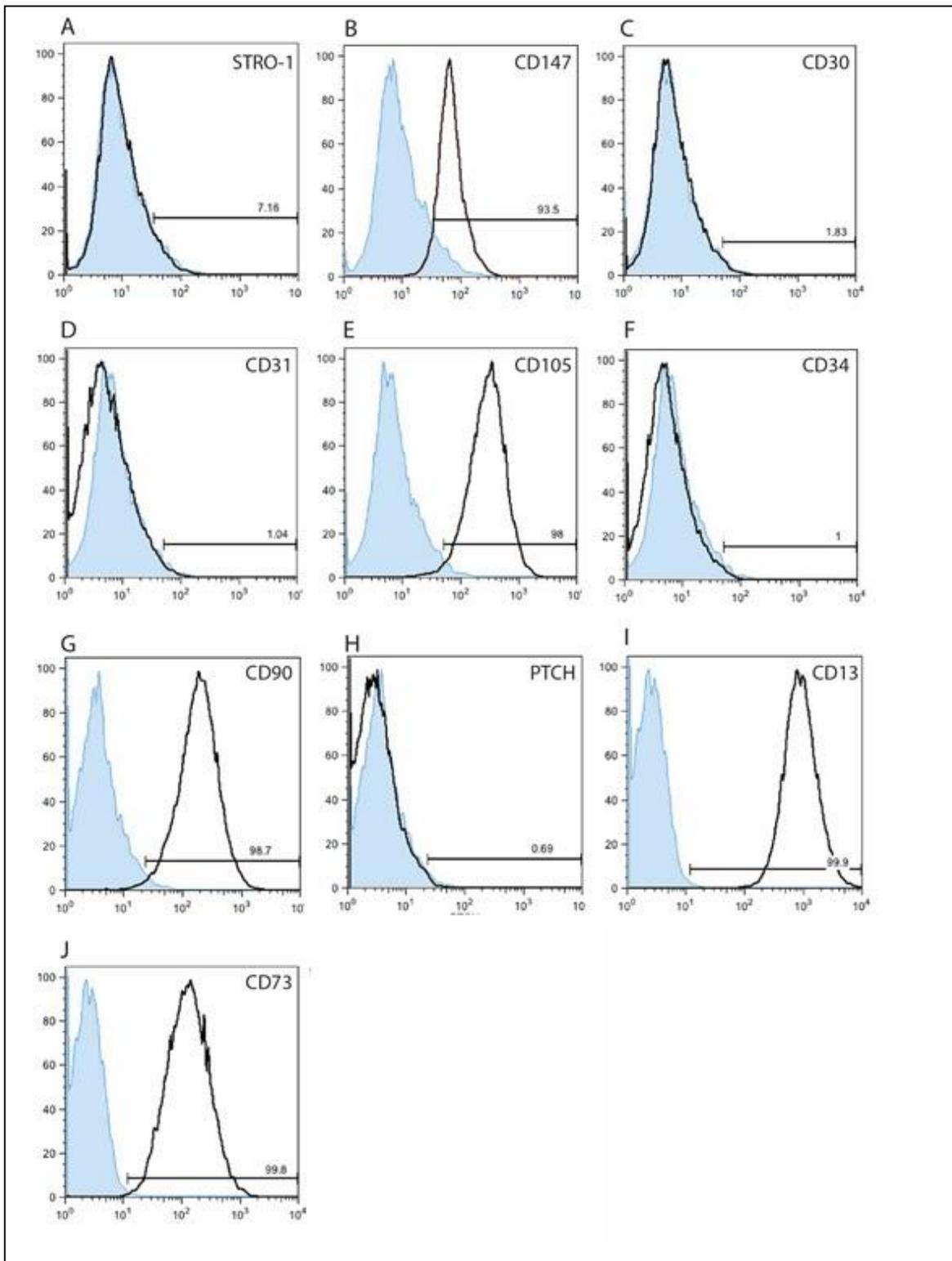


FIGURA 15. Análise fenotípica de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano através de citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de eventos versus intensidade de fluorescência. A curva azul é o controle negativo da fluorescência, a linha preta, apresenta a população de células avaliada para um marcador específico e o seu deslocamento para direita

indica a existência da marcação. A) Avaliação do marcador STRO-1; B) CD147; C) CD30; D) CD31; E) CD105; F) CD34; G) CD90; H) PTCH; I) CD13; J) CD73.

A Imunofenotipagem mostrou a presença dos marcadores de células-tronco mesenquimais (Zuk, Zhu et al. 2002, Sousa, Parreira et al. 2014) corroborando os testes de multipotencialidade supracitados.

TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE

Ensaio de Live/dead

A viabilidade celular das *hASC* cultivadas sobre a manta de PCL e o NC foram confirmadas com o ensaio de *Live/Dead*. A observação de fluorescência verde, decorrente da metabolização da calceína, indica que as células apresentaram viáveis e aderidas a ambos substratos (**Figura 16**). O aumento da confluência das células observados nos dias 3, 7 e 14 indica que houve um aumento da proliferação das células tanto no substrato de nanocompósito quanto na manta de PCL (**Figura 16**).

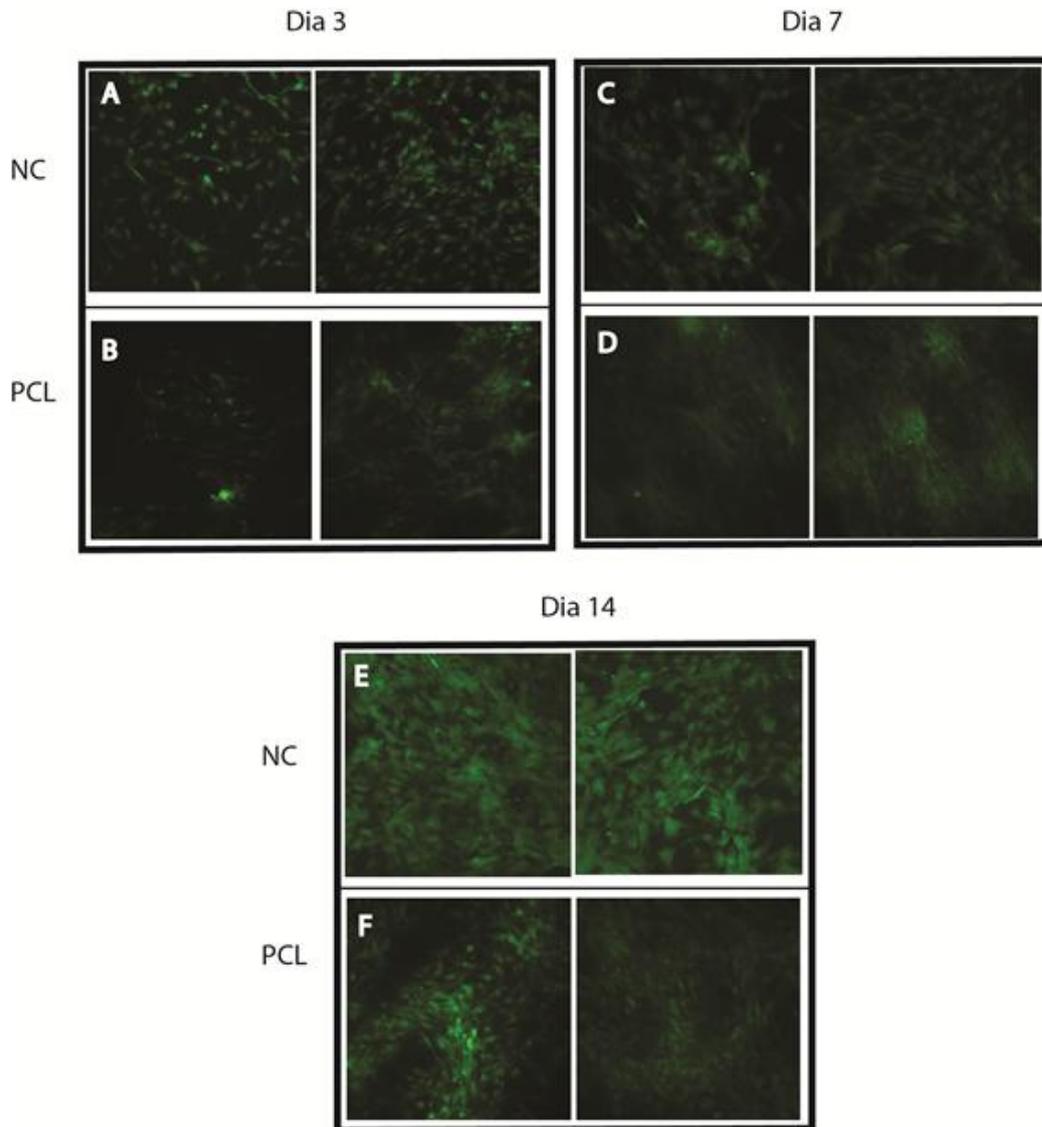


Figura 16. Viabilidade Celular. *hASC* cultivadas sobre PCL e NC apresentando fluorescência verde (calceína). **A, C e E** mostram células cultivadas sobre NC. **B, D e F**, células cultivadas sobre manta de PCL.

Avaliação Morfológica por MEV do Cultivo sobre os PCL e NC

Após 14 dias de cultivo em meio basal suplementado com 1% de soro fetal bovino, as células foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2.5% por 24h e processadas para microscopia eletrônica. A finalidade desse experimento era confirmar a morfologia das células *hASC* cultivadas. A figura 15 A e B mostram células com morfologia semelhante a células-tronco mesenquimais, com longos prolongamentos e bastante espalhada sobre as nanofibras de PCL. As figuras 17 C e D mostram a cultura de células sobre o

nanocompósito. Observa-se diferença na topologia e porosidades. Na figura 15 é possível notar a ocorrência de duas populações celulares morfologicamente distintas, após 14 dias de cultivo sobre o nanocompósito (Figura 17 A e B). As *hASCs* aparecem aderidas sobre a manta de PCL espalhando seus prolongamentos por entre as nanofibras do polímero (**Figura 17 C e D**).

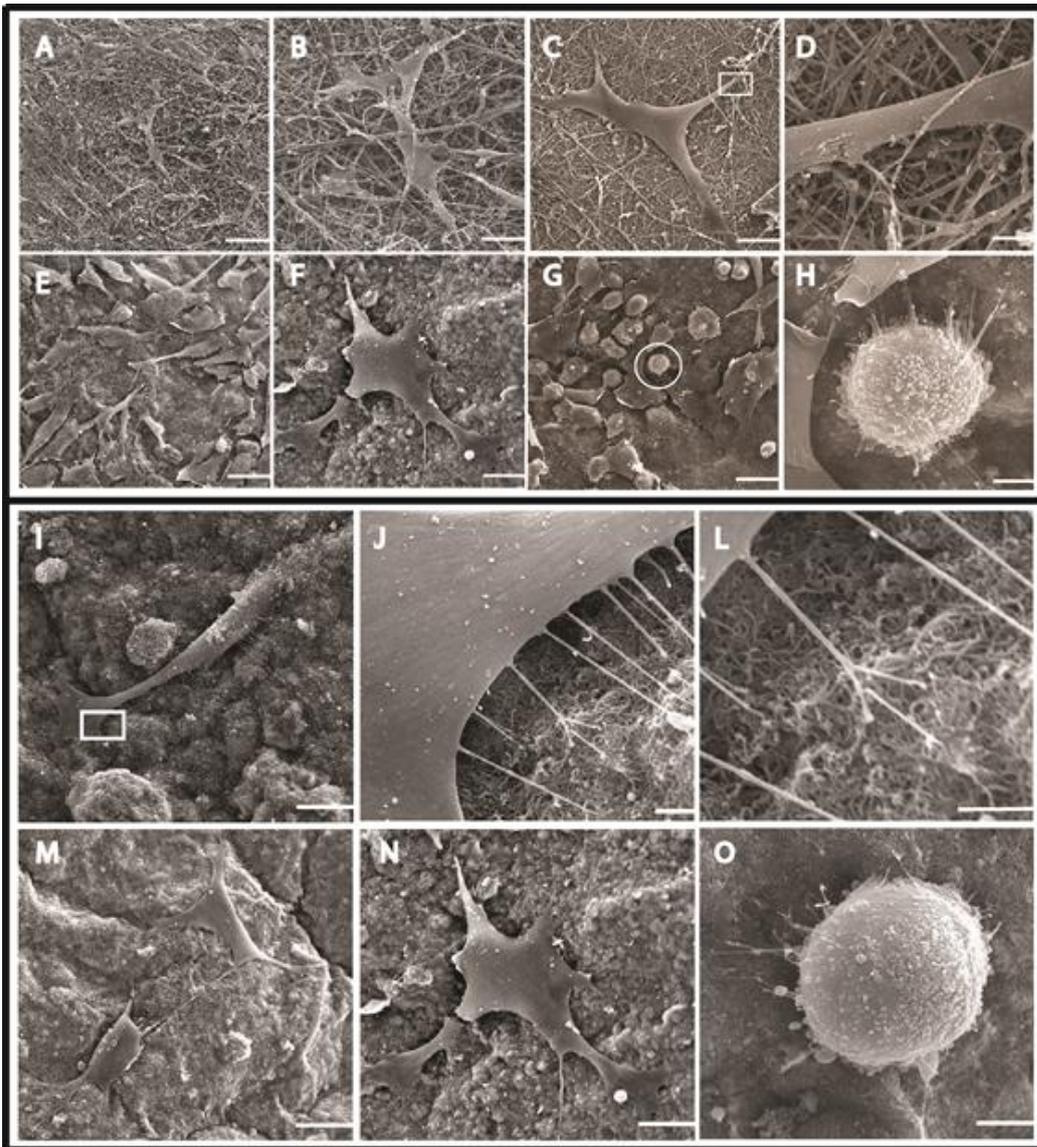


Figura 17: *hASC* cultivadas sobre nanocompósito e PCL. A, B, C e D, *hASC* aderidas em PCL. As demais figuras mostram células aderidas no NC. Em G, nota-se a ocorrência de duas populações celulares morfologicamente distintas. H, mostra em evidência área circulado em G, célula esférica diferindo morfologicamente de células-tronco mesequimais observadas sobre PCL. J e L, em evidência área destacada em I (retângulo), Note finos pseudópodos aderidos à superfície do nanocompósito em J (ampliado em L). Escala da barra, A, 125 μ m; B, 50 μ m; C,

30µm; D, 4µm; E, 70µm; F, 30µm; **G**, 50µm, H, 7.5 µm; I, 25µm; J, 3µm; L, 2µm; M, 54µm; N,30 µm; O, 7.5µm.

NEURODIFERENCIAÇÃO

Avaliação da Expressão de Neuromarcador por Imunofluorescência

A indução das células-tronco foi feita com 100 ng/mL de fator básico de crescimento de fibroblasto adicionado ao meio de cultivo, por 7 dias, após esse período, o meio foi substituído e enriquecido com 10µM de forskolina, por mais 7 dias, totalizando 14 dias de cultivo. Os resultados de imunofluorescência mostram expressão de GFAP nas células cultivadas sobre o nanocompósito (Figura 18C) em comparação ao controle e ao PCL (Figura 18B). Quando as células foram induzidas com forskolina, não se observou expressão das proteínas GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) e MAP2 (*Microtubule-Associated Protein-2*) após 14 dias de cultivo (**Figura 18**). O grupo cultivado sem indução, não apresentou qualquer expressão de GFAP (**Figura 18A**).

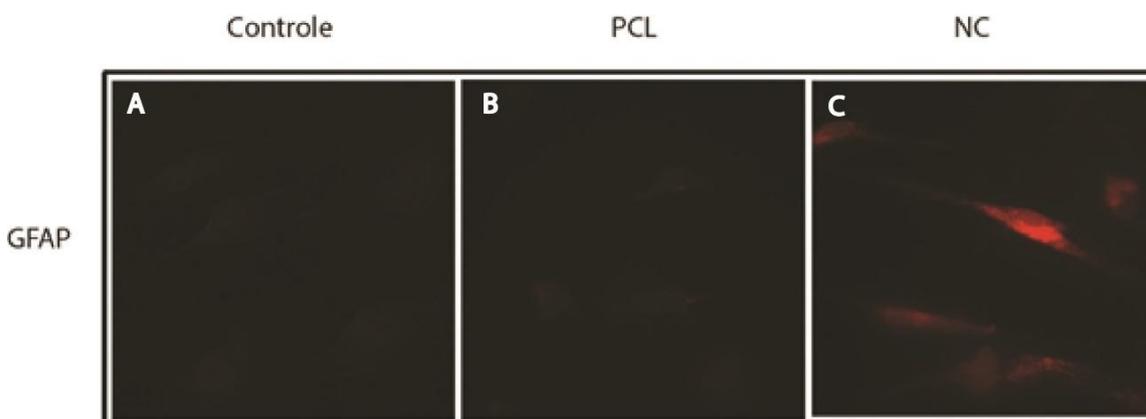


FIGURA 18. Imunofluorescência para Expressão de GFAP. A, Controle lamínula; B, PCL; C, NC. Após 7 dias de cultivo sob indução, *hASC* cultivadas sobre NC apresentou expressão de GFAP.

Registro eletrofisiológico – Patch Clamp

Para averiguar se as células cultivadas sobre NCs, induzidas ou não à neurodiferenciação, apresentavam potencial de ação semelhante às células nervosas, foi feito o experimento de eletrofisiologia. As correntes iônicas e o potencial de membrana foram registrados através da técnica do *patch clamp* em modo “*Whole cell*” usando o clampeamento de voltagem e corrente, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (20 a 25°C).

Foram testadas 5 células (capacitância média de 55 pF) sendo 2 células cultivadas sobre o NC não induzidas e 3 células cultivadas sobre o NC induzidas com *bFGF* e forskolina, à neurodiferenciação. Como pode ser visto na Figura 19, mesmo um estímulo elevado gerou apenas uma resposta passiva da membrana celular. Em todas as células testadas não foi observado a geração do potencial de ação frente a um estímulo despolarizante. Quando registradas as correntes iônicas dessas células, através clampeamento de voltagem, foi observada apenas uma corrente transiente, consistente com uma corrente de sódio, porém com uma baixa amplitude. A amplitude média das células testadas foi de $95,2 \pm 18,1$ pA, tendo uma densidade de corrente média de $1,72 \pm 0,32$ pA/pF.

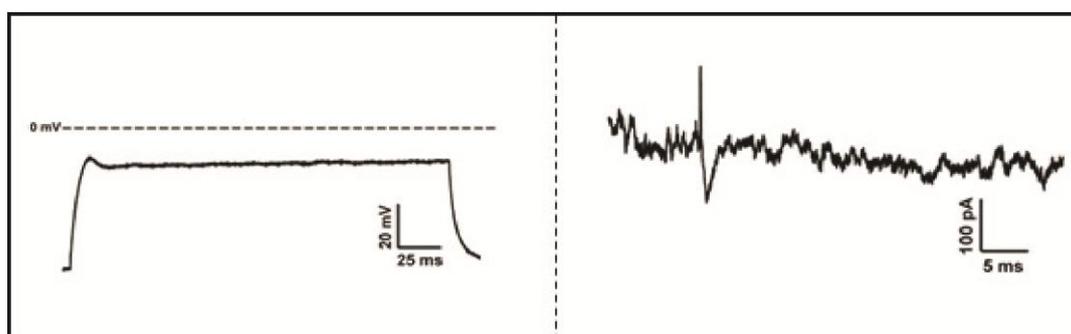


Figura 19. Potencial de membrana registrado nas células induzidas e não induzidas (à esquerda). Corrente gerada por despolarização na célula (à direita).

Esses resultados mostram que as células cultivadas sobre o NC, induzidas ou não à neuro-diferenciação por *bFGF* e forskolina, apresentaram mudança no potencial de ação. Esses resultados confirmam o de imunofluorescência mostrando que as células não foram capazes de apresentarem fenótipo neural.

DISCUSSÃO

Um *scaffold* ideal deve ter as seguintes características: (i) ser tridimensional e altamente poroso com uma rede interligada de poros para o crescimento celular e fluxo de transporte de nutrientes e resíduos metabólicos, (ii) biocompatível e bioabsorvível com uma degradação controlável e taxa de reabsorção de combinar o crescimento de células / tecido *in vitro* e / ou *in vivo*, (iii) a química de superfície adequada para a ligação de células, proliferação e diferenciação e (iv) as propriedades mecânicas para corresponder às dos tecidos no local do implante (Hutmacher 2000).

Os testes *in vitro*, são a principal etapa para o desenvolvimento desses biomateriais, antecedidos pelas caracterizações físico-químicas. Em nosso trabalho, objetivou-se o desenvolvimento de um nanocompósito a partir de poli(caprolactona) enriquecido com deposição de nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

Os NTCs já foram usados em diversos trabalhos científicos como substrato para cultivo celular e diferenciação neuronal de células, tanto progenitoras neuronais quanto, células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (McKenzie, Waid et al. 2004, Tran, Zhang et al. 2009).

O PCL, por sua vez, é um biomaterial liberado para uso clínico, com vários trabalhos atestando suas propriedades físicas, químicas e biológicas, favoráveis ao cultivo de células e *scaffolds* para regeneração tecidual (Gunatillake and Adhikari 2003).

As mantas de PCL desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos da UFMG, pelo método de *electrospinning*, apresentaram microfibras de espessuras variadas, entre 200nm a 2µm, com alto grau de emaranhamento e porosidade. A espessura da manta de PCL usada no trabalho foi de aproximadamente 250 a 300µm, como observado na figura 8. Membranas de PCL de 700µm e 1mm já foram usadas para cultivo de condrócitos e CsT, respectivamente, e sustentarem proliferação das células com sucesso (Li, Danielson et al. 2003, Li, Tuli et al. 2005).

Trabalhos mostram uma relação positiva entre a menor espessura do biomaterial e a resposta celular, *in vitro*. Fibroblastos cultivados em membrana ultrafina de PCL, 5 μ m, tiveram melhor resposta que em membranas de 30 μ m. Substrato de tereftalato de polietileno (PET), de espessura ~1mm, foi usado para cultivo e neurodiferenciação de células-tronco embrionárias de camundongo. As nanofibras do polímero foram recobertas por *MWCNT*, o que conferiu melhor adesão e resposta celular (Zang and Yang 2013).

Vale ressaltar que a matriz extracelular apresenta-se rica em colágeno e laminina, proteínas essas com, aproximadamente, 60nm de espessura. Esta última é a molécula chave para o tecido neural (Ayad, Boot-Handford et al. 1998). Ao nível das membranas basais observa-se que a sua composição incluir poços, poros, saliências, estrias, partículas e fibras. Estas estruturas são de dimensões nanométricas (5-200nm), as quais podem m afectar mimetizar melhor a MEC capaz de assim afetar o comportamento das células do micro-relevo (Flemming, Murphy et al. 1999). Assim, as células, não só as neurais, são naturalmente acostumadas a interagir com as superfícies com um grande grau de rugosidade nanométrica. Isso contrasta com as superfícies fornecidas por implantes tradicionais, que têm fibras em dimensões micrométricas ou tamanhos que fornecem topografias não similares às biológicas.

O enriquecimento do substrato de PCL com deposição de *MWCNTs*, que apresenta diâmetros de até 100nm, mostra-se como uma excelente alternativa de tornar esse substrato mais próximo da dimensão da MEC.

Os NTCs utilizados nesse trabalho foram sintetizados por CVD produzidos pelo o Grupo de Nanomateriais do departamento de Física da UFMG. Os NCTs apresentam como característica principal a presença de espécies de ferro metálico e óxido de ferro, inseridas nas cavidades dos tubos. Esses NTCs foram submetidos a dois tratamentos oxidativos diferentes, utilizando-se uma mistura de HNO₃/H₂SO₄. O processo ideal de purificação tem como objetivo a eliminação de outras formas de carbono e resíduos metálicos, sem afetar, significativamente, as propriedades das paredes dos NTCs (como estrutura eletrônica). Esse tipo de tratamento visa a obtenção de dispersões adequadas permitindo a formação de nanocompósitos mais homogêneos.

Nanotubos de carbono podem ser funcionalizados com diferentes grupos funcionais a fim de torna-lo solúvel em água além de melhorar as propriedades de biocompatibilidade, como adesão e proliferação celular (Ilie, Ilie et al. 2012). Esse tratamento oxidativo utilizados neste trabalho é capaz de funcionalizar os NCTs com grupos hidroxilas e carboxilas, deixando os NCTs hidrofílicos (**Figura 7E**).

O nanocompósito desenvolvido por nosso grupo, através da deposição de NCTs sobre a membrana de PCL, apresentou um emaranhado de fibras de carbono, com reduzida porosidade, em comparação com a manta de PCL originalmente produzida (**Figura 8**). O substrato formado pelo NCTs tem maior área superficial e apresentou enorme redução da resistividade elétrica, $1,89 \times 10 \Omega \cdot \text{cm}$, em comparação com a manta de PCL e o nanotubo comercial (**Tabela 3**). Aproximadamente 10% da massa do nanocompósito é formada por NCTs.

Trabalhos mostram a drástica diminuição da resistividade em polímeros conjugados a nanotubos de carbono. Webster e grupo produziram um compósito de poliuretano e NCTs que apresentou $625 \Omega \cdot \text{cm}$ com a mesma porcentagem de NCT (10%) (McKenzie, Waid et al. 2004, Thomas, Michael et al. 2004). McCullen e colaboradores demonstraram que o nanocompósito produzido por eles, apresentou aumento na condutividade elétrica, alcançando um platô a partir de, aproximadamente 0,4 % de NCTs em função da saturação do grau de percolação que ocorre nessa faixa (McCullen, Stevens et al. 2007).

Estudos mostram haver uma positiva relação entre a propriedade elétrica do substrato para cultivo celular (Supronowicz, Ajayan et al. 2002, Lovat, Pantarotto et al. 2005, Kam, Jan et al. 2008). Além de mudar a propriedade elétrica do polímero, os NCTs promovem mudanças na superfície de energia, o que também melhora a adesão e resposta celular (McKenzie, Waid et al. 2004, Zang and Yang 2013).

O ensaio de Termogravimetria mostrou a perda de massa do polímero a 392°C e 1% de queima a 76°C (**Figura 9**), referente a resquício de solventes usados na síntese. Esse perfil mostra quantidade muito baixa de contaminantes no NC. Dado confirmado pela espectroscopia Raman, que

apresentou picos característicos do *MWCNT* (DiLeo, Landi et al. 2007), não identificando outros contaminantes na amostra de NC (**Figura 11**). O FTIR mostra os picos característicos de poli(caprolactona) (Elzein, Nasser-Eddine et al. 2004) (**Figura 10**) aferindo também a propriedade e pureza do polímero.

As *hASC* obtidas a partir de lipoaspirado foram processadas e seguiu-se o isolamento das células-tronco, segundo descrito por Zuk *et. al.*, (Zuk, Zhu et al. 2001, Zuk, Zhu et al. 2002) (**Figura 13**). Conforme mostrado, as células isoladas, utilizadas na 5^o passagem, foram capazes de sofrer diferenciação para osteoblasto, condrócito e adipócito (**Figura 14**), confirmando sua multipotencialidade (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

A Imunofenotipagem mostrou a presença dos marcadores de células-tronco mesenquimais (**Figura 15**). As *hASC* mostram-se uma excelente opção para várias terapias em função da fácil obtenção, abundância e capacidade de diferenciação (Sousa, Parreira et al. 2014).

Uma vez confirmada o fenótipo das *hASC*, foi atestada a biocompatibilidade do nanocompósito. Pelo ensaio de *Live/Dead*, foi demonstrado que as células responderam bem ao cultivo sobre o NC. As células apresentaram boa proliferação como observado pelas imagens de microscopia de fluorescência nos dias 3, 7 e 14 de cultivo (**Figura 16**).

Não se constatou morte celular em nenhum período. Esse dado corrobora com diversos trabalhos que demonstram que os NCTs funcionalizados usados como substratos para cultivo de células não apresentam citotoxicidade (2000, 2005, Mooney, Dockery et al. 2008, Chen and Hsiue 2013).

A abordagem de usar NCTs como substrato ganhou maior adesão desde que se mostrou a migração de neurônios para regiões onde havia *clusters* de NCTs em placa de cultura, demonstrando assim a preferência das células pela substrato de NCT (Gabay, Jakobs et al. 2005).

Com a deposição de NCT sobre a nanofibra de PCL, há aumento da área superficial e da energia de superfície, culminando em uma melhor adsorção de proteínas e adesão celular, (Woo, Chen et al. 2003, Zhao, Schwartz et al. 2005, Terada, Abe et al. 2009, Zang and Yang 2013), além de conferir um caráter hidrofílico ao biomaterial pela presença dos grupos

funcionais ligados ao NTC conseguidos pela funcionalização pelo processo de acidificação/oxidação (Osswald, Havel et al. 2007).

Através da avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar, além da morfologia, a adesão celular sobre os dois substratos (PCL e NC) (**Figura 17**). Observa-se a presença de células achatadas com espalhamento de seus prolongamentos por entre as nanofibras de PCL (**Figura 17A - D**).

Interessante resultado foi observado na cultura celular sobre o NC. É possível notar duas populações de células, morfológicamente distintas (**Figura 17G, H, O**). Ambas populações de células sobre o NC apresentam grande número de diminutas filopodias aderidos aos NTCs com diâmetro de semelhante aos nanotubos. Essa intensa projeção de diminutos pseudópodes também foi observada em outros trabalhos (Zang and Yang 2013).

Estudos recentes têm mostrado que as células-tronco mesenquimais tem sua função definida pela sua forma, com alterações na adesão celular e posterior tensão do citoesqueleto modulando linhagem (Engler, Sen et al. , McBeath, Pirone et al.). Há evidências demonstrando a importância da tensão intracelular em *MSCs* com um estado de alta tensão induzindo diferenciação (McBeath, Pirone et al. , Kilian, Bugarija et al. 2010). Avanços recentes são indicativos da exigência de um nível intermediário de tensão celular para auto-renovação de *MSC* (Gilbert, Havenstrite et al. 2010, McMurray, Gadegaard et al. 2011). Os mecanismos pelos quais os sinais nanotopográficos influenciam a proliferação e diferenciação das *SC* não são muito bem compreendidos, mas parece envolver alterações na organização e estrutura do citoesqueleto , potencialmente, em resposta à geometria e tamanho dos elementos subjacentes da ECM (Guilak, Cohen et al.). Ou seja, alterações na dimensão característica do substrato pode influenciar o agrupamento das integrinas e outras moléculas de adesão de células, alterando, assim, o número e distribuição de adesão focal (*FAs* – do inglês *Focal Adhesion*) podendo, por conseguinte, controlar a adesão e disseminação de células (Pelham and Wang 1997). Ao que parece, o comportamento celular pode ser controlado por mecanismos modulados pelo substrato (Lo, Wang et al. , Silver, Siperko et al. 2003, Yeung, Georges et al. 2005, Karamichos, Brown et al. 2006, Dado and Levenberg 2009) por dois diferentes, mas simultâneos, mecanismos de vias de

sinalização, produzidos através da interação das células com a matriz extracelular. Um primeiro está relacionado com ligante de receptor de sinalização da MEC mediado por integrinas de ligação RGD (arginina–glicina–aspartato), denominado a sinalização induzida por ligadura dependente de superfície química da MEC, e o outro, a sinalização é ativada por tração, que depende de estímulos mecânicos transmitidos através da MEC. A importância da mecânica matricial no comportamento celular individual e função semelhante a sinais bioquímicos foi também estudado. Especificamente, os sinais mecânicos, tais como a pressão, o fluxo de fluido, a tensão de cisalhamento, tensão, e rigidez são importantes reguladores do desenvolvimento embrionário e tem sido demonstrado que afetam o desenvolvimento e padronização de tecidos de muitos órgãos. O mesmo tipo de célula pode induzir a resposta diferentes dependendo da topografia da superfície. Isto tem implicações importantes para a utilização de scaffolds como um controlador auto-suficiente da função das células (Yim, Reano et al. 2005, Nur-E-Kamal, Ahmed et al. 2006, Gerecht, Bettinger et al. 2007).

Em nosso trabalho, após 7 dias sob indução neuronal, as *hASCs* foram avaliadas quanto a expressão das proteínas GFAP, MAP2 e Tuj-1, a primeira é uma proteína do filamento intermediário (IF) de astroglia que pertence à subclasse do tipo III das proteínas do IF (Inagaki, Imakamura et al. 1994). A segunda é expressa em neurônios maduros. Essa proteína estabiliza os microtubulos em dendritos em neurônios pós-mitótico (Cassimeris and Spittle 2001, Akihiro, Junlin et al. 2002). A terceira, Tuj-1 (β -tubulina III), é também uma proteína estrutural expressa tanto no Sistema Nervoso Central quanto no Periférico, e contribui para a estabilidade do corpo neuronal e dos axônios (Reubinoff, Itsykson et al. 2001, Zhang, Wernig et al. 2001).

A expressão de GFAP está relacionada ao início do processo de neurodiferenciação sendo fortemente expressa na periferia de neuroesferas, indicando que a maioria das células que migram pode ser astrócitos (McKay 1997). Cultura aderida de ASC (Radtke, Schmitz et al. 2009) e neuroesferas derivadas de ASC, induzidas à neurodiferenciação, apresentam a expressão de GFAP (Kingham, Kalbermatten et al. 2007).

Por imunofluorescência, foi possível observar expressão de GFAP ao 7º dia de cultivo, sob indução de *bFGF* nas células cultivadas sobre NC (**Figura**

18). Não foi observada expressão de MAP-2, nem no 14º dia de cultivo. Nas *hASC* cultivadas sem indução, também não se observou expressão de GFAP. Para nenhum grupo foi detectada expressão de Tuj-1.

No ensaio de eletrofisiologia, nenhum grupo de células cultivadas sobre NC, induzidas ou não à neurodiferenciação por *bFGF* e Forskolina, apresentaram mudança no potencial de ação (**Figura 19**).

Neste ponto nossos experimentos diferem da literatura. Trabalhos usando *bFGF* e Forskolina mostraram diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (Jang, Cho et al. 2010). Outros tantos trabalhos demonstraram fenótipo neuronal de *MSC* cultivadas sobre substrato de nanotubos de carbono, alinhados ou randômicos (Tay, Gu et al. 2010, Mahairaki, Lim et al. 2011, Ilie, Ilie et al. 2012, Kim, Jang et al. 2012, Chen and Hsiue 2013).

Entretanto, as culturas de células-tronco usadas para este tipo de experimento, acumulam não mais que 7 passagens (Jang, Cho et al. 2010). Em outros trabalhos, foram usadas células-tronco embrionárias, que detêm maior capacidade de diferenciação.

Normalmente, experimentos de diferenciação de células-tronco são feitos usando-se células, preferencialmente, a partir da 2º e até 5º passagem (Safford, Hicok et al. 2002, Tay, Gu et al. 2010, Kim, Jang et al. 2012).

É sabido que as células-tronco perdem a capacidade de diferenciação a medida que aumenta o número de passagem. Além disso, as diferentes fontes de células-tronco no organismo abrigam um mosaico particular de células multipotentes e precursoras de linhagens do tecido de origem, apresentando subpopulações de *MSC* em diferentes estágios de diferenciação (Sousa, Parreira et al. 2014). A homogeneidade da população é dependente do tecido de origem, método de isolamento e números de passagens (Sousa, Parreira et al. 2014).

Assim, nossos resultados podem ser decorrentes da perda de capacidade das *hASC* que utilizadas na 9º passagem. Tondreau e grupo mostram que *MSC* expressam, constitutivamente, baixos níveis de proteínas específicas de células nervosas. Isso também pode justificar a não expressão dos marcadores Tuj-1, GFAP e MAP-2. Essas proteínas foram observadas em níveis muito baixos expressas em células até a 5º passagem (Tondreau,

Lagneaux et al. 2004). Apenas GFAP foi observada nas células induzidas cultivadas sobre NC. Talvez o efeito positivo do NCT sobre a expressão dessa proteína, somado ao estímulo biológico do indutor (*bFGF*) tenha sido capaz de promover essa expressão. Mas o mesmo resultado não foi possível com a forskolina, que não foi capaz de suportar a ativação da expressão de MAP-2 e alcançar o fenótipo neuronal esperado.

Nossos protocolos para indução neuronal de células-troncos foram baseados em trabalhos que usaram altas passagens e obtiveram os resultados esperados (Hermann, Gastl et al. 2004, Huang, He et al. 2007). Em função da pouca disponibilidade de células e a necessidade de alta quantidade dessas, nossas populações de células foram expandidas até a 9^o passagem para obtermos quantidade suficiente para os experimentos. Entretanto, o protocolo usado por esses autores foi o método de formação de neuroesferas e um coquetel de neuroindução diferente do nosso, além da fonte de células-tronco ter sido medula óssea ou embrionária.

CONCLUSÃO

O nanocompósito feito a partir de nanofibras de poli(caprolactona) eletrofiadas associadas à nanotubos de carbono de paredes múltiplas apresentou excelente biocompatibilidade para cultivo e proliferação de cultura primária de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo – *hASC*. Apesar de não conseguirmos células diferenciadas com potencial de ação característico de célula neuronal, a presença do marcador GFAP nas células *hASC* cultivadas sobre o nanocompósito e induzidas com *bFGF* indicam que este biomaterial pode ser utilizado para estudos que avaliem a diferenciação celular e promovam avanços na terapia de regeneração de tecido nervoso e aplicações como neurotubos para regeneração de nervo periférico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Padronizar o nanocompósito com menor quantidade de nanotubos de carbono que seja capaz de preservar a característica elétrica do NC e da resposta celular observada.
2. Produzir nanocompósito com fibras alinhadas e nanocompósito com sulcos alinhados por litografia.
3. Averiguar se há neurodiferenciação, espontânea e ou aumento da eficiência da neurodiferenciação química e biologicamente induzida, de células-tronco adultas cultivadas sobre o NC em passagens menores.
4. Cultivar as *hASC* por longo período de tempo e avaliar a resposta biológica e degradação do nanocompósito.
5. Proceder ensaio de caracterização mecânica do neurotubo produzido
6. Desenvolver um neurotubo com o NC para testes *in vivo* de regeneração de nervo periférico.
7. Publicar um artigo sobre o desenvolvimento do NC para cultivo diferenciação neuronal de *hASC*.

BIBLIOGRAFIA

Ahn, Y. C., S. K. Park, G. T. Kim, Y. J. Hwang, C. G. Lee, H. S. Shin and J. K. Lee (2006). "Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers." Current Applied Physics **6**(6): 1030-1035.

Akihiro, H., T. Junlin, T. Yosuke, O. Keiko and H. Nobutaka (2002). "MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction." J Cell Biol **158**(3): 541-549.

Ang, L. P. K., Z. Y. Cheng, R. W. Beuerman, S. H. Teoh, X. Zhu and D. T. H. Tan (2006). "The Development of a Serum-Free Derived Bioengineered Conjunctival Epithelial Equivalent Using an Ultrathin Poly(ϵ -Caprolactone) Membrane Substrate." Investigative Ophthalmology & Visual Science **47**(1): 105-112.

Anghileri, E., S. Marconi, A. Pignatelli, P. Cifelli, M. Galie, A. Sbarbati, M. Krampera, O. Belluzzi and B. Bonetti (2008). "Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **17**(5): 909 - 916.

Anton, N. S., P. Santosh, P. H. Kapila, W. C. Robert and G. U. Sumanasekera (2008). "Side-by-side comparison of Raman spectra of anchored and suspended carbon nanomaterials." Nanotechnology **19**(19): 195708.

Ayad, S., R. Boot-Handford, M. J. Humphries, K. E. Kadler and A. Shuttleworth (1998). 43 - Laminins. The Extracellular Matrix FactsBook (Second Edition). S. Ayad, R. Boot-Handford, M. J. Humphries, K. E. Kadler and A. Shuttleworth. San Diego, Academic Press: 160-177.

Azizi, S. A., D. Stokes, B. J. Augelli, C. DiGirolamo and D. J. Prockop (1998). "Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte grafts." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3908-3913.

Becker, A. J., C. E. Mc and J. E. Till (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." Nature **197**: 452-454.

Bezaniilla, F. and C. M. Armstrong (1977). "Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments." J Gen Physiol **70**(5): 549-566.

Black, I. B. and D. Woodbury (2001). "Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons." Blood Cells Molecules and Diseases **27**(3): 632-636.

Bosman, F. T. and I. Stamenkovic (2003). "Functional structure and composition of the extracellular matrix." The Journal of Pathology **200**(4): 423-428.

Bujia, J. (1994). "Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates: determination of functional and phenotypic cell characteristic by in situ hybridization." Transplant International **7**: 681-681.

Cai, Y., J. Li, C. K. Poh, H. C. Tan, E. San Thian, J. Y. Hsi Fuh, J. Sun, B. Y. Tay and W. Wang (2013). "Collagen grafted 3D polycaprolactone scaffolds for enhanced cartilage regeneration." Journal of Materials Chemistry B **1**(43): 5971-5976.

California Surgical Institute. Liposuction Used to Extract Stem Cells. (July, 2013). Disponível em: <http://californiasurgicalinstituteblog.com/liposuction-used-to-extract-stem-cells.html>

Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg and D. T. Scadden (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-846.

Cassimeris, L. and C. Spittle (2001). "Regulation of microtubule-associated proteins." Int Rev Cytol **210**: 163-226.

Chen, Y. S. and G. H. Hsiue (2013). "Directing neural differentiation of mesenchymal stem cells by carboxylated multiwalled carbon nanotubes." Biomaterials **34**(21): 4936-4944.

Chiono, V., C. Tonda-Turo and G. Ciardelli (2009). Chapter 9 Artificial Scaffolds for Peripheral Nerve Reconstruction. International Review of Neurobiology. G. Stefano, T. Pierluigi and B. Bruno, Academic Press. **Volume 87**: 173-198.

Clarke, M. F., J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. M. Jamieson, D. L. Jones, J. Visvader, I. L. Weissman and G. M. Wahl (2006). "Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells." Cancer Research **66**(19): 9339-9344.

d'Aquino, R., A. De Rosa, V. Lanza, V. Tirino, L. Laino, A. Graziano, V. Desiderio, G. Laino and G. Papaccio (2009). "Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes." Eur Cell Mater **18**: 75-83.

Dado, D. and S. Levenberg (2009). "Cell–scaffold mechanical interplay within engineered tissue." Seminars in Cell & Developmental Biology **20**(6): 656-664.

Dai, N. T., M. R. Williamson, N. Khammo, E. F. Adams and A. G. A. Coombes (2004). "Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin." Biomaterials **25**(18): 4263-4271.

Dalby, M. J., N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. Wilkinson and R. O. Oreffo (2007). "The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder." Nat Mater **6**(12): 997-1003.

Datsyuk, V., M. Kalyva, K. Papagelis, J. Parthenios, D. Tasis, A. Siokou, I. Kallitsis and C. Galiotis (2008). "Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes." Carbon **46**(6): 833-840.

- Dennis, J. E., A. Merriam, A. Awadallah, J. U. Yoo, B. Johnstone and A. I. Caplan (1999). "A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse." Journal of Bone and Mineral Research **14**(5): 700-709.
- DiLeo, R. A., B. J. Landi and R. P. Raffaele (2007). "Purity assessment of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy." Journal of Applied Physics **101**(6): -.
- Ding, L., T. L. Saunders, G. Enikolopov and S. J. Morrison (2012). "Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells." Nature **481**(7382): 457-462.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Doshi, J. and D. H. Reneker (1995). "Electrospinning process and applications of electrospun fibers." Journal of Electrostatics **35**(2-3): 151-160.
- Dresselhaus, M. S., G. Dresselhaus and A. Jorio (2004). "UNUSUAL PROPERTIES AND STRUCTURE OF CARBON NANOTUBES." Annual Review of Materials Research **34**(1): 247-278.
- Dutta, R. C. and A. K. Dutta (2009). "Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications." Biotechnol Adv **27**(4): 334-339.
- Elzein, T., M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac and P. Dumas (2004). "FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces." J Colloid Interface Sci **273**(2): 381-387.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." Cell **126**(4): 677-689.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu and F. Mavilio (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." Science **279**(5356): 1528-1530.
- Flemming, R. G., C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman and P. F. Nealey (1999). "Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior." Biomaterials **20**(6): 573-588.
- Frattini, F., F. R. Lopes, F. M. Almeida, R. F. Rodrigues, L. C. Boldrini, M. A. Tomaz, A. F. Baptista, P. A. Melo and A. M. Martinez (2012). "Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit promote sciatic nerve regeneration and sensory neuron survival after nerve injury." Tissue Eng Part A **18**(19-20): 2030-2039.
- Friedens.Aj, Piatetzki and Petrakov.Kv (1966). "Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells." Journal of Embryology and Experimental Morphology **16**: 381-&.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan and K. S. Lalykina (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk and I. V. Keiliss-Borok (1974). "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the

hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." Transplantation **17**(4): 331-340.

Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja and N. N. Kulagina (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-274.

Fujimura, J., R. Ogawa, H. Mizuno, Y. Fukunaga and H. Suzuki (2005). "Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice." Biochem Biophys Res Commun **333**(1): 116 - 121.

Gabay, T., E. Jakobs, E. Ben-Jacob and Y. Hanein (2005). "Engineered self-organization of neural networks using carbon nanotube clusters." Physica A: Statistical Mechanics and its Applications **350**(2-4): 611-621.

Gerecht, S., C. J. Bettinger, Z. Zhang, J. T. Borenstein, G. Vunjak-Novakovic and R. Langer (2007). "The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells." Biomaterials **28**(28): 4068-4077.

Gilbert, P. M., K. L. Havenstrite, K. E. Magnusson, A. Sacco, N. A. Leonardi, P. Kraft, N. K. Nguyen, S. Thrun, M. P. Lutolf and H. M. Blau (2010). "Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture." Science **329**(5995): 1078-1081.

Gimble, J. M., A. J. Katz and B. A. Bunnell (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-1260.

Guilak, F., D. M. Cohen, B. T. Estes, J. M. Gimble, W. Liedtke and C. S. Chen "Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix." Cell Stem Cell **5**(1): 17-26.

Gunatillake, P. A. and R. Adhikari (2003). "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering." Eur Cell Mater **5**: 1-16; discussion 16.

Hench, L. L. (1998). "Biomaterials: a forecast for the future." Biomaterials **19**(16): 1419-1423.

Hermann, A., R. Gastl, S. Liebau, M. O. Popa, J. Fiedler, B. O. Boehm, M. Maisel, H. Lerche, J.

Schwarz, R. Brenner and A. Storch (2004). "Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4411-4422.

Harada, Akihiro; Teng, Junlin; Hirokawa, Nobutaka. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. J Cell Biol. Aug 5, 2002; **158**(3): 541-549.

Huang, T., D. He, G. Kleiner and J. Kuluz (2007). "Neuron-like differentiation of adipose-derived stem cells from infant piglets in vitro." J Spinal Cord Med **30 Suppl 1**: S35-40.

Huang, Z.-M., Y. Z. Zhang, M. Kotaki and S. Ramakrishna (2003). "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites." Composites Science and Technology **63**(15): 2223-2253.

Hutmacher, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage." Biomaterials **21**(24): 2529-2543.

Hu, Hui; Ni, Yingchun; Mandal, Swadhin K.; Montana, Vedrana; Zhao, Bin; Haddon, Robert C.; Parpura, Haddon Vladimir. Polyethyleneimine Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes as a Substrate for Neuronal Growth. (2005). *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109* (10), pp 4285–4289.

Hutmacher, D. W., T. Schantz, I. Zein, K. W. Ng, S. H. Teoh and K. C. Tan (2001). "Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling." Journal of Biomedical Materials Research **55**(2): 203-216.

Ilie, I., R. Ilie, T. Mocan, D. Bartos and L. Mocan (2012). "Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface." Int J Nanomedicine **7**: 2211-2225.

Iijima, Sumio. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56 – 58.

Inagaki, M., Y. Imakamura, M. Takeda, T. Nishimura and N. Inagaki (1994). "Glial Fibrillary Acidic Protein: Dynamic Property and Regulation by Phosphorylation." Brain Pathology **4**(3): 239-243.

Jang, S., H.-H. Cho, Y.-B. Cho, J.-S. Park and H.-S. Jeong (2010). "Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin." BMC Cell Biology **11**(1): 25.

Kam, N. W. S., E. Jan and N. A. Kotov (2008). "Electrical Stimulation of Neural Stem Cells Mediated by Humanized Carbon Nanotube Composite Made with Extracellular Matrix Protein." Nano Lett **9**(1): 273-278.

Karamichos, D., R. A. Brown and V. Mudera (2006). "Complex dependence of substrate stiffness and serum concentration on cell-force generation." Journal of Biomedical Materials Research Part A **78A**(2): 407-415.

Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst and S. J. Morrison (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.

Kilian, K. A., B. Bugarija, B. T. Lahn and M. Mrksich (2010). "Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(11): 4872-4877.

Kim, J. A., E. Y. Jang, T. J. Kang, S. Yoon, R. Ovalle-Robles, W. J. Rhee, T. Kim, R. H. Baughman, Y. H. Kim and T. H. Park (2012). "Regulation of morphogenesis and neural differentiation of human mesenchymal stem cells using carbon nanotube sheets." Integr Biol (Camb) **4**(6): 587-594.

Kingham, P., D. Kalbermatten, D. Mahay, S. Armstrong, M. Wiberg and G. Terenghi (2007). "Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro." Exp Neurol **207**(2): 267 - 274.

Konno, M., A. Hamabe, S. Hasegawa, H. Ogawa, T. Fukusumi, S. Nishikawa, K. Ohta, Y. Kano, M. Ozaki, Y. Noguchi, D. Sakai, T. Kudoh, K. Kawamoto, H. Eguchi, T. Satoh,

M. Tanemura, H. Nagano, Y. Doki, M. Mori and H. Ishii (2013). "Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine." Dev Growth Differ.

Kronenthal, R. (1975). Biodegradable Polymers in Medicine and Surgery. Polymers in Medicine and Surgery. R. Kronenthal, Z. Oser and E. Martin, Springer US. **8**: 119-137.

Ku, S. H. and C. B. Park (2010). "Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering." Biomaterials **31**(36): 9431-9437.

Kweon, H., M. K. Yoo, I. K. Park, T. H. Kim, H. C. Lee, H.-S. Lee, J.-S. Oh, T. Akaike and C.-S. Cho (2003). "A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering." Biomaterials **24**(5): 801-808.

Lee, K. D., T. K. Kuo, J. Whang-Peng, Y. F. Chung, C. T. Lin, S. H. Chou, J. R. Chen, Y. P. Chen and O. K. Lee (2004). "In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells." Hepatology **40**(6): 1275-1284.

Levi, B. and M. T. Longaker (2011). "Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine." Stem Cells **29**(4): 576-582.

Li, W.-J., K. G. Danielson, P. G. Alexander and R. S. Tuan (2003). "Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds." Journal of Biomedical Materials Research Part A **67A**(4): 1105-1114.

Li, W.-J., R. Tuli, C. Okafor, A. Derfoul, K. G. Danielson, D. J. Hall and R. S. Tuan (2005). "A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells." Biomaterials **26**(6): 599-609.

Lo, C.-M., H.-B. Wang, M. Dembo and Y.-I. Wang "Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate." Biophysical Journal **79**(1): 144-152.

Lovat, V., D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato and L. Ballerini (2005). "Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling." Nano Lett **5**(6): 1107-1110.

Mahairaki, V., S. H. Lim, G. T. Christopherson, L. Xu, I. Nasonkin, C. Yu, H. Q. Mao and V. E. Koliatsos (2011). "Nanofiber matrices promote the neuronal differentiation of human embryonic stem cell-derived neural precursors in vitro." Tissue Eng Part A **17**(5-6): 855-863.

Marcacci, M., E. Kon, V. Moukhachev, A. Lavroukov, S. Kutepov, R. Quarto, M. Mastrogiacomo and R. Cancedda (2007). "Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study." Tissue Eng **13**(5): 947-955.

Mattson, M., R. Haddon and A. Rao (2000). "Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth." Journal of Molecular Neuroscience **14**(3): 175-182.

Mikosa, Antonios G.; Walda, Heidi L.; Sarakinosa, Georgios; Leitea, Susan M.; Langer, Robert. Biodegradable Cell Transplantation Devices for Tissue Regeneration. (1991). Disponível em:
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=8093556>

McBeath, R., D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju and C. S. Chen "Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment." Developmental Cell **6**(4): 483-495.

McCullen, S. D., D. R. Stevens, W. A. Roberts, L. I. Clarke, S. H. Bernacki, R. E. Gorga and E. G. Lobo (2007). "Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells." Int J Nanomedicine **2**(2): 253-263.

McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.

McKenzie, J. L., M. C. Waid, R. Shi and T. J. Webster (2004). "Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials." Biomaterials **25**(7-8): 1309-1317.

McMurray, R. J., N. Gadegaard, P. M. Tsimbouri, K. V. Burgess, L. E. McNamara, R. Tare, K. Murawski, E. Kingham, R. O. Oreffo and M. J. Dalby (2011). "Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency." Nat Mater **10**(8): 637-644.

Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov and P. S. Frenette (2010). "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche." Nature **466**(7308): 829-834.

Mikos, A. G., Y. Bao, L. G. Cima, D. E. Ingber, J. P. Vacanti and R. Langer (1993). "Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation." Journal of Biomedical Materials Research **27**(2): 183-189.

Mooney, E., P. Dockery, U. Greiser, M. Murphy and V. Barron (2008). "Carbon Nanotubes and Mesenchymal Stem Cells: Biocompatibility, Proliferation and Differentiation." Nano Lett **8**(8): 2137-2143.

National Institutes of Health. (June, 2001). Stem Cells: Scientific Progress and future research Directions. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/fullrptstem.pdf>

Nur-E-Kamal, A., I. Ahmed, J. Kamal, M. Schindler and S. Meiners (2006). "Three-Dimensional Nanofibrillar Surfaces Promote Self-Renewal in Mouse Embryonic Stem Cells." STEM CELLS **24**(2): 426-433.

Ogawa, M. (1993). "Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells." Blood **81**(11): 2844-2853.

Orlando, G., P. Baptista, M. Birchall, P. De Coppi, A. Farney, N. K. Guimaraes-Souza, E. Opara, J. Rogers, D. Seliktar, K. Shapira-Schweitzer, R. J. Stratta, A. Atala, K. J. Wood and S. Soker (2011). "Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges." Transplant International **24**(3): 223-232.

Osswald, S., M. Havel and Y. Gogotsi (2007). "Monitoring oxidation of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy." Journal of Raman Spectroscopy **38**(6): 728-736.

Owen, M. (1988). "Marrow stromal stem cells." Journal of cell science. Supplement **10**: 63-76.

Pelacho, B., M. Mazo, J. J. Gavira and F. Prosper (2011). "Adult stem cells: from new cell sources to changes in methodology." J Cardiovasc Transl Res **4**(2): 154-160.

Park JB. Biomaterials Science and Engineering. New York; Plenum Press, 1984.

Patel NR, Gohil PP. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering 2012; 2(4): 91-101.

Pelham, R. J. and Y.-I. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(25): 13661-13665.

Petersen, B. E., W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger and J. P. Goff (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-1170.

Phinney, D. G. (2002). "Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells." J Cell Biochem: 7-12.

Pitt, C. G., F. I. Chasalow, Y. M. Hibionada, D. M. Klimas and A. Schindler (1981). "Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) in vivo." Journal of Applied Polymer Science **26**(11): 3779-3787.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.

Place, E. S., N. D. Evans and M. M. Stevens (2009). "Complexity in biomaterials for tissue engineering." Nat Mater **8**(6): 457-470.

Prabhakaran, M. P., J. R. Venugopal and S. Ramakrishna (2009). "Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering." Biomaterials **30**(28): 4996-5003.

Radtke, C., B. Schmitz, M. Spies, J. D. Kocsis and P. M. Vogt (2009). "Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells." Int J Dev Neurosci **27**(8): 817-823.

Reichardt, L. F. and K. J. Tomaselli (1991). "Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development." Annu Rev Neurosci **14**: 531-570.

Reilly, R. M. (2007). "Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine." Journal of Nuclear Medicine **48**(7): 1039-1042.

Resende, R. R., A. Adhikarid, J. L. da Costa, E. Lorençon, M. S. Ladeira, S. Guatimosim, A. H. Kiharag and L. O. Ladeira (2010). "Influence of spontaneous calcium events on cell-cycle progression in embryonal carcinoma and adult stem cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1803**(2): 246–260.

Resende, R. R., J. L. da Costa, A. H. Kihara, A. Adhikari and E. Lorencon (2010). "Intracellular Ca²⁺ regulation during neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma and mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **19**(3): 379-394.

Resende, R. R., E. A. Fonseca, F. M. Tonelli, B. R. Sousa, A. K. Santos, K. N. Gomes, S. Guatimosim, A. H. Kihara and L. O. Ladeira (2014). "Scale/topography of substrates surface resembling extracellular matrix for tissue engineering." J Biomed Nanotechnol **10**(7): 1157-1193.

Resende, R. R., E. A. Fonseca, F. M. P. Tonelli, B. R. Sousa, A. K. Santos, K. N. Gomes, S. Guatimosim, A. H. Kihara and L. O. Ladeira (2014). "Scale/Topography of Substrates Surface Resembling Extracellular Matrix for Tissue Engineering." Journal of Biomedical Nanotechnology **10**(7): 1157-1193.

Reubinoff, B. E., P. Itsykson, T. Turetsky, M. F. Pera, E. Reinhartz, A. Itzik and T. Ben-Hur (2001). "Neural progenitors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1134-1140.

Rodbell, M. (1964). "Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis." J Biol Chem **239**: 375-380.

Safford, K., K. Hicok, S. Safford, Y. Halvorsen, W. Wilkison, J. Gimble and H. Rice (2002). "Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells." Biochem Biophys Res Commun **294**(2): 371 - 379.

Samsonidze, G. G., A. R. Saito, D. A. Jorio, E. M. A. Pimenta, E. A. G. Souza Filho, F. A. Grüneis, D. G. Dresselhaus and M. S. Dresselhaus (2003). "The Concept of Cutting Lines in Carbon Nanotube Science." Journal of Nanoscience and Nanotechnology **3**(6): 431-458.

Santos, A. K., F. M. P. Tonelli, D. A. F. Silva, K. N. Gomes, L. O. Ladeira and R. R. Resende (2013). The Role of Cell Adhesion, Cell Junctions, and Extracellular Matrix in Development and Carcinogenesis. Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research. R. R. Resende and H. Ulrich, Springer Netherlands: 13-49.

Schnell, E., K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton and J. Mey (2007). "Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend." Biomaterials **28**(19): 3012-3025.

Seal, B. L., T. C. Otero and A. Panitch (2001). "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration." Materials Science and Engineering: R: Reports **34**(4-5): 147-230.

Siegel, R. W. (1993). "Synthesis and properties of nanophase materials." Materials Science and Engineering: A **168**(2): 189-197.

Silver, F. H., L. M. Siperko and G. P. Seehra (2003). "Mechanobiology of force transduction in dermal tissue." Skin Research and Technology **9**(1): 3-23.

Smart, S. K., A. I. Cassady, G. Q. Lu and D. J. Martin (2006). "The biocompatibility of carbon nanotubes." Carbon **44**(6): 1034-1047.

Sousa, B. R., R. C. Parreira, E. A. Fonseca, M. J. Amaya, F. M. Tonelli, S. M. Lacerda, P. Lalwani, A. K. Santos, K. N. Gomes, H. Ulrich, A. H. Kihara and R. R. Resende (2014). "Human adult stem cells from diverse origins: An overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications." Cytometry A **85**(1): 43-77.

Sousa, B. R., R. C. Parreira, E. A. Fonseca, M. J. Amaya, F. M. P. Tonelli, S. M. S. N. Lacerda, P. Lalwani, A. K. Santos, K. N. Gomes, H. Ulrich, A. H. Kihara and R. R. Resende (2014). "Human adult stem cells from diverse origins: An overview from

multiparametric immunophenotyping to clinical applications." Cytometry Part A **85**(1): 43-77.

Strem, B., K. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R. Schreiber, J. Fraser and M. Hedrick (2005). "Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells." Keio J Med **54**(3): 132 - 141.

Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda and T. Nagasawa (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-988.

Supronowicz, P. R., P. M. Ajayan, K. R. Ullmann, B. P. Arulanandam, D. W. Metzger and R. Bizios (2002). "Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation." Journal of Biomedical Materials Research **59**(3): 499-506.

Tay, C. Y., H. Gu, W. S. Leong, H. Yu, H. Q. Li, B. C. Heng, H. Tintang, S. C. J. Loo, L. J. Li and L. P. Tan (2010). "Cellular behavior of human mesenchymal stem cells cultured on single-walled carbon nanotube film." Carbon **48**(4): 1095-1104.

Terada, M., S. Abe, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kitagawa and F. Watari (2009). "Development of a multiwalled carbon nanotube coated collagen dish." Dental Materials Journal **28**(1): 82-88.

Thesleff, T., K. Lehtimäki, T. Niskakangas, B. Mannerström, S. Miettinen, R. Suuronen and J. Öhman (2011). "Cranioplasty With Adipose-Derived Stem Cells and Biomaterial: A Novel Method for Cranial Reconstruction." Neurosurgery **68**(6): 1535-1540
1510.1227/NEU.1530b1013e31820ee31824e.

Thomas, J. W., C. W. Michael, L. M. Janice, L. P. Rachel and U. E. Jeremiah (2004). "Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants." Nanotechnology **15**(1): 48.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.

Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-222.

Tohill, M., C. Mantovani, M. Wiberg and G. Terenghi (2004). "Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration." Neurosci Lett **362**(3): 200-203.

Tondreau, T., L. Lagneaux, M. Dejeneffe, M. Massy, C. Mortier, A. Delforge and D. Bron (2004). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation." Differentiation **72**(7): 319-326.

Tonelli, F. M., A. K. Santos, K. N. Gomes, E. Lorencon, S. Guatimosim, L. O. Ladeira and R. R. Resende (2012). "Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering." Int J Nanomedicine **7**: 4511-4529.

Tran, P. A., L. Zhang and T. J. Webster (2009). "Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine." Adv Drug Deliv Rev **61**(12): 1097-1114.

Tropel, P., N. Platet, J. C. Platel, D. Noel, M. Albrieux, A. L. Benabid and F. Berger (2006). "Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(12): 2868-2876.

Tuan, R. S., G. Boland and R. Tuli (2003). "Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering." Arthritis Res Ther **5**(1): 32-45.

Wei, Y., K. Gong, Z. Zheng, L. Liu, A. Wang, L. Zhang, Q. Ao, Y. Gong and X. Zhang (2010). "Schwann-like cell differentiation of rat adipose-derived stem cells by indirect co-culture with Schwann cells in vitro." Cell Proliferation **43**(6): 606-616.

Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808.

White, S. N. (2009). "Laser Raman spectroscopy as a technique for identification of seafloor hydrothermal and cold seep minerals." Chemical Geology **259**(3-4): 240-252.

Williams, D. F. (1999). The Williams Dictionary of Biomaterials, Liverpool University Press.

Williams DF, Cunningham J. Materials in Clinical Dentistry. Oxford, UK; Oxford University Press, 1979.

Williamson, M. R., R. Black and C. Kielty (2006). "PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: Attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells." Biomaterials **27**(19): 3608-3616.

Wong, S. S., E. Joselevich, A. T. Woolley, C. L. Cheung and C. M. Lieber (1998). "Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology." Nature **394**(6688): 52-55.

Woo, K. M., V. J. Chen and P. X. Ma (2003). "Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment." Journal of Biomedical Materials Research Part A **67A**(2): 531-537.

Xie, Y., T. Yin, W. Wiegraebe, X. C. He, D. Miller, D. Stark, K. Perko, R. Alexander, J. Schwartz, J. C. Grindley, J. Park, J. S. Haug, J. P. Wunderlich, H. Li, S. Zhang, T. Johnson, R. A. Feldman and L. Li (2009). "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging." Nature **457**(7225): 97-101.

Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia and H. Chen (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." J Clin Invest **112**(12): 1821-1830.

Xu, Y., L. Liu, Y. Li, C. Zhou, F. Xiong, Z. Liu, R. Gu, X. Hou and C. Zhang (2008). "Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells in vitro." Brain Research **1239**(0): 49-55.

Yamazaki, S., H. Ema, G. Karlsson, T. Yamaguchi, H. Miyoshi, S. Shioda, M. M. Taketo, S. Karlsson, A. Iwama and H. Nakauchi (2011). "Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche." Cell **147**(5): 1146-1158.

- Yeung, T., P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver and P. A. Janmey (2005). "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion." Cell Motil Cytoskeleton **60**(1): 24-34.
- Yim, E. K., R. M. Reano, S. W. Pang, A. F. Yee, C. S. Chen and K. W. Leong (2005). "Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells." Biomaterials **26**(26): 5405-5413.
- Zang, R. and S.-T. Yang (2013). "Multiwalled carbon nanotube-coated polyethylene terephthalate fibrous matrices for enhanced neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells." Journal of Materials Chemistry B **1**(5): 646-653.
- Zhang, J. W., C. Niu, L. Ye, H. Y. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina and L. H. Li (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-841.
- Zhang, S. C., M. Wernig, I. D. Duncan, O. Brustle and J. A. Thomson (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1129-1133.
- Zhao, G., Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran and B. D. Boyan (2005). "High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure." Journal of Biomedical Materials Research Part A **74A**(1): 49-58.
- Zhu, Y., C. Gao, X. Liu and J. Shen (2002). "Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells." Biomacromolecules **3**(6): 1312-1319.
- Zimmerlin, L., V. S. Donnerberg and A. D. Donnerberg (2012). "Pericytes: a universal adult tissue stem cell?" Cytometry A **81**(1): 12-14.
- Zuk, P., M. Zhu, P. Ashjian, D. De Ugarte, J. Huang, H. Mizuno, Z. Alfonso, J. Fraser, P. Benhaim and M. Hedrick (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279 - 4295.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2002). "Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells." Molecular Biology of the Cell **13**(12): 4279-4295.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.