



RENORBIO

Rede Nordeste de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO BIOTECNOLÓGICO À BASE DE
GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale L.*) E QUITOSANA COMO
SUPORTE PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Yulla Klinger de Carvalho Leite

TERESINA-PI

2017

Yulla Klinger de Carvalho Leite

**DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO BIOTECNOLÓGICO À BASE DE
GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale L.*) E QUITOSANA COMO
SUPORTE PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal Piauí, Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Souza de Almeida Leite

Co-orientadora: Prof. Dra. Durcilene Alves da Silva

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

L533d Leite, Yulla Klinger de Carvalho

Desenvolvimento de um produto biotecnológico à base de goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e quitosana como suporte para cultivo de células-tronco mesenquimais / Yulla Klinger de Carvalho - 2017.

78 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Teresina, 2017.
Orientação: Prf. Dr. Roberto José Souza de Almeida Leite

1. Farmacologia - Goma de caju (*Anacardium occidentale* L.)
2. Quitosana 3. Scaffold 4. Células - tronco mesenquimais
I.Título.

CDD 615.323 77



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: YULLA KLINGER DE CARVALHO LEITE

TÍTULO DO PROJETO: "Desenvolvimento de um produto biotecnológico à base de goma do cajueiro (A. occidentale L.) e quitosana como suporte para cultivo de células-tronco mesenquimais."

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite - UFPI (Presidente)	Satisfatório	
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Co-orientadora)	Satisfatório	
Prof. Dr. Arnílton Paulo Raposo Costa - UFPI (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho - UFPI (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto – UFPI (Examinador)	Satisfatório	
Profa. Dra. Mirna Luciano de Gois da Silva (Examinadora)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 14 de agosto de 2017.

HORÁRIO: 15h

LOCAL: Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco - NUPCelt/UFPI

Dedico

*Aos meus pais, **Raimundo Klinger e Maria do Socorro**, por sempre me apoiarem e incentivarem em minhas escolhas, e por me proporcionarem uma base familiar sólida essencial para minha formação pessoal e profissional.*

*A minha filha, **Loíse**, por me ensinar o verdadeiro sentido da vida e me fazer uma pessoa melhor. Obrigado por ser minha fonte de incentivo constante!*

*Ao meu esposo, **Ivo César**, por estar sempre ao meu lado e me proporcionar momentos felizes!*

Muito obrigado! Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela oportunidade da vida, pelas oportunidades oferecidas, por ser minha fonte de fé e sempre iluminar meu caminho, nunca me deixando fraquejar.

À Universidade Federal do Piauí e a Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, pela oportunidade de realizar este curso de Doutorado.

Ao Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) por permitir em seus laboratórios o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec), por me acolher e fornecer materiais necessários à realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Souza de Almeida Leite, por me acolher, sem mesmo me conhecer e me conceder sua orientação durante toda a jornada.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Durcilene Silva, por me fornecer toda a base científica para desenvolvimento do biomaterial; pela ajuda constante, me auxiliando sempre que necessário. Obrigada por tudo!

À Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho, por todo acolhimento, orientação, ajuda, conselhos e por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho por disponibilizar o Laboratório de Atividade Antileishmania - LAA para os ensaios de MTT, atividade fagocítica e expressão de óxido nítrico.

Aos Professores Drs. Luiz de Sousa Santos Júnior e Bartolomeu Cruz Viana Neto, pelo apoio nas análises realizadas com microscópio eletrônico de varredura do Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada – LMMA – UFPI.

Às Profas. Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa e Dra. Andressa Rego da Rocha, por ajudarem em etapas cruciais desta pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO pelos conhecimentos e experiências repassadas.

Ao Dr. Patrick Veras Quelemes, por me ajudar na parte mais importante desta pesquisa, a produção do scaffold! Muito obrigada!

À aluna de mestrado Antônia Carla, por nunca me negar o fornecimento da matéria-prima para desenvolvimento deste material. Muito obrigada!

Ao aluno de mestrado Michel Muallém, por me auxiliar nos testes de citotoxicidade.

Aos Pós-graduandos do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) por contribuírem com seus conhecimentos específicos: Elis Rosélia, Renata Patrícia, Gustavo, Dayseanne, Marcelo.

À aluna de doutorado, Camila Ernanda, por me ajudar em etapa importante deste trabalho e nunca me negar auxílio.

As funcionárias da Coordenação do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO - Ponto focal Piauí: Deusilene e Eliane.

As Funcionárias do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt): Fabiana Mousinho, Janete, Flávia e Luciana por fornecerem ambiente adequado para realização desta pesquisa.

“A mente que se abre a uma nova ideia nunca mais volta ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A bioengenharia de tecidos envolve o uso de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que atuam como matrizes utilizadas para o crescimento celular, denominadas *scaffolds*. A utilização de polímeros naturais na produção de *scaffolds* tem se mostrado promissora, uma vez que apresentam menor risco de rejeição quando implantados *in vivo*, além de apresentarem adesão celular mais eficiente quando comparados à materiais sintéticos. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um *scaffold* utilizando como matérias-primas a quitosana e a goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico (GCAF), e testá-lo *in vitro* em cultura de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana (CTMPDh). As CTMPDh foram isoladas, expandidas e caracterizadas quanto ao potencial de diferenciação nas linhagens mesenquimais e quanto ao perfil imunofenotípico para serem utilizadas nos testes *in vitro*. O *scaffold* foi fabricado utilizando a quitosana e a GCAF em iguais proporções e utilizando a técnica de congelamento/liofilização. As CTMPDh foram cultivadas nos *scaffolds* durante 7 dias. Para avaliação da adesão e crescimento celular, técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas. O potencial de citotoxicidade foi analisado através dos testes de MTT e atividade hemolítica do *scaffold* e das soluções de quitosana e GCAF separadamente. Para avaliação da atividade imunomoduladora, foram realizados os testes de atividade fagocítica e óxido nítrico do *scaffold* e da solução da GCAF em diferentes concentrações. O tamanho dos poros do *scaffold* foram analisados através da MEV. Para caracterização do *scaffold* foram realizados testes de intumescimento, FT-IR, DRX e TGA. As CTMPDh isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide, capacidade de aderência ao plástico, diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, e expressão positiva para o marcador de superfície CD105 e negativa para CD14 e CD45. As CTMPDh semeadas sobre o *scaffold* fabricado apresentaram morfologia típica, fixação e distribuição adequada pelo interior dos poros da matriz. A citotoxicidade da GCAF pelo método de MTT e hemolítico apresentaram CC₅₀ e CH₅₀ superiores a 1000 µg/ml⁻¹. A avaliação da capacidade fagocítica sobre o *scaffold* fabricado demonstrou ativação superior das células em todas as concentrações da goma testadas, indicando que a matriz fabricada apresenta potencial de biodegradabilidade. Houve um leve aumento na síntese do óxido nítrico até a concentração de 400 µg/ml⁻¹ da GCAF. O teste de MTT realizado com *scaffold* sobre as CTMPDh após 24 e 48h, demonstrou viabilidade reduzida, provavelmente, em virtude da migração das células para o interior dos poros do *scaffold* desenvolvido. A taxa de intumescimento do *scaffold* foi de 96,4%, apresentando poros com tamanho entre 73 à 124 µm. A técnica de DRX mostrou que o *scaffold* desenvolvido apresentou maior cristalinidade devido apresentar picos mais definidos em sua estrutura. A TGA mostrou que o *scaffold* produzido apresentou temperatura de decomposição maior que os polissacarídeos usados para sua fabricação. A utilização de *scaffolds* fabricados com GCAF e quitosana apresenta aplicabilidade para cultivo celular *in vitro* funcionando como uma matriz de suporte para o crescimento destas células, surgindo como um importante biomaterial a ser utilizado como suporte e meio de transporte de células em processos de regeneração tecidual.

Palavras-chave: Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*); quitosana; *scaffold*; células-tronco mesenquimais.

ABSTRACT

Tissue bioengineering involves the use of biocompatible and biodegradable materials that act as matrices used for cell growth, called scaffolds. The use of natural polymers in the production of scaffolds has shown to be promising, since they present a lower risk of rejection when implanted in vivo, besides presenting more efficient cellular adhesion when compared to synthetic materials. The objective of this research was to develop a scaffold using chitosan and cashew gum (*Anacardium occidentale L.*) modified with phthalic anhydride (GCAF) as raw materials and to test it in vitro in mesenchymal stem cell culture of the dental pulp (CTMPDh). The CTMPDh were isolated, expanded and characterized as to the potential differentiation in the mesenchymal lineages and the immunophenotypic profile to be used in the in vitro tests. Scaffold was manufactured using chitosan and GCAF in equal proportions and using the freeze / lyophilization technique. CTMPDh were grown on the scaffolds for 7 days. To evaluate cell adhesion and growth, histological and scanning electron microscopy techniques were used. The potential for cytotoxicity was analyzed by MTT tests and hemolytic activity of scaffold and chitosan and GCAF solutions separately. To evaluate the immunomodulatory activity, the tests of phagocytic activity and nitric oxide of the scaffold and of the GCAF solution were performed in different concentrations. The pore size of the scaffold was analyzed through SEM. To characterize the scaffold, swelling, FT-IR, XRD and TGA tests were performed. Isolated CTMPDh showed fibroblastode morphology, plastic adhesion capacity, differentiation in the osteogenic, adipogenic and chondrogenic lines, and positive expression for CD105 and CD45 negative surface markers. CTMPDh seeded on the fabricated scaffold exhibited typical morphology, fixation, and adequate distribution through the interior of the matrix pores. The cytotoxicity of GCAF by the MTT and hemolytic method showed CC50 and CH50 greater than 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$. The evaluation of the phagocytic capacity on the fabricated scaffold demonstrated superior activation of the cells at all concentrations of the gum tested, indicating that the fabricated matrix has biodegradability potential. There was a slight increase in the synthesis of nitric oxide up to the concentration of 400 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ of GCAF. The MTT test performed with scaffold on the CTMPDh after 24 and 48h demonstrated reduced viability, probably due to the migration of the cells into the pores of the developed scaffold. The scaffold swelling rate was 96.4%, with pores ranging in size from 73 to 124 μm . The XRD technique showed that the scaffold developed showed higher crystallinity due to more defined peaks in its structure. The TGA showed that the scaffold produced had a higher decomposition temperature than the polysaccharides used for its manufacture. The use of scaffolds made with GCAF and chitosan presents applicability for in vitro cell culture functioning as a support matrix for the growth of these cells, appearing as a Important biomaterial to be used as support and means of transporting cells in tissue regeneration processes.

Key words: Cashew gum (*Anacardium occidentale L.*); chitosan; *scaffold*; mesenchymal stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A. Demonstração das misturas das soluções de quitosana e GCAF após agitação magnética. B. Distribuição da solução em poços de placa de cultivo para congelamento e liofilização.....	33
Figura 2 – A, B. Fotomicrografias do isolamento inicial das CTMPDh. Células em formato arredondado e fusiforme migrando a partir do tecido explante com 10 dias de cultivo (Objetiva 4x, barra: 400µm)	40
Figura 3 - A, B. Fotomicrografias das CTMPDh em primeira passagem (P1). Culturas homogêneas com células em formato fusiforme dispostas paralelamente. Cultura com 80% de confluência (Objetiva 10x, barra: 200µm).....	41
Figura 4 - A, B. Fotomicrografias da diferenciação condrogênica de CTMPDh. Cultura celular apresentando matriz extracelular cartilaginosa fortemente corada com Alcian Blue. (Objetiva 20x, barra: 100 µm).....	42
Figura 5 - A,B. Fotomicrografias da diferenciação adipogênica de CTMPDh. Cultura celular apresentando células arredondadas contendo grânulos de lipídios coradas marrom no seu interior. (Objetiva 40x, barra: 50µm).....	43
Figura 6 - A,B. Fotomicrografias da diferenciação osteogênica de CTMPDh. Cultura celular apresentando células arredondadas e matriz extracelular rica em cálcio corada em vermelho. (Objetiva 20x, barra: 100µm).....	43
Figura 7. Histogramas de citometria de fluxo de amostras de CTMPDh. Os gráficos demonstraram a ausência de expressão de CD45 e CD14 (A, B) e expressão positiva para CD105 (C).....	44
Figura 8. A,B. Fotomicrografias de fluorescência de CTMPDh incorporada com nanocristais de Qdots. Lâmina prepara à fresco, coberta com lamínula 10X20. (Objetiva 10x, barra: 50 µm).....	45
Figura 9 - Scaffolds fabricados à base de quitosana e goma de cajueiro modificada (<i>Anacardium occidentale L.</i>) com anidrido ftálico.....	46
Figura 10 - Corte histológico evidenciando a fixação e morfologia de CTMPDh aderidas às membranas do <i>scaffold</i> . A, Células arredondadas aderidas à membrana da matriz. (Objetiva 10x, barra: 200 µm) B, Célula fusiforme ligada à membrana da matriz (Objetiva 10x, barra: 200 µm). C, Células arredondadas aderidas e soltas à matriz (Objetiva 40x, barra: 50 µm) e D, Células arredondadas aderidas à matriz (Objetiva 100x, barra: 25 µm). Lâmina histológica corada com HE.....	47

Figura 11 - Fotomicrografias de fluorescência de CTMPDh marcadas com Qdots e incorporada em <i>scaffold</i> . Corte parafinizado sem coloração. (Objetiva 10x, barra: 50 μ m).....	48
Figura 12 - Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV). Em (A) e (B) MEV evidenciando as CTMPDh com morfologia arredondada fixadas ao <i>scaffold</i> fabricado. Em (B) CTMPDh exibindo prolongamento citoplasmático. (C) Célula circundada por matriz extracelular. (D) Célula em poro do <i>scaffold</i> . Análise após 7 dias de cultivo.....	49
Figura 13 - Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do <i>scaffold</i> modificada através do software ImajeJ para mensuração do tamanho dos poros.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da goma de cajueiro (<i>Anacardium occidentale L.</i>) modificada com anidrido ftálico sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana.....	50
Gráfico 2 - Efeito da quitosana sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana.....	51
Gráfico 3 - Efeito da goma de cajueiro (<i>Anacardium occidentale L.</i>) modificada com anidrido ftálico sobre eritrócitos de caprinos.....	52
Gráfico 4 - Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com a goma de cajueiro (<i>Anacardium occidentale L.</i>) modificada com anidrido ftálico e sobre <i>scaffold</i> fabricado.....	53
Gráfico 5 - Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com a goma de cajueiro (<i>Anacardium occidentale L.</i>) modificada com anidrido ftálico.....	54
Gráfico 6 - Viabilidade celular de células-tronco mesenquimais da polpa de dente humano avaliada pelo método do MTT após 24 e 48h de incubação.....	55
Gráfico 7 - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da quitosana, da GCAF do <i>scaffold</i> fabricado.....	57
Gráfico 8 - Difratomia de Raios X da quitosana, da GCAFe do <i>scaffold</i> fabricado.....	58
Gráfico 9 - Curvas termogravimétricas para a quitosana, GCAF e <i>scaffold</i> fabricado. A (TG) B (DTG).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC50	Concentração citotóxica média
CD105	Glicoproteína de membrana expressa em células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células musculoesqueléticas
CD11b	Integrina expressa em 44% das células da medula óssea
CD13	Ectoenzima transmembrana expressa em granulócitos, monócitos e seus precursores
CD14	Proteína presente em macrófagos, responsável por detectar lipopolissacarídeo de bactérias
CD19	Marcador característico das células B
CD31	Glicoproteína expressa na superfície de plaquetas, monócitos, granulócitos e células B
CD34	Glicoproteína que funciona como fator de adesão celular
CD43	Molécula expressa no citoplasma de células T e células da linhagem mielóide
CD45	Proteína tirosina fosfatase presente em todos os leucócitos
CD73	Marcador expresso em células-tronco mesenquimais
CD79	Marcador associado à imunoglobulina de superfície do complexo receptor de antígeno de células linfóides B
CD90	Ou Thy-1 marcador de células progenitoras multipotentes
CD166	Molécula expressa na superfície de células mesenquimais
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CH50	Concentração hemolítica média
CO ₂	Gás carbônico
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTMMO	Células-tronco mesenquimais da medula óssea
CTMPDh	Células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana
CTMPDh-nac	Células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana marcadas com nanocristais Qdots
DMEM/F-12	Meio de cultivo celular - Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient mixture F-12 /Ham
DMSO	Dimetilsulfóxido

DRX	Difração de raios X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GCAF	Goma de cajueiro (<i>Anacardium occidentale L.</i>) modificada com anidrido ftálico
HA-TiO ₂	Hidroxiapatita e titânia
HE	Hematoxilina/eosina
HLA-DR	Receptor de superfície celular codificada pelo antígeno leucocitário humano
iNOS	Enzima óxido nítrico sintetase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-[4,5dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio
Nanog	Proteína de superfície presente em células-tronco embrionárias
NO	Óxido nítrico
NUPCelt	Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco
Oct-4	Marcador de células-tronco pluripotentes
PBS	Solução salina tamponada com fosfato de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
Qdots	Quantum dots
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TGA	Termogravimetra
TGF-β1	Proteína que controla crescimento e proliferação celular
UV	Radiação ultra violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS.....	73
ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética para Experimentação em Humanos.....	74
ANEXO 2 – Parecer do Comitê Ética em Experimentação Animal.....	75
ANEXO 3 – Requerimento para solicitação de depósito de patente e declaração de tramitação da mesma.....	77
ANEXO 4 - Declaração de depósito de pedido de patente de invenção.....	78

INTRODUÇÃO

O avanço das pesquisas envolvendo as áreas da biologia celular e molecular tem facilitado o desenvolvimento de técnicas de regeneração de órgãos e tecidos injuriados por doenças, traumas e deformidades congênitas. Na engenharia de tecidos, os biomateriais funcionam como suporte para preenchimento temporário da região lesada direcionando o processo regenerativo de tecidos ou órgãos danificados. Para a produção destes biomateriais, muitos polímeros têm sido empregados, com o intuito de mimetizar as características da matriz extracelular, exercendo um papel ativo na restauração tecidual (SANTOS JUNIOR; WADA, 2007). A engenharia tecidual utiliza como base o uso de células-tronco, matrizes biocompatíveis e moléculas bioativas responsáveis pela sinalização morfogênica (CASAGRANDE; SILVALAUXEN; FERNADES, 2009).

A escolha por polímeros naturais para a fabricação desses biomateriais, tem-se destacado, por demonstrarem menor risco de rejeição quando implantados, além de apresentarem adesão celular mais eficiente quando comparados a materiais sintéticos (HEINEMANN et al., 2008).

O método mais utilizado atualmente na bioengenharia tecidual envolve o uso de arcabouços porosos tridimensionais, biocompatíveis e biodegradáveis, denominados de *scaffolds*, suportes nos quais as células-tronco, podem ser cultivadas com o propósito de construir um tecido *in vitro*. Sua estrutura fornece sustentação mecânica ao desenvolvimento celular bem como permite o transporte de nutrientes, metabólitos, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias, tanto no sentido do meio extracelular para as células, quanto no sentido inverso (BRAGHIROLI, 2012).

A capacidade de autorrenovação e diferenciação das células-tronco em diversos tipos celulares, torna-as como uma fonte promissora e atraente para uso na engenharia tecidual. O cultivo de células-tronco mesenquimais de diferentes fontes teciduais é uma prática laboratorial utilizada de forma recorrente para caracterização biológica do comportamento celular *in vitro* quando submetido a diferentes microambientes de cultura, sua capacidade de manutenção da autorrenovação e de diferenciação em diferentes tipos celulares pode ser observada e gerar resultados promissores para sua aplicação terapêutica. As células-tronco mesenquimais da polpa dentária são de fácil acessibilidade, crescem bem em cultivo, apresentam as propriedades das demais células-tronco e são usadas em uma ampla gama de aplicações clínicas (VOLPANI;

PANG; CHARK, 2010). Portanto, investigações acerca de sua biologia celular e molecular são fundamentais e podem desencadear uma análise mais profunda sobre as células-tronco da polpa dentária para uma melhor definição dos aspectos de sua aplicação terapêutica (PISCCIOTA et al., 2015).

Este estudo foi realizado utilizando-se dois diferentes polímeros naturais para a produção de *scaffolds* em estudos *in vitro*. A quitosana, por apresentar características básicas para aplicação na engenharia de tecidos como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, ampla distribuição na natureza e semelhança com a matriz extracelular (DI MARTINO et al., 2005; DONATI et al., 2004); e a goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), modificada com adição de anidrido ftálico. Este polímero natural vem sendo bastante estudado quanto suas características antimicrobianas (CAMPOS et al., 2012; QUELEMES et al., 2017; TORQUATO et al., 2004), anti-inflamatórias (SHIRATO et al., 2006) e antifúngicas (MARQUES; ALBUQUERQUE; XAVIER-FILHO, 1992). Aliado a isso, quando modificado, com a adição de anidrido ftálico, apresentou forte interação quando combinado à quitosana, fato propiciado pelas ligações das cargas positivas da quitosana e negativas da goma modificada, criando um complexo eletrolítico crucial, para a produção do *scaffold*.

O estudo objetivou de desenvolver *scaffold* utilizando como matérias-primas a quitosana e a goma de cajueiro modificada com anidrido ftálico, e testá-lo *in vitro* em cultura de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Scaffolds*

A área de engenharia de tecidos inclui conceitos e técnicas que vão da biologia celular à engenharia e ciências dos materiais. Essa área envolve o uso de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que atuam como matrizes utilizadas para o crescimento celular, chamadas de *scaffolds* (BRAGHIROLI, 2012).

Muitos estudos estão sendo realizados com a abordagem da engenharia tecidual, pela qual a proliferação celular e a organização da matriz extracelular são realizadas sob matrizes porosas bidimensionais (2-D) ou tridimensionais (3-D), as quais recebem o nome de *scaffolds* (FERNANDES et al., 2011)

Conforme citado, estes suportes biocompatíveis promovem a adesão, crescimento e diferenciação celular com o propósito de construir um tecido *in vitro*. Um *scaffold* ideal deve ser biocompatível, bioreabsorvível, possuir propriedades mecânicas compatíveis com a aplicação destinada, porosidade e permeabilidade (BOSE et al., 2012). Para que se torne um biomaterial aplicável na engenharia de tecidos, um *scaffold* deve apresentar algumas propriedades consideradas essenciais: (1) possuir estrutura tridimensional com poros interligados, a fim de favorecer a conexão das células ao tecido em desenvolvimento, para permitir o transporte de nutrientes e metabólitos; (2) ser originado de materiais com taxas de biodegradação ou bioabsorção controladas para que assim possam ser degradados ou absorvidos à medida que ocorre a formação do novo tecido (*in vitro* ou *in vivo*); (3) estrutura superficial química que favoreça a adesão, proliferação e a diferenciação celular; (4) apresentar propriedades mecânicas adequadas ao manuseio e ao local de implantação; (5) ser facilmente produzido (HUTMACHER, 2001), tornando-se assim um material biocompatível passível de sucesso na regeneração e organização tecidual.

Os *scaffolds* liberam substâncias bioativas a uma velocidade controlada e ainda podem influenciar diretamente no comportamento das células incorporadas ao mesmo. Além da microestrutura porosa do *scaffold*, sua interação específica, ou mimetismo, com os componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento e receptores celulares são aspectos desejáveis para escolha e utilização da matriz ideal (MADIHALLY; MATTHEW, 1999).

O tamanho e interconectividade dos poros do *scaffold* são pontos importantes que promovem a vascularização, crescimento, fornecimento de nutrientes e processos de diferenciação celular (MITTAL et al., 2010). Para aplicação na engenharia tecidual, o *scaffold* ideal, geralmente, deve possuir elevada porosidade e alta área de superfície (ATALA, 2007).

O processo de adesão das células ao *scaffold* é influenciado pelas propriedades físicas e químicas da superfície da matriz. Este processo é mediado por proteínas, dentre elas, a integrina, que se ligam ao colágeno presente na matriz extracelular proporcionando resistência à matriz, e a fibronectina responsável por interceder e facilitar o processo de fixação das células à matriz. As interações célula-matriz influenciam os processos de crescimento, proliferação e diferenciação celular, assim como mudanças morfológicas nas células aderidas ao mesmo. Uma adesão ruim ou mesmo comprometida das células à matriz pode levar à um processo apoptótico, levando à autodestruição celular (CHEN et al., 2013).

A biodegradação, outra característica importante para escolha do *scaffold* ideal, representa a capacidade de um polímero ser degradado por hidrólise ou digestão enzimática (GE et al., 2008). Os produtos finais da biodegradação não devem provocar inflamação ou citotoxicidade e devem ser removidos através de vias metabólicas (MIRANDA, 2010)

A seleção da matéria-prima ideal para fabricação e utilização do *scaffold* é de grande importância. O uso de polímeros sintéticos não cumpre todas as necessidades na aplicabilidade, à qual se destina. Assim, recentemente, pesquisadores têm concentrado seus estudos em materiais de origem natural (SILVA et al., 2007). A utilização destes na engenharia de tecidos ósseos, válvulas de coração e cartilagem têm sido recorrente, no entanto, apresentam problemas como adesão insuficiente de células, superfície hidrofóbica (que evita o crescimento interno da célula) e desenvolvimento de processo inflamatório no tecido implantado (HEINEMMAN et al., 2008).

A utilização de polímeros naturais na produção de matrizes porosas para o crescimento celular tem se mostrado promissora (FERNANDES et al., 2011; FURUYA, 2015; MACEDO, 2013; MIRANDA, 2010). Estes materiais apresentam uma maior interação celular, devido às suas propriedades bioativas, o que lhes permite ter um melhor desempenho biológico no sistema (VÁZQUEZ et al., 2015). A seleção de polímeros naturais para utilização como biomateriais é feita com base em algumas características como composição química, peso molecular, solubilidade, estrutura, propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, energia de superfície, absorção de água (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

Dessa forma, a combinação da estrutura química do biomaterial e a técnica de processamento do mesmo proporcionam a formação de matrizes altamente complexas. Assim, a escolha de ambos deve ser feita rigorosamente a fim de se obter um *scaffold* com características ideais para o uso ao qual se destina (BRAGHIROLI, 2012).

Os *scaffolds* devem ser facilmente produzidos com elevada precisão e reprodutibilidade. Sua esterilização para utilização *in vivo* e *in vitro* deve ser simples e efetuada através da exposição a altas temperaturas, exposição a agentes químicos (óxido de etileno ou CO₂ supercrítico) ou mediante processos físicos (radiação UV, β ou γ) sem alteração das propriedades bioquímicas da matriz (DOMINGOS, 2012).

Embora os *scaffolds* sejam primeiramente usados em aplicações médicas voltadas para tratamento e regeneração tecidual, estes também podem ser usadas como dispositivos para crescimento celular *in vitro*, para análise de proteínas sanguíneas em laboratório e também em equipamentos para o processamento de biomoléculas (RIBEIRO, 2009).

Alguns *scaffolds* produzidos a base de polímeros naturais já foram estudados em ensaios de reparação tecidual (FUNAKOSHI et al., 2005; MIRANDA, 2010; YAN et al., 2010).

2.2 Propriedades e utilização da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e quitosana em ensaios biológicos

Produtos naturais apresentam historicamente, grande importância econômica e medicinal para a humanidade (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010). Há milhares de anos, o homem vem utilizando recursos da flora como principais componentes da sua farmacopeia (BRODY et al., 2000). O desenvolvimento da fitoquímica e fitofarmacologia a partir da década de 90 propiciou a descoberta de relevantes propriedades medicinais em plantas nativas, as quais não eram normalmente utilizadas para esta finalidade (RANGEL; BRAGANÇA, 2009).

Polissacarídeos são polímeros naturais, constituídos de um único ou de diferentes tipos de monossacarídeos. Nas plantas superiores os polissacarídeos podem ser obtidos de exsudatos, sementes, frutos e tubérculos. Polissacarídeos de exsudatos são heteropolissacarídeos complexos, ramificados e polidispersos, produzidos como mecanismo de defesa das plantas contra o estresse causado por injúrias físicas ou ataque microbiano. Ácidos carboxílicos, como ácido glucurônico e galacturônico, estão sempre presentes. Estruturalmente, eles podem ser divididos em três grupos principais. O primeiro grupo é composto de uma cadeia principal de unidades de β -D-galactose ligada com cadeias laterais de β -D-galactose e ácido glucurônico. O

segundo grupo possui uma cadeia principal de β -D-ácido glucurônico ligado à D-manose, com ramificações de arabinose e ácido glucurônico. O terceiro grupo consiste de uma cadeia de α -D-ácido galacturônico ligado à α -L-ramnose com ramificações de ácido glucurônico e β -D-galactose (CUNHA et al., 2009).

Celulose, alginato e goma arábica são alguns exemplos de polissacarídeos, os quais possuem uma gama de aplicações, especialmente nas áreas de alimentos, biomédicas, farmacêuticas e de cosméticos (CUNHA et al., 2009).

Existe uma tendência para o uso de materiais biodegradáveis e oriundos de fontes renováveis. Países tropicais como o Brasil são depositários de uma grande variedade de fontes conhecidas e de outras ainda não exploradas de polissacarídeos vegetais, com grande potencial em aplicações industriais. A goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), inclusive, pode ser citada como um desses polissacarídeos (MOTHÉ; CORREIA, 2002).

A goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é constituída de unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose. Possui característica semelhante à goma arábica, podendo substituí-la como cola líquida para papel, na indústria farmacêutica, em cosméticos, como aglutinante de cápsulas e comprimidos, e na indústria alimentícia como estabilizante de sucos, cervejas e sorvetes (SARUBBO, 2007). Apresenta propriedades importantes de emulsificação, adesividade e pode funcionar como estabilizante (MOTHÉ; RAO, 2000). Alguns trabalhos têm demonstrado seu uso como agente encapsulante em sistemas de liberação para aplicação farmacêutica (MIRANDA, 2009; PAULA et al., 2010), na utilização de filmes comestíveis para revestimento de frutas (AZEREDO et al., 2011)

Além da semelhança estrutural e química com a goma arábica, a goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) tem um importante diferencial: sua alta disponibilidade na região Nordeste do território brasileiro, podendo gerar lucros no período da entressafra do caju (ANDRADE et al., 2013).

Algumas pesquisas reportam a possibilidade do uso da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) em vários setores, porém, sua aplicação em nível industrial ainda não foi citada (MOTHÉ; CORREIA, 2002).

A purificação da goma de caju é feita por meio da trituração, dissolução em água, filtração a vácuo e precipitação em etanol. O precipitado formado é drenado e secado, onde é novamente triturado e peneirado, resultando em um pó fino e puro (TORQUATO et al., 2004).

Trabalhos têm sido desenvolvidos visando modificações de polissacarídeos naturais com processos químicos, físicos e/ou bioquímicos, gerando uma diversidade de novos produtos. Com isso, muitas vezes é possível atribuir a um determinado polissacarídeo propriedades de outro polissacarídeo (PORTO, 2013; QUELEMES et al., 2017). Furtado et al. (2013) relataram que a goma de cajueiro pode ser combinada a outras substâncias, no intuito de alterar determinadas características, tais como a elevada solubilidade em água e hidrofiliabilidade, de forma a ampliar a sua possibilidade de uso industrial. Estudos de modificação química de gomas naturais têm destacado o grande potencial desse procedimento na formulação de biopolímeros e aprisionamento de drogas farmacêuticas, graças às características de biocompatibilidade e versatilidade de reações químicas possíveis.

Diversos estudos apresentando modificações e ações contra microrganismos já foram realizados com a goma de caju (*Anacardium occidentale L.*). Sua ação contra fungos e bactérias fitopatogênicas foi detectada em pesquisa realizada por Marques et al. (1992). Torquato et al. (2004), avaliaram a atividade antimicrobiana da goma de caju contra *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. Quelemes e colaboradores (2017) apresentaram ação da goma modificada contra *S. aureus* resistente à metilina. A atividade da mesma contra *E. coli* e *P. aeruginosa* também foi demonstrada (CAMPOS et al., 2012). Sua ação como agente anti-inflamatório no processo cicatricial de camundongos foi comprovada em estudo realizado por Shirato et al. (2006) e por Vitorino filho (2011).

O desenvolvimento de novos materiais a base da goma do caju possibilita a obtenção de um produto à base de matéria prima regional com menor custo/benefício, apresentando-se como uma alternativa para agregar valor à cajucultura (SILVA et al., 2013).

A pesquisa científica tem focado em algumas substâncias e matérias-primas de origem natural para fabricação de matrizes porosas biocompatíveis e biodegradáveis como utilização para cultivo celular e regeneração tecidual, já que alguns materiais sintéticos utilizados para este fim têm desencadeado resposta imune em seus hospedeiros. Biomateriais de polissacarídeos têm sido desenvolvidos por meio de modificações químicas com o objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas, mecânicas ou químico-biológicas, ampliando suas possibilidades de utilização em diversos campos como, a engenharia de tecidos (AZEVEDO, 2002).

A quitosana apresenta características básicas para a escolha do biomaterial ideal a ser utilizado na regeneração tecidual como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, ampla

distribuição na natureza e semelhança com a matriz real do tecido desejado, além de apresentar um baixo custo. Esse polissacarídeo, derivado da quitina, principal molécula estrutural da carapaça de crustáceos, é parcialmente deacetilado e tem baixo peso molecular (DI MARTINO et al., 2005; DONATI et al., 2004).

Estruturalmente, a quitosana é um polissacarídeo linear consistindo de resíduos de D-glicosaminas com ligações $\beta(1\rightarrow4)$, com numerosas ligações randômicas de N-acetilglicosamina, semelhante às unidades repetitivas de glicosamanoglicanos e ácido hialurônico (DI MARTINO et al., 2005; DONATI et al., 2004). Seu peso molecular pode oscilar de 300 a mais 1000 kD, de acordo com o grau de desacetilação. Apresenta-se insolúvel, em sua forma cristalina, em soluções aquosas com pH acima de 7, no entanto soluções ácidas (pH<6) facilitam a solubilidade da mesma (DI MARTINO et al., 2005).

A quitosana é um importante polímero utilizado para produção de géis e filmes, justamente por ter propriedades biodegradáveis e biocompatíveis (CHIN; AHMAD, 2010). A literatura aponta seu uso na agricultura (adubagem) e na área médica, aparecendo como bandagens, curativos e até enxertos (FURUYA, 2015). Pode ser usado ainda na área farmacêutica, como sistema de liberação de fármacos (DASH et al., 2011), na indústria de cosméticos e no tratamento de água (AZEVEDO et al., 2007).

Propriedades antimicrobianas da quitosana já foram comprovadas para *Cândida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus pyogenes* (RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015).

Estudos têm revelado a quitosana como constituinte para fabricação de *scaffolds* destinados à cultura de células e em processos de reparação tecidual (FERNANDES et al., 2011; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015; SUN et al., 2009).

2.3 Células-Tronco Mesenquimais (CTM)

A célula-tronco é considerada por pesquisadores e profissionais da área da saúde como importante arma para combate de inúmeras doenças (KOLYA; CASTANHO, 2007). Estas células apresentam-se indiferenciadas e são caracterizadas pela capacidade de auto-renovação, diferenciação em diversos tipos celulares e reconstituição funcional de determinados tecidos (SOUZA et al., 2010), podendo ser isoladas de diversos sítios anatômicos, dentre estes o mais estudado é a medula-óssea.

Na medula óssea existem além das células-tronco hematopoiéticas e das células-tronco endoteliais, uma população rara de células-tronco capaz de dar suporte a hematopoiese e de se diferenciar em diversas linhagens celulares, como condrócitos, osteócitos e adipócitos. Estas células foram originalmente identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos em 1970, por Alexander Friedenstein e colaboradores, que as denominaram células formadoras de colônias fibroblásticas. Mais recentemente estas células têm sido denominadas células-tronco mesenquimais (CTM) (MIRANDA, 2010)

Pittenger et al. (1999) caracterizaram as CTM como células não hematopoéticas que apresentam crescimento *in vitro* em monocamada aderente ao plástico contendo meio com baixo teor de glicose suplementado com soro fetal bovino, e que são identificadas por anticorpos monoclonais como o CD105 e o CD73.

A Sociedade Internacional de Citoterapia estabeleceu requisitos mínimos para enquadrar populações celulares na categoria de CTM, sendo a plástico-aderência; expressão positiva para os marcadores CD105, CD73 e CD90 e negativa para CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR em mais de 90% das células em cultivo, assim como, sua diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos (DOMINICI et al., 2006). Por possuírem propriedades que as mantêm indiferenciadas em cultura e apresentarem a capacidade de originar tipos celulares especializados, representam importante ferramenta para o tratamento de inúmeras lesões e doenças que são tratadas de forma pouco satisfatória pelos métodos tradicionais (WOBUS; BOHELER, 2005). Considerando estes aspectos, as CTM representam, atualmente, a fonte mais promissora para regeneração e reparo de diferentes tipos teciduais (SOUZA et al., 2010).

As CTM foram primeiramente isoladas e identificadas a partir da medula óssea (FRIENDSTEIN et al., 1966), no entanto muitos estudos mostram a presença destas células a partir de diferentes fontes teciduais, podendo ser isoladas a partir do tecido adiposo (COSTA, 2015; ROCHA, 2015), sangue do cordão umbilical (BIEBACK et al., 2004), sangue periférico (KUZNETSOV et al., 2001), polpa dentária (CARVALHO et al., 2015; GRONTHOS et al., 2000, 2002; KERKIS et al., 2006).

2.4 Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Pulpar

Tendo em vista que as CTM estão presentes, mesmo que em quantidades pequenas, em quase todos os tecidos do corpo, alguns pesquisadores focaram seus estudos no isolamento

destas células, derivadas de dentes extraídos para fins ortodônticos e que são descartados em clínicas odontológicas, desperdiçando assim uma potencial fonte de células-tronco (JO et al., 2007).

Os primeiros estudos realizados com células-tronco mesenquimais do tecido pulpar (GRONTHOS et al., 2000, 2002) comprovaram a diferenciação destas células em linhagens distintas *in vitro*, como odontoblastos e adipócitos, e verificaram alta taxa de proliferação, mesmo quando por tempo prolongado em cultura. Aliado a isso, as células compartilhavam alguns marcadores com células progenitoras da medula óssea, o CD146, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, colágeno tipo III, osteonectina, osteopontina, osteocalcina, fator de crescimento do fibroblasto II e α -actina de músculo liso.

Miura et al. (2003) demonstraram que as CTM da polpa de dente decíduos apresentam maior taxa de proliferação se comparadas às células-tronco de dentes permanentes, formação de colônias, capacidade de ósteo-indução *in vivo*, e elevada plasticidade, uma vez que estas células sofreram diferenciação em neurônios, adipócitos, osteoblastos e odontoblastos. Em face desses resultados, as células-tronco de dentes decíduos representam uma população mais imatura do que as demais CTM dentárias pós-natais. Os dentes decíduos esfoliados, pela facilidade de obtenção, apresentam-se como uma fonte ideal de células-tronco para reparar estruturas dentárias comprometidas, induzir regeneração óssea e possivelmente, tratar injúrias de tecido nervoso ou doenças degenerativas (HAU et al., 2006).

A descoberta das células-tronco extraídas da polpa dental, incluindo, dentes decíduos esfoliados, aumentaram as possibilidades para a regeneração do complexo dentino-pulpar em dentes endodonticamente comprometidos (CASAGRANDE; LAUXEN; FERNANDES, 2009).

A marcação imunofenotípica de CTM do tecido pulpar de dentes não decíduos humanos revelou a expressão de marcadores embrionários como o Oct-4 e Nanog, bem como a expressão positiva de proteínas específicas de CTM como CD105, CD73 e CD13 (KERKIS et al., 2006). Agha-hosseini et al. (2010) evidenciaram a expressão de marcadores positivos como CD44, CD90 e CD166 e ausência de expressão para CD34, CD31 e CD45 nestes tipos celulares.

Batouli et al. (2003) implantaram CTM de polpa de terceiros molares humanos e da medula óssea, misturadas com hidroxiapatita, no dorso subcutâneo de ratos. Os resultados demonstraram que as células-tronco da medula óssea desenvolveram tecido ósseo medular

maduro, e as da polpa dentária originaram o complexo, dentina-polpa. Cordeiro et al. (2008) verificaram a formação de tecido com características semelhantes ao tecido pulpar a partir de CTM da polpa dentária decídua, semeadas em *scaffold* desenvolvido no interior do conduto pulpar de fatias de terceiros molares extraídos e implantadas no dorso de camundongos imunodeprimidos. A diferenciação em células odontoblásticas foi comprovada por imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão.

2.5 Cultivo de Células-Tronco Mesenquimais em *Scaffolds*

Os biomateriais podem fornecer melhores condições para multiplicação de células e síntese de tecidos com vistas à regeneração de regiões específicas de organismos vivos (DENG et al., 2015; MARQUARDT; HEILSHORN, 2016). Diversos estudos do campo da bioengenharia envolvem a busca por novos materiais que sejam eficazes na reparação tecidual e possam ser incorporados a medicina regenerativa. As pesquisas nesse campo do conhecimento extensivamente, envolvem a associação destes biomateriais com células tronco cultivadas *in vitro*.

A reparação tecidual pode ser feita utilizando um pedaço de tecido retirado do próprio paciente, dissociado em células e reimplantadas no hospedeiro ou ainda cultivadas *in vitro* sobre matrizes porosas tridimensionais, conhecidos como “*scaffolds*”, que após proliferação são reinsertos no indivíduo (ATALA, 2007). A cultura de células progenitoras semeadas sobre essas matrizes, desenvolvem um microambiente ideal ao desenvolvimento destas células e posterior organização funcional similar ao tecido de origem (BURG et al., 2000; GOMES et al., 2003).

O uso combinado de células e *scaffold*, baseia-se na capacidade de promover um ambiente biomecânico adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular. Após a fase inicial de adesão e proliferação celular, estas começam a depositar no substrato (*scaffold*) sua própria matriz extracelular estimulando a formação de um novo tecido. No decorrer do processo, o *scaffold* vai-se degradando e sendo continuamente eliminado pelo organismo (DOMINGOS, 2012).

As linhagens celulares ideais a serem utilizadas na engenharia tecidual, devem possuir a capacidade de proliferação e diferenciação *in vitro* controlável e reprodutível. As CTM além de serem isoladas de diferentes tecidos humanos, podem dar origem, no mínimo, a três tipos de tecido conjuntivo (osso, cartilagem e gordura) (DOMINGOS, 2012), enquadrando-se assim no

perfil de células ideais a serem empregadas neste campo.

Células progenitoras isoladas da medula-óssea, foram capazes de apresentar potencial osteogênico quando, inoculadas em *scaffolds* cerâmicos e, implantados em tecido subcutâneo e ósseo em modelos animais (BARRY, 2003).

Miranda (2010) utilizou células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMMO) de ratos, cultivadas em *scaffolds* fabricados a base de gelatina e quitosana, para avaliação do comportamento desta associação (CTM + *scaffold*) *in vivo* na reconstrução de tecido ósseo em modelo de alvéolo dentário de ratos. Este autor obteve uma matriz adequada para formação de construtos com CTMMO, a qual contribuiu para a regeneração epitelial, vascular e óssea e acelerou o processo de maturação do tecido ósseo neoformado, representado uma estratégia viável para a engenharia de tecido ósseo em odontologia.

A utilização de suportes porosos de hidroxiapatita e titânia (HA-TiO₂) como *scaffolds* para crescimento e proliferação de fibroblastos e osteoblastos murinos, mostrou-se positiva, uma vez que as células citadas aderiram e cresceram ao longo do compósito, indicando que o mesmo além de biocompatível é atóxico para as células avaliadas (GALDINO et al., 2014).

O teste de citotoxicidade e viabilidade celular é uma importante análise utilizada para avaliar a biocompatibilidade do *scaffold*, para evidenciar possíveis efeitos tóxicos causados pelo mesmo no sistema biológico célula-*scaffold* (MUNDSTOCK et al., 2012). *Scaffolds* de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) construídos utilizando a associação das técnicas de electrospinnig e bioelectrospinnig integrados a células-tronco do tecido pulpar humano, apresentaram bons resultados, uma vez que, as células integradas mostraram-se capazes de proliferar-se dentro da estrutura do biomaterial, evidenciada pela análise histológica (BRAGHIROLI, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de Células-tronco Mesenquimais da Polpa de Dente Humano (CTMPDh)

Foram utilizados seis dentes permanentes humanos, extraídos assepticamente, por indicação ortodôntica na Clínica de Cirurgia Odontológica da Universidade Federal do Piauí e conduzidos até à capela de fluxo laminar do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí, para o isolamento do tecido pulpar. Para o transporte, os dentes foram submersos em 1mL de meio de cultivo (para cada dente) DMEM F12 suplementado com 20% de soro fetal bovino (Invitrogen Corporation, no 16000- 044), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de L-glutamina (Invitrogen® no 25030081) e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® no M7145) à temperatura ambiente. Todos os procedimentos foram realizados após concordância dos responsáveis pelos pacientes, por meio da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (0218.0.045.000-11).

O isolamento de células-tronco mesenquimais (CTMs) a partir de polpa dentária foi realizado por digestão mecânica. Em cabine de fluxo laminar, o tecido pulpar foi removido dos dentes com auxílio de instrumentos odontológicos. Feito isso, o tecido foi lavado 3 vezes com solução de PBS suplementado com 10% de antibiótico e então submerso em placa contendo meio de cultura DMEM F12 suplementado com 20% de soro fetal bovino (Invitrogen Corporation, no 16000- 044), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de L-glutamina (Invitrogen® no 25030081) e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® no M7145). O tecido pulpar foi dissociado mecanicamente, com auxílio de lâmina de bisturi, transferidos junto com o meio de cultura citado para poços de uma placa de 6 poços e, posteriormente, incubado em estufa incubadora (TECNAL TE-399®) à 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95%.

3.2 Cultivo e expansão de Células-tronco Mesenquimais da Polpa de Dente Humano (CTMPDh)

Após 48 horas do procedimento inicial de dissociação mecânica do tecido pulpar, as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas de meio de cultura subsequentes foram realizadas a cada 3 dias. Ao atingir 80% de confluência, as culturas primárias foram tripsinizadas com solução 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen®, no 25200-114, solução de Tripsina-EDTA 10x) e incubada a 37°C durante cinco minutos. Após esse período, a ação da tripsina foi inativada com acréscimo do dobro de meio D-MEM F12

suplementado. A suspensão foi transferida para um tubo de fundo cônico e centrifugada (Citocentrífuga de bancada FANEM MOD.280®) à temperatura de 20°C à 2000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi totalmente desprezado, o pellet ressuspensionado em 1 mL de D-MEM completo e realizada a primeira contagem celular. O conteúdo celular em suspensão foi utilizado para expansão celular. Para tanto, o mesmo foi plaqueado em garrafas de cultura de tecidos de 25cm² juntamente com 3 mL de meio de cultivo DMEM F12 suplementado. Estas foram mantidas em incubação à 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. As culturas foram expandidas, fotografadas em microscópio invertido de contraste de fase (COLEMAN NIB-100®) e repiques subsequentes foram realizados de maneira idêntica até as células atingirem a 6ª passagem, quando foram então criopreservadas para e utilização nos experimentos propostos.

3.3 Criopreservação de Células-tronco Mesenquimais da Polpa de Dente Humano (CTMPDh)

As CTMPDh foram tripsinizadas na sexta passagem e o pellet ressuspensionado em meio de congelamento (50% de meio DMEM F12, 40% de soro fetal bovino e 10% de meio de congelamento dimetil-sulfóxido- DMSO). A suspensão celular foi acondicionada em criotubos e mantidas em freezer - 80 °C por 48 horas. Após este período, foram transportadas para botijões contendo nitrogênio líquido onde permaneceram armazenadas no Núcleo Integrado de Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí. A concentração celular congelada em cada criotubo foi de 1x10⁶ células/ml.

3.4 Caracterização de Células-tronco Mesenquimais da Polpa de Dente Humano (CTMPDh)

As células aderentes isoladas de dentes decíduos foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais pelas seguintes propriedades: (1) capacidade de aderência ao plástico e morfologia característica, (2) perfil imunofenotípico e (3) plasticidade.

3.4.1- Capacidade de adesão ao plástico e análise morfológica das culturas celulares

As células aderentes, confluência e morfologia característica foram diariamente observadas e fotografadas em microscópio invertido de contraste de fase (COLEMAN NIB-100®).

3.4.2- Avaliação da plasticidade celular

Para análise da capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 5×10^3 células/cm² e observadas até atingirem 80% de confluência. Atingida a confluência adequada, deu-se início aos tratamentos de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica. Foram usados meios especiais de diferenciação, seguindo protocolos específicos para cada tipo de diferenciação.

I-Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/Hepes suplementado com 6,25 µg/mL de insulina, 10ng/mL TGF-β1 e 50 nM de solução de ácido ascórbico-2 fosfato . O meio foi trocado a cada 3 dias. Após aproximadamente 14 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com Alcian Blue para detecção de matriz cartilaginosa extracelular.

II-Diferenciação adipogênica

As células foram cultivadas, cerca de 14 dias, em meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) contendo 20% de plasma humano, dexametasona (10⁻⁷M), insulina (2,5 µg/ml), indometacina (5µM), rosiglitazona (5µM) e heparina sódica (10 unidades/mL). Após este período os adipócitos foram identificados através da morfologia típica por observação ao microscópio com contraste de fase (COLEMAN NIB- 100®), a cultura foi fixada com paraformaldeído 4% e subsequentemente corada com Oil Red O para identificação dos vacúolos lipídicos.

III-Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, as células foram mantidas durante 14 dias em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) /Hepes suplementado com soro fetal bovino (10%), dexametasona (10⁻⁸M), ácido ascórbico 2-fosfato (5 µg/ml) e β-glicerofosfato (10mM). Após este período, a cultura foi fixada com paraformaldeído 4% e submetida à coloração com o corante Alizarin Red, o qual cora cristais de fosfato de cálcio na matriz, detectando assim a diferenciação em células osteogênicas.

3.4.3- Perfil imunofenotípico das células cultivadas

As células foram caracterizadas quanto à presença de marcadores de células-tronco mesenquimais e ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas através da técnica de citometria de fluxo. Para a correta identificação dos antígenos, foram utilizados os seguintes

anticorpos monoclonais: CD14 (Anti-CD14 FITC-Abcam Cambridge, MA, USA), CD45 (Anti-CD45 FITC-Abcam Cambridge, USA), CD105 (Anti-CD105 FITC-Abcam Cambridge, MA, USA). Células na sexta passagem foram descongeladas, expandidas, tripsinizadas e a quantidade de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células foram incubadas com 10 μ L de cada anticorpo citado. Um tubo foi utilizado como controle. Após a incubação com os anticorpos, durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS CANTO II, equipado com laser de argônio para 488 nm. Para cada amostra serão adquiridos em torno de 30.000 eventos, e a análise dos dados será realizada com auxílio do software Cell Quest (FACS DIVA).

3.5 Marcação de Células-tronco Mesenquimais da Polpa de Dente Humano (CTMPDh) com Quantum dots (QDots) – CTMPDh-nac

As células mesenquimais, uma vez caracterizadas, foram submetidas à marcação com nanocristais fluorescentes Qdots. Células na sexta passagem foram descongeladas e o pellet ressuspensionado em 1ml de meio de cultivo (DMEM F12). Os componentes do Qdots foram homogeneizados (segundo protocolo especificado pelo fabricante) e adicionados ao pellet celular, incubados em estufa de CO₂ a 37 °C por 50 minutos e agitados no vortex (EVLAB-EVO19) a cada 10 minutos. Em seguida foi acrescentado 1mL de meio DMEM F12 e centrifugadas duas vezes, 1500 rpm durante cinco minutos para lavagem, e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL meio DMEM F12. Para constatação da incorporação dos nanocristais no interior celular e consequente marcação, 10 microlitros da suspensão celular foi colocada em uma lâmina e visualizada em microscópio de fluorescência.

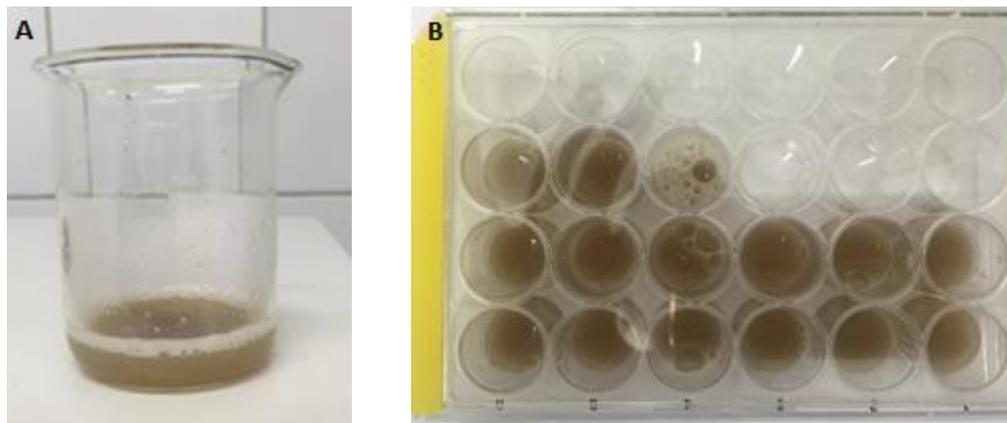
3.6 Processo de fabricação de Scaffold à base de quitosana e goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico.

A GCAF cedida para este experimento foi purificada e modificada por pesquisadores do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia (Biotec) da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba-PI.

A quantidade de 0,3 gramas de quitosana (Sigma) foi dissolvida em ácido acético 0,5% (10 ml) sob agitação constante em agitador magnético (FANEM-258) durante 60 minutos. Durante este mesmo período, 0,3 gramas de goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico (GCAF), foi dissolvida em 10 ml de água. A solução foi mantida sob agitação constante em agitador magnético (FANEN-258) durante 60 mim ou até

dissolução total da mesma. Após este processo as duas soluções foram misturadas sob agitação constante por um período de 2 horas. A solução final (20 ml) foi transferida para uma placa de 24 poços, e distribuída numa quantidade equivalente à 2 ml por poço da placa. Posteriormente, a placa levada ao refrigerador (AIR FLOW SYSTEM DC38) e congelada à -20 °C por aproximadamente 12 horas. Na sequência, a placa foi transferida ao liofilizador e então liofilizada por aproximadamente 14 horas até completa secagem das amostras. Após liofilizados, os *scaffolds* fabricados foram pesados em balança analítica (SHIMADZU-AY220) e posteriormente esterilizados com óxido de etileno para utilização nos testes em cultura celular.

Figura 1. **A.** Demonstração da mistura das soluções de quitosana e GCAF após agitação magnética. **B.** Distribuição da solução em poços de placa de cultivo para congelação e liofilização



3.7 Cultivo de Células-tronco Mesenquimais da Polpa de Dente Humano (CTMPDh) em Scaffold fabricado à base de quitosana e goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico.

Para avaliação da fixação e integração das CTMPDh ao *scaffold* fabricado, uma quantidade de 1×10^5 células/ml foram contadas, ressuspensas em 1,5 ml de meio de cultivo adequado DMEM F12 e plaqueadas sobre a superfície do *scaffold* em placas de cultura celular de 12 poços. A placa contendo os *scaffolds* semeados com as CTMPDh foi incubada em estufa (TECNAL TE-399®) à 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95% durante o período de sete dias. Este mesmo protocolo foi utilizado para avaliação da fixação das células marcadas com nanocristais QDots (CTMPDh-nac).

3.8 Análise Histológica

A morfologia e adesão de CTMPDh sobre os *scaffolds* foram avaliadas também por meio do processamento histológico. Após o tempo de incubação determinado, os *scaffolds* foram fixados em formaldeído 4% durante 30 minutos, seguindo a desidratação em uma série de diluições de etanol por 30 minutos cada (30%, 55%, 70%, 88%, 96%, 100%) e então incluídas em parafina. Foram realizados cortes de 5 μ m em micrótomo (LEICA RM2235), corados com hematoxilina e eosina, e visualizados em microscópio de luz (NIKON ECLIPSE E200).

Para avaliação da aderência das CTMPDh-nac, as lâminas preparadas não foram coradas visto que estas apresentavam-se marcadas, sendo visualizadas diretamente em microscópio de fluorescência (OLYMPUS TH4-200).

3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A adesão das CTMPDh sobre os *scaffolds* foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Após a incubação durante o tempo determinado, os *scaffolds* foram retirados da placa de cultivo, transferidos para tubos cônicos tipo falcon e fixados com 2,5% de glutaraldeído por 24 horas. Subsequentemente as amostras foram lavadas com PBS e submetidas à desidratação, com a troca lenta de água, usando uma série de diluições de etanol (30%, 55%, 70%, 88%, 96% e 100%) por 20 minutos em cada concentração. Após completa secagem das amostras, os *scaffolds* foram metalizados com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura (QUANTA FEG 250).

3.10 Preparo das soluções estoque de GCAF para os ensaios biológicos

A GCAF e a quitosana, separadamente, foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, USA) a fim de se obter uma solução-mãe de 80 mg/mL. Em cada protocolo, a solução-mãe foi diluída em meio de cultura DMEM F12 (para ensaios com CTMPDh) e RPMI (para ensaios com macrófagos) até atingir as concentrações desejadas, não ultrapassando a quantidade de 0,2% de DMSO.

3.11 Avaliação da citotoxicidade da GCAF e quitosana sobre CTMPDh

Avaliou-se a citotoxicidade da GCAF e da quitosana utilizando o teste do brometo de 3-[4,5dimetiliazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Em placas separadas de 96 poços foram adicionados 100 μ L de meio DMEM F12 suplementado e cerca de 2×10^3 CTMPDh por poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por

24 h para adesão celular, seguindo-se de duas lavagens com meio DMEM F12 suplementado para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, em cada placa, foram adicionados 100 μL de DMEM F12 suplementado com diferentes concentrações da GCAF e da quitosana, separadamente (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$).

Em seguida foram incubadas por 48 h e, após este período, foi adicionado 10 μL de MTT diluído em meio DMEM F12 a 5 mg/mL . Foram incubados por mais 4 h em estufa a 37 °C com 5 % de CO_2 , o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μL de DMSO em todos os poços. As placas foram colocadas sob agitação por 30 minutos em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa Biotek (modelo ELx800). O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica para 50% das CTMPDh (CC_{50}) sendo o grupo controle considerado como 100 % (NOGUEIRA, 2007). O controle negativo foi realizado com meio DMEM F12 a 0,2 % de DMSO.

3.12 Avaliação da citotoxicidade da GCAF sobre eritrócitos

Para a avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de caprinos coletados com anticoagulante (EDTA). O teste foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFPI), nº 117/15. Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 μL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5 % de hemácias. Em seguida foram adicionadas as diluições da GCAF a serem analisadas (6, 25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) diluídas em volume de 20 μL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 h a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de PBS. As suspensões foram centrifugadas a 1000 G, por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100 % de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica para 50 % dos eritrócitos (CH_{50}) considerando o controle positivo como 100 % de hemólise (LÖFGREN et al., 2008).

3.13 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos

Neste experimento foram utilizadas células peritoneais de ratos *wistar*. Os cuidados com os animais e os procedimentos experimentais foram conduzidos seguindo as orientações do

Comitê de Ética em Experimentação Animal, Universidade Federal do Piauí (CEEAA-UFPI, parecer 023/14 e 143/16).

Foram coletados macrófagos residentes da cavidade peritoneal de 01 rato *wistar*. O animal foi eutanasiado por deslocamento cervical após ser tranquilizado e sedado por injeção intraperitoneal de uma associação de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80 mg/Kg de peso vivo). A retirada dos macrófagos foi feita em capela de fluxo laminar com o animal fixado em placa na posição de decúbito dorsal, administrando-se 8mL de salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl 145mM, Na₂HPO₄ 9mM, NaH₂PO₄ 1mM, pH 7,4), estéril, a 4°C, na cavidade abdominal. Foi realizada uma massagem suave na região abdominal e feita a aspiração utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. Baseado no critério morfológico de viabilidade celular, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o método colorimétrico de exclusão azul de Trypan, obtendo-se um mínimo de 95% de células vivas. Novamente, as células foram contadas utilizando-se Vermelho Neutro para ajustar a concentração desejada de macrófagos (2×10^5 células/ml).

Para avaliação da capacidade de ativação dos macrófagos, nos testes seguintes, foram realizados ensaios utilizando macrófagos plaqueados sobre o *scaffold* em estudo, como também utilizando somente soluções da GCAF em diferentes concentrações.

3.13.1 Determinação da capacidade fagocítica de macrófagos sobre diferentes concentrações da solução de GCAF e em *scaffold* fabricado à base de quitosana e GCAF

Para avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos sobre o *scaffold*, foram plaqueados 2×10^5 macrófagos peritoneais por poço e incubados sobre o mesmo. Paralelamente, realizou-se este mesmo ensaio sobre a solução da GCAF em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Após 48 h de incubação em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 μL de solução de zimosan corado sobre o *scaffold* e sobre as soluções de diferentes concentrações da goma, seguindo de incubação em estufa durante 30 min a 37°C. Após este procedimento, foram adicionados 100 μL de fixador de Baker para paralisar o processo de fagocitose e após 30 min, a placa foi lavada com solução salina 0,9% a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 100 μL de solução de extração e após solubilização em agitador de Kline as absorbâncias foram medidas a 550 nm em leitora de placa Biotek (modelo ELx800). O procedimento foi realizado em triplicata.

3.13.2 Indução da síntese de Óxido Nítrico em GCAF

Foram plaqueados 2×10^5 macrófagos peritoneais por poço e incubados com soluções de GCAF em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, transferiu-se os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em água Milli-Q® à concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 μM diluídos nos respectivos meio de cultivo. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1 % Sulfanilamida em H₃PO₄ 10 % (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e procedeu-se a leitura das absorbâncias na leitora de placa Biotek (modelo ELx800) a 550 nm. O procedimento foi realizado em triplicata e como controle positivo utilizou-se Lipopolissacarídeo (LPS).

3.14 Avaliação da citotoxicidade de *scaffold* fabricado à base de quitosana e GCAF sobre CTMPDh

Para análise da viabilidade celular de CTMPDh em contato com o *scaffold* fabricado, em placa de 96 poços foram adicionados 100 μL de meio DMEM F12 suplementado e cerca de 2×10^3 CTMPDh por poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24 h para adesão celular, seguindo-se de duas lavagens com meio DMEM F12 suplementado para retirada das células que não aderiram. Os *scaffolds* foram lavados com meio de cultura e adicionados aos poços contendo as células aderidas. A placa contendo as CTMPDh e os *scaffolds* permaneceu em estufa por 24 e 48 horas. Passados os respectivos tempos, os *scaffolds* foram retirados juntamente com o meio de cultivo e 10 μL de MTT diluído em meio DMEM F12 a 5 mg/mL foi adicionado. A placa foi incubada por mais 4 h em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂, e em seguida o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μL de DMSO em todos os poços. A placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 minutos em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa Biotek (modelo ELx800). O procedimento foi realizado em triplicata e utilizados como controle positivo CTMPDh cultivada em DMEM F12 suplementado com 20% de soro fetal bovino (Invitrogen Corporation, no 16000- 044), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de L-glutamina (Invitrogen® no 25030081) e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® no M7145).

3.15 Análises estatísticas

Todos os Ensaio foram realizados em triplicata e três experimentos independentes. Para o cálculo das CC₅₀ e CH₅₀ com limite de confiança de 95%, foi utilizado o modelo de regressão

Probit do programa SPSS 13.0. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni através do programa GraphPad Prism versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ com nível máximo de significância estatística.

3.16 Diâmetro médio dos poros do *scaffold*

Para a determinação do diâmetro dos poros utilizaram-se as micrografias obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV). As dimensões dos poros, como aparecem nas imagens de MEV, foram determinadas individualmente através do processamento das imagens utilizando o programa ImageJ (FERREIRA, 2016).

3.17 Taxa de intumescimento do *scaffold*

A taxa de intumescimento do *scaffold* foi determinada pela percentagem de absorção de água. Inicialmente os *scaffolds* secos ($n=3$) foram pesados e seus pesos anotados (P_s). Em seguida, os mesmos foram imersos em solução de PBS com pH 7,4 à 37 °C durante 24 horas. Após 24 horas, os *scaffolds* úmidos foram retirados da solução de PBS, o excesso de água foi rapidamente removido com papel filtro levemente umedecido e em seguida foram pesados novamente (P_u). A taxa de intumescimento foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\text{Intumescimento (\%)} = (P_u - P_s) / P_u \times 100$$

3.18 Caracterização físico-química da GCAF, da quitosana e *scaffold* fabricado à base de quitosana e GCAF

3.18.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros FT-IR da GCAF, da quitosana e do *scaffold* produzido foram obtidos em equipamento espectrômetro Bomem–Hartmann & Braun, modelo MB-series, em pastilhas de KBr, no alcance de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.18.2 Difração de Raios X

Para verificação da cristalinidade dos polímeros utilizados e do *scaffold* fabricado, foi utilizada a técnica de difração de raios X, feita através do instrumento Shimadzu, modelo XR-D600 A, na faixa 2θ entre 1,4 e 70°. A velocidade de varredura foi de 5° min^{-1} , utilizando a fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, com comprimento de onda 154,06 pm.

3.18.3 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas para os polímeros e para o *scaffold*, foram obtidas em equipamento TA Instruments SDT Q 600, em atmosfera inerte, na taxa de aquecimento de 10°C

min⁻¹, de 10 a 800°C, para os polímeros utilizados e para o *scaffold* sintetizado. As amostras foram analisadas em porta amostra de alumina com massa variando entre 6 a 8 mg.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos primeiros dias de cultivo observou-se grande quantidade de células arredondadas em suspensão presentes em decorrência da dissociação mecânica do tecido pulpar. Estas foram eliminadas logo nas primeiras lavagens. As primeiras células aderentes liberadas pelo tecido pulpar foram verificadas a partir do décimo dia de cultivo celular, algumas com morfologia arredondada que aos poucos se alongavam tornando-se fusiformes e outras que já se apresentavam com esta morfologia, dispostas adjacentes ao redor do tecido pulpar (Figuras 2A e 2B). O estabelecimento de uma monocamada celular, com substrato bem definido seguiu-se do 22º dia de cultivo, quando a cultura apresentou células alongadas e dispostas paralelamente, muitas adotando posicionamento radial típico, atingindo 80% da área de uma garrafa de 25 cm² (Figuras 3A e 3B).

Figura 2. A, B. Fotomicrografias do isolamento inicial das CTMPDh. Células em formato arredondado e fusiforme migrando (seta) a partir do tecido explante com 10 dias de cultivo (Objetiva 4x, barra: 400µm).

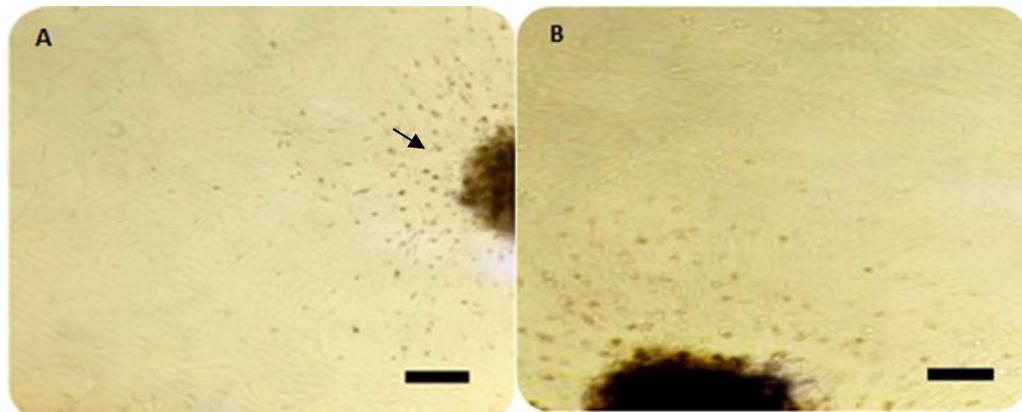
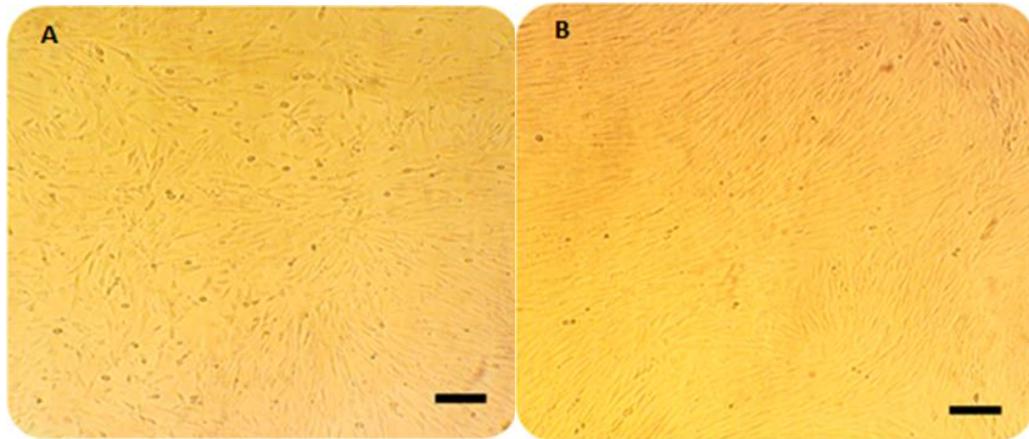


Figura 3. A, B. Fotomicrografias das CTMPDh em primeira passagem (P1). Culturas homogêneas com células em formato fusiforme dispostas paralelamente. Cultura com 80% de confluência geral (Objetiva 10x, barra: 200 μ m).



O isolamento de CTM do tecido pulpar foi realizado usando-se apenas técnicas mecânicas, dispensando, portanto, a utilização de enzimas, a fim de preservar as células do estresse que são submetidas neste processo. De acordo com a literatura, o isolamento deste tipo celular, é realizado tanto pelo método enzimático (GRONTHOS et al., 2000,2002; PAINO et al., 2010), quanto, apenas pela dissociação mecânica (CARVALHO et al., 2015), conforme realizado neste estudo.

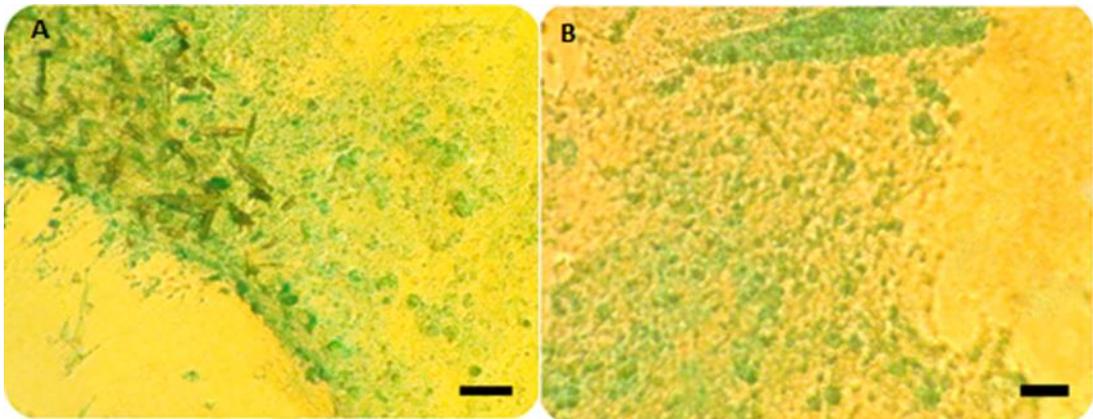
Independente da dissociação enzimática as células preservaram seu comportamento de crescimento, mantendo assim característica fibroblastóide e crescimento em monocamada. A morfologia arredondada inicial das CTM do tecido pulpar, o formato fusiforme semelhante à fibrobrasto, com crescimento paralelo e a formação de uma monocamada aderente, com substrato bem definido, foram igualmente apresentados em outros estudos com este mesmo tipo celular (GRONTHOS et al., 2000,2002; KERKIS et al., 2006; PAINO et al., 2010).

De acordo com Dominici et al. (2006), além da capacidade de autorrenovação, morfologia fusiforme, aderência ao plástico e a presença de marcadores específicos de superfície celular, estas células para serem classificadas como CTM, devem apresentar capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

As CTMPDh isoladas foram capazes de se diferenciar *in vitro* em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso, pela indução com meios específicos, comprovada pela mudança na morfologia e coloração positiva, corroborando com resultados de estudos utilizando o mesmo tipo celular (BALIC et al., 2010; DISSANAYAKA et al., 2011).

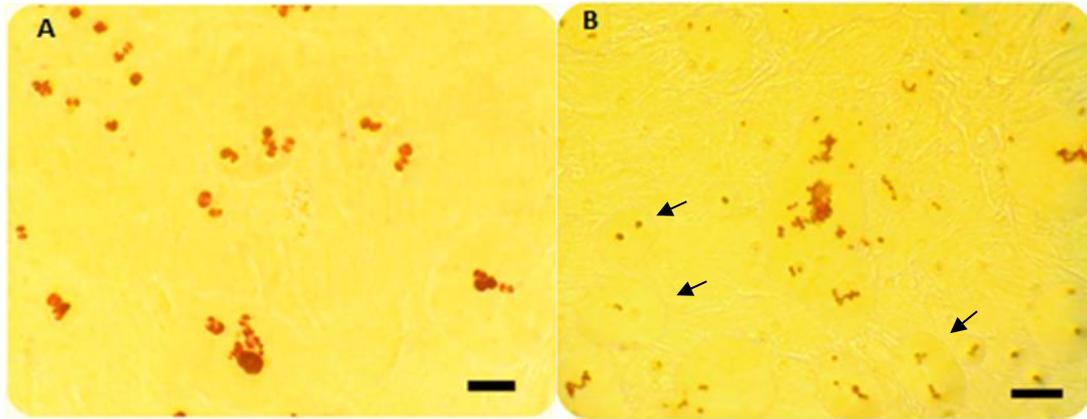
Na diferenciação condrogênica, foi observado crescimento lento das células nos primeiros dias e manutenção da morfologia fibroblastóide. A partir do sexto dia em cultivo foi evidenciada mudança no formato e proliferação celular. Após a coloração com *Alcian Blue*, foi identificada uma matriz fortemente corada (Figuras 4A e 4B), evidenciando a multipotencialidade das CTMPDh, fato observado também em relação aos resultados obtidos por Rocha (2015), com protocolo semelhante.

Figura 4. A,B. Fotomicrografias da diferenciação condrogênica de CTMPDh. Cultura celular apresentando matriz extracelular fortemente corada com *Alcian Blue* compatível com formação cartilaginosa (Objetiva 20x, barra: 100 μ m).



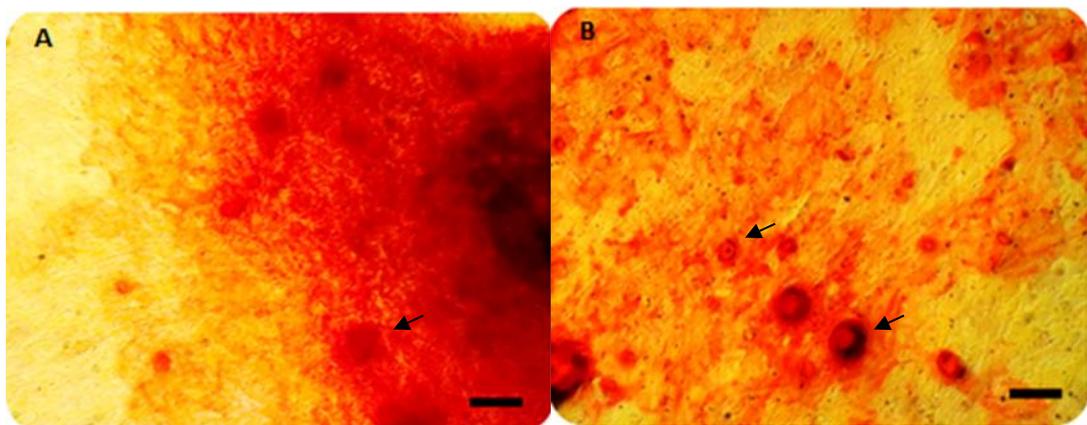
Na diferenciação adipogênica, ocorreu modificação da morfologia inicial das células, passando-se a arredondadas, de tamanho grande, com citoplasma contendo grânulos birrefringentes de gordura. As células diferenciadas mostraram a presença de gotículas de gordura coradas em marrom preenchendo o citoplasma das células. Chama a atenção o aspecto arredondado das células, cuja morfologia assemelhava-se a de células de gordura típicas (Figura 5). A mudança na morfologia destas células, pode ser justificada pelo aumento ou fusão de pequenos vacúolos com gotículas de gordura, assim como, por um maior direcionamento para formação de adipócitos uniloculares (PINO; ROSEN; RODRÍGUEZ, 2012).

Figura 5. A,B. Fotomicrografias da diferenciação adipogênica de CTMPDh. Cultura celular apresentando células arredondadas (setas), com limites citoplasmáticos bem definidos, contendo grânulos de lipídios no seu interior, corados em tom marrom pelo corante *Oil Red* (Objetiva 40x, barra: 50 μ m).



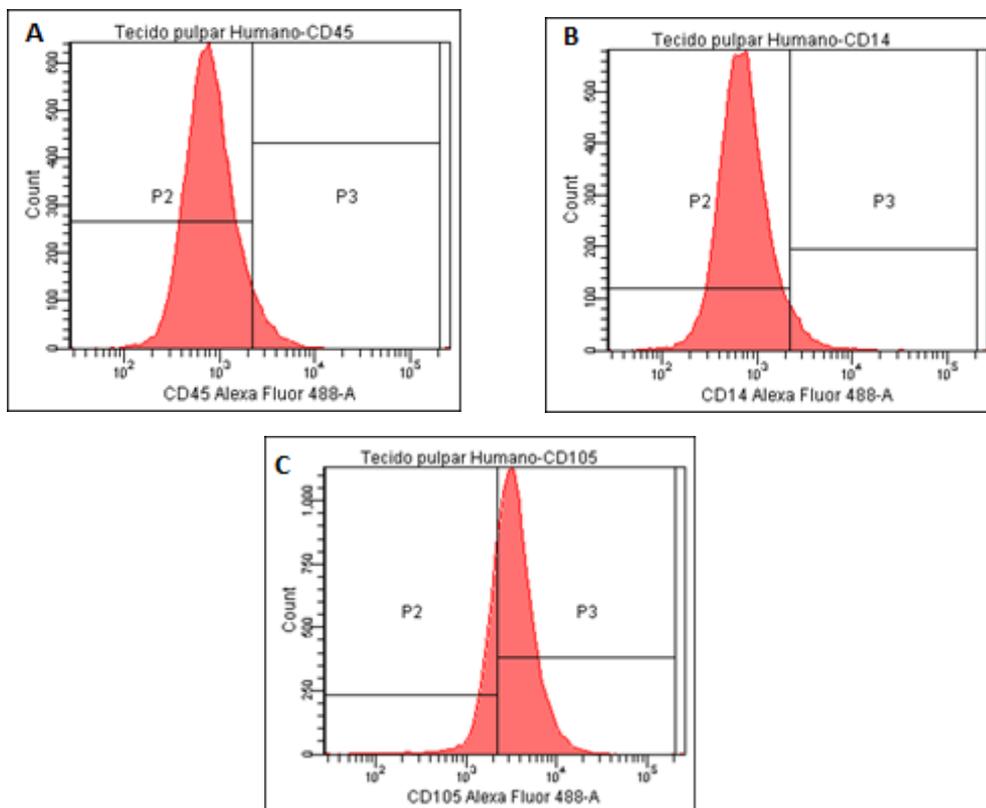
Nas culturas submetidas à diferenciação osteogênica, foram observadas alterações morfológicas progressivas a partir do 10º dia em cultivo. Após coloração, a cultura apresentou uma matriz rica em cálcio fortemente corada em vermelho e pontos redondos concentrados semelhantes a osteoblastos (Figura 6), corroborando com pesquisa desenvolvida por Carvalho et al. (2013), os quais apresentaram resultados semelhantes utilizando CTM de tecido adiposo de ratos, evidenciando a mudança na morfologia fibroblastóide destas células para osteoblastos, e também a presença de nódulos de mineralização, comprovando a especialização nesta linhagem.

Figura 6. A,B. Fotomicrografias da diferenciação osteogênica de CTMPDh. Cultura celular apresentando estruturas arredondadas (setas) e matriz extracelular rica em cálcio corada em vermelho pelo corante *Alizarin Red*. (Objetiva 20x, barra: 100 μ m).



Na caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo, a população celular não expressou marcação para os anticorpos monoclonais CD14 e CD45, excluindo-se a possibilidade de serem células hematopoiéticas (Figuras 7A, 7B). Todavia, estas células apresentaram 59,3% de positividade para a proteína CD105, marcador específico de células-tronco mesenquimais (Figura 7C).

Figura 7. Histogramas de citometria de fluxo de amostras de CTMPDh. Os gráficos demonstraram a ausência de expressão de CD45 e CD14 (A, B) e expressão positiva para CD105 (C).

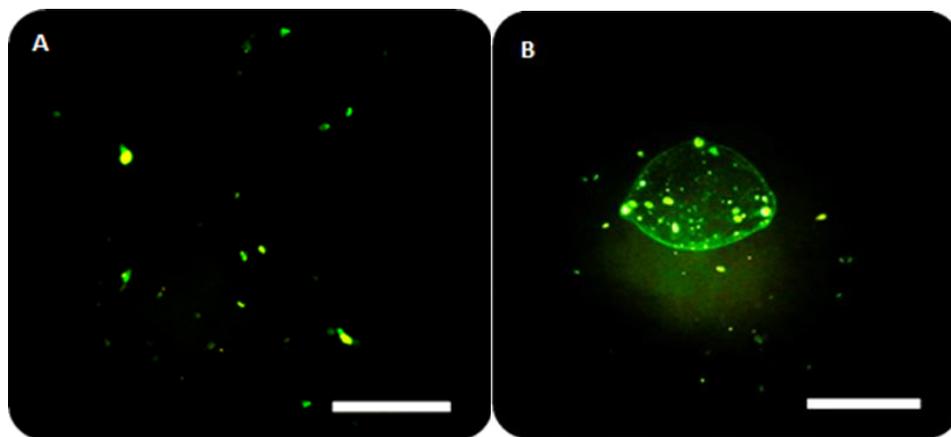


Dominici et al (2006) afirmam que para uma completa caracterização das CTM, além dos padrões estabelecidos de morfologia, plástico-aderência e diferenciação nas linhagens mesenquimais, é necessário a utilização de um conjunto de anticorpos monoclonais, os quais serão capazes de avaliar corretamente a expressão imunofenotípica destas células. A expressão positiva para a proteína de superfície CD105 apresentada pelas CTMPDh, mostra-se condizente com a literatura, no que concerne a expressão positiva de marcadores de superfície celular como CD105, CD73 e CD166 seria suficiente para enquadrar tais células na classificação de CTM (ALSALAMEH et al., 2004; PITTENGER et al., 1999). Já, para Badoo et al. (2003), a ausência

de antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície de CTM as distingue de precursores hematopoiéticos, assim como, foi demonstrado neste estudo, ocorrendo expressão negativa para CD45 E CD14.

As CTMPDh foram capazes de incorporar os nanocristais de QDots em seu citoplasma, conforme mostra a figura 8. A identificação dos marcadores no citoplasma foi possível através da microscopia de fluorescência.

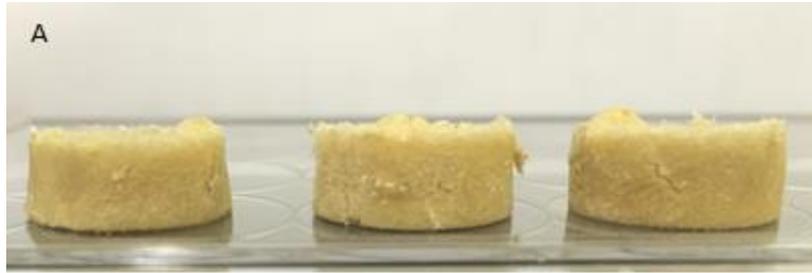
Figura 8. A,B. Fotomicrografias de fluorescência de CTMPDh contendo nanocristais de QDots dispersos no citoplasma. Lâmina prepara à fresco, coberta com lamínula 10X20. (Objetiva 10x, barra: 50 μ m)



Para Domingos et al. (2012) o bom desempenho *in vitro* e *in vivo* dos *scaffolds*, é influenciado tanto pelas propriedades intrínsecas dos materiais utilizados na fabricação quanto do processo utilizado para produção.

Abdelwahed et al. (2006) afirmam que a formação de matrizes porosas e híbridas através da liofilização torna-se interessante por favorecer a formação biomateriais com alta porosidade e arquitetura complexa. Este fato também foi evidenciado na fabricação do *scaffold* em estudo com a mistura de dois polissacarídeos diferentes, congelamento e posterior liofilização. Este processo resultou em uma estrutura porosa, similar a uma esponja, com peso em torno de 0,036 gramas, 1,2 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura (Figura 9), apresentando-se como arcabouço que possibilitou o cultivo das células.

Figura 9. *Scaffolds* fabricados à base de quitosana e goma de cajueiro modificada (*Anacardium occidentale L.*) com anidrido ftálico.

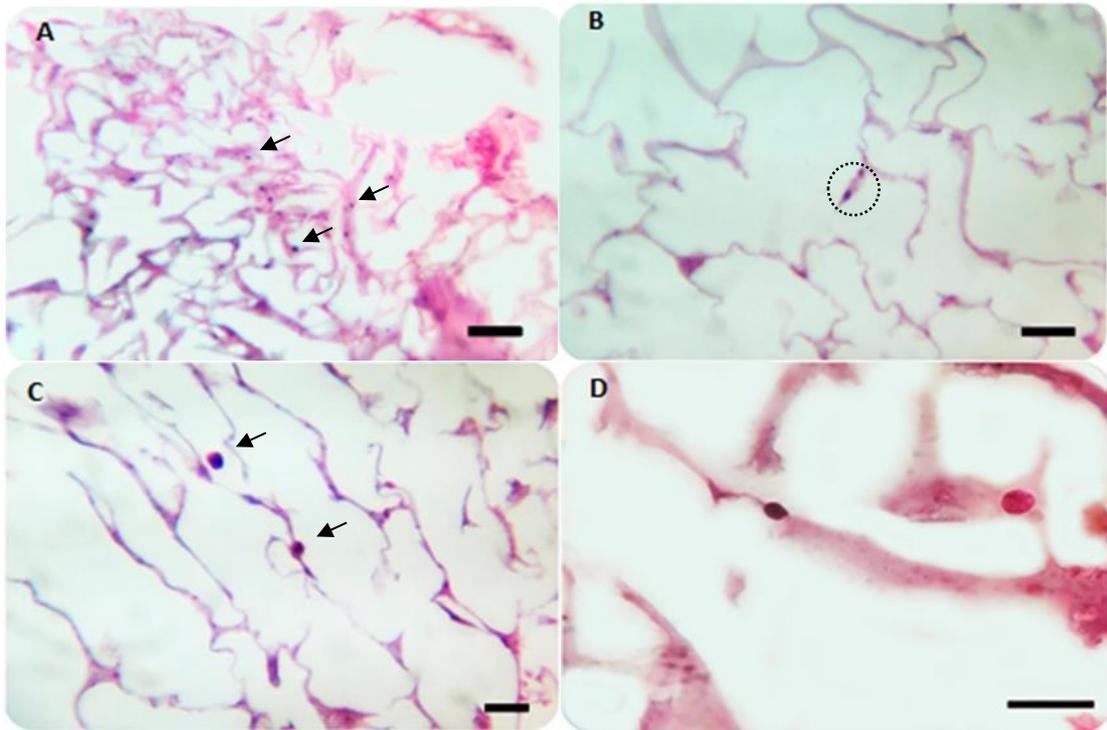


Outros trabalhos com protocolos semelhantes na fabricação de *scaffolds* para cultivo celular, com compostos diferentes, forneceram resultados satisfatórios na sua produção e uso (ANNAPOORNA et al., 2013; FERNANDES et al., 2011; SOUMYA et al., 2012). Para Oréfice et al. (2006) no processo de congelação/liofilização, a solução contendo a mistura dos polímeros é rapidamente resfriada com o objetivo de congelar o solvente utilizado no processo. Com a liofilização, a pressão da solução é reduzida para permitir a sublimação do solvente, formando os poros, que antes eram preenchidos pelo solvente congelado, e permitindo através desse método, estruturas com porosidades acima de 90%.

Quanto à sua aplicabilidade, o *scaffold* desenvolvido mostrou-se eficaz como suporte para o crescimento de CTMPDh. As células semeadas sobre a matriz apresentaram boa fixação e crescimento, observados por meio da MEV e microscopia de luz. O *scaffold* manteve-se íntegro, durante os sete dias, submerso em meio de cultivo, não ocorrendo desintegração quando colocado no meio aquoso.

A avaliação histológica do *scaffold*, pelo método de inclusão em parafina e coloração com HE (hematoxilina/eosina), demonstrou que as CTMPDh apresentaram morfologia típica, capacidade de fixação e distribuição adequada pelo interior dos poros da matriz. A maioria das células apresentou morfologia esférica, aderidas à membrana de goma de caju e quitosana. Algumas células apresentaram-se com morfologia fusiforme e fibroblastóide, características estas também típicas, para as CTMPDh (Figura 10).

Figura 10. Corte histológico evidenciando a fixação e morfologia de CTMPDh (foco principal) aderidas às membranas do *scaffold* (foco secundário). **A**, Células arredondadas aderidas à membrana da matriz (setas). (Objetiva 10x, barra: 200 μm) **B**, Célula fusiforme ligada à membrana da matriz (círculo) (Objetiva 10x, barra: 200 μm). **C**, Células arredondadas aderidas e soltas à matriz (setas) (Objetiva 40x, barra: 50 μm) e **D**, Células arredondadas aderidas à matriz (Objetiva 100x, barra: 25 μm). Lâmina histológica corada com HE.

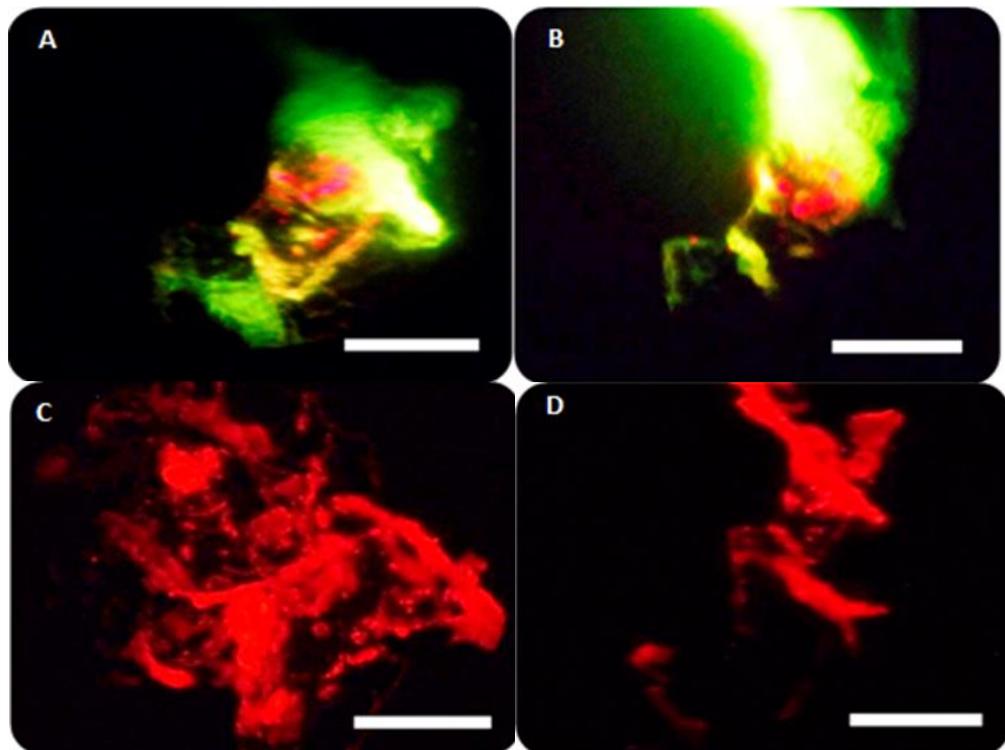


A principal função de um *scaffold* é fornecer um suporte temporário com capacidade suficiente para manter sua estrutura enquanto ocorrem a adesão, proliferação e diferenciação celular (JONES et al., 2009). A adesão das células a biomateriais mostra-se relevante pois após aderidas, as células iniciam seu processo de espalhamento, divisão e produção de matriz extracelular (DEWEZ et al., 1998). Quando as células semeadas não conseguem aderir ao *scaffold*, a apoptose celular é induzida e conseqüentemente, ocorre a autodestruição celular (CHEN et al., 2013).

Chan et al. (2002) descrevem que a utilização de nanocristais no rastreamento celular, consiste de um método rápido, que libera cristais fluorescentes no citoplasma de células vivas e que podem ser rastreados por várias gerações celulares, por possuírem ainda a capacidade de fluorescência ativa. Este fato foi observado neste estudo, mediante cortes histológicos do *scaffold* com as CTMPDh-nac (Figura 11), mostrando que se apresentavam vivas e aderidas às membranas do *scaffold*, em acordo com ensaios utilizando estes cristais para rastreamento

celular em estudos *in vivo* (COSTA, 2015; OLIVEIRA et al., 2009; ROSEN et al., 2007). Ainda, Rocha (2015), demonstrou comportamento similar isolando CTM da medula óssea de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*), as quais apresentaram a fluorescência dos nanocristais mesmo após cinco passagens destas células *in vitro*.

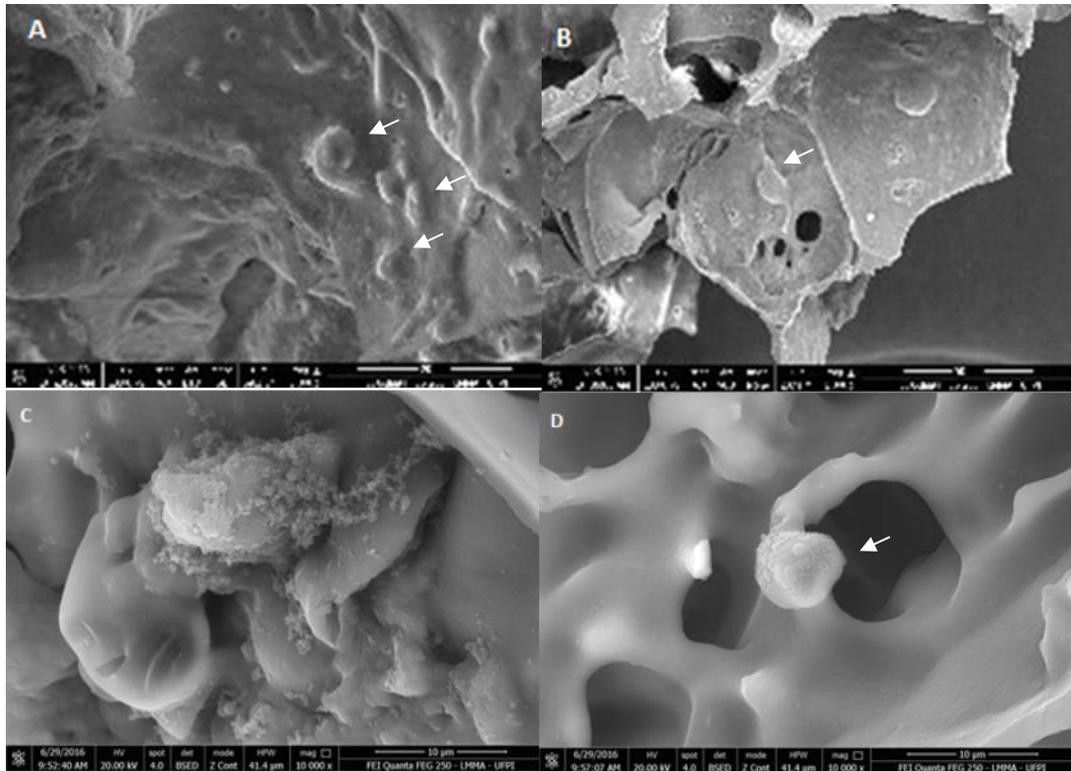
Figura 11. Fotomicrografias de fluorescência de CTMPDh marcadas com Qdots e incorporada em *Scaffold*. A e B com o uso do filtro verde e C e D, com filtro vermelho. Corte parafinizado sem coloração. (Objetiva 10x, barra: 50 μ m).



A microscopia eletrônica de varredura revelou uma matriz de superfície porosa, com presença de células fixadas no interior dos poros, com morfologia e distribuição condizente com a descrição histológica (Figura 12).

Figura 12. Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do scaffold com CTMPDh aderidas. Em (A) e (B) MEV evidenciando as CTMPDh com morfologia arredondada fixadas ao *scaffold*

fabricado (setas). Em (B) CTMPDh exibindo prolongamento citoplasmático (seta). (C) Célula circundada por matriz extracelular. (D) Célula em poro do *scaffold* (seta). Análise após 7 dias de cultivo.



A análise morfológica realizada por meio da microscopia de luz e da microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrou que o *scaffold* desenvolvido neste estudo apresentou a capacidade de promover a adesão das CTMPDh semeadas sobre o mesmo. As células cultivadas durante sete dias sobre o *scaffold*, apresentaram íntimo contato com a matriz em diversos pontos, mantendo-se íntegras, fato este evidenciado principalmente pelos cortes histológicos realizados por todo o *scaffold*. Estes resultados apontam para a eficiência da matriz desenvolvida em funcionar como um arcabouço para crescimento celular, e que o tamanho e interconectividade dos poros foram adequados, já que houve adesão e integração celular, mostradas por essas técnicas.

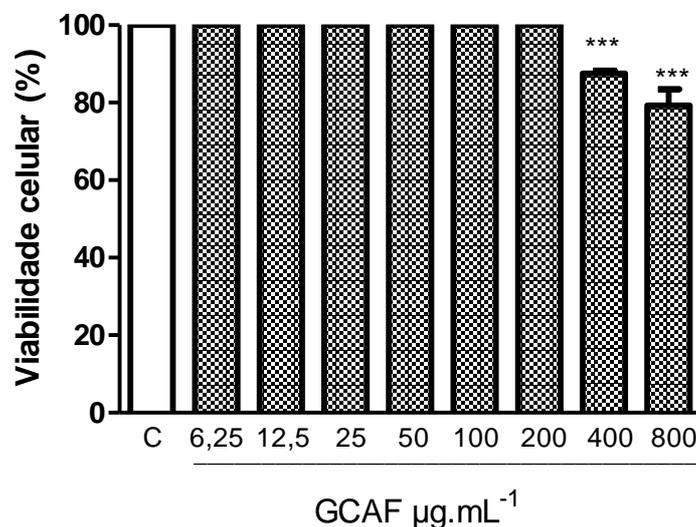
Estudo realizado com *scaffolds* de quitosana em associação com alginato mostrou adesão celular similar (LI et al., 2005). Da mesma forma, Malafaya et al. (2005), utilizando *scaffolds* de quitosana semeados com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano, evidenciaram a boa integração destas células ao mesmo.

Uma das formas de avaliar a biocompatibilidade de *scaffolds*, além da análise morfológica das células em contato, é utilizado teste complementar de redução do MTT a azul

de formazan, que indica a atividade mitocondrial e das enzimas desidrogenases das células em contato (GRANJEIRO, 2011). Para Mundstock et al. (2012) verificando a viabilidade celular pelo teste de citotoxicidade do material, avaliando a biocompatibilidade e sua ação sobre os sistemas biológicos, citam que é indispensável à realização de testes com novos materiais em estudos *in vitro* e *in vivo*. Granjeiro (2011) ressalta que diferentes tipos celulares, apresentam diferentes sensibilidades aos compostos químicos utilizados.

A GCAF apresentou redução na viabilidade celular apenas nas concentrações mais altas (400 e 800), no entanto ainda com sua CC_{50} superior a $1000 \mu\text{g/ml}^{-1}$ (Gráfico 1), a qual representa a segurança deste polissacarídeo para fabricação de compostos, matrizes e biomateriais utilizadas para cultivo celular e testes *in vivo*. Resultado semelhante foi observado com a solução da quitosana, utilizada para fabricação do *scaffold* em estudo. A viabilidade celular foi reduzida apenas na concentração de $800 \mu\text{g/ml}^{-1}$ e sua CC_{50} apresentou-se superior a $1000 \mu\text{g/ml}^{-1}$ (Gráfico 2), demonstrando assim sua segurança para testes biológicos.

Gráfico 1: Efeito da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana

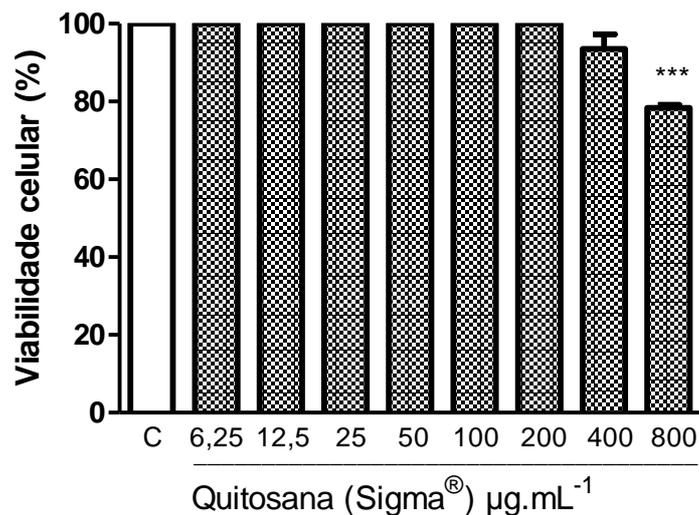


As CTMPDh foram incubadas com diferentes concentrações de goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico. Foi realizado ANOVA *One Way*, sendo $***p < 0,001$. C – Controle.

Yamassaki (2013) demonstrou que a goma de cajueiro não diminuiu a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos, tanto em 24 quanto em 48 h, sugerindo baixa citotoxicidade nas concentrações testadas.

Os ensaios celulares são relevantes, pois fornecem respostas similares às dos tecidos, sendo usados na descoberta de novos fármacos, visando à identificação da atividade citotóxica para segurança na sua utilização (LINARES, 2013). O sal tetrazóico (MTT) ao ser incubado com células em plena atividade metabólica atravessa a membrana plasmática e, ao entrar em contato com o superóxido produzido pela atividade mitocondrial é reduzido pelo succinatodesidrogenase presente nas mitocôndrias a MTT-formazan. Os cristais formados são insolúveis em água, contudo são solubilizados em meio DMSO e apresentam coloração violeta. Assim, a viabilidade celular é diretamente proporcional a intensidade da coloração. (GALDINO et al., 2014; SILVA, 2012).

Gráfico 2: Efeito da quitosana sobre a viabilidade de células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana



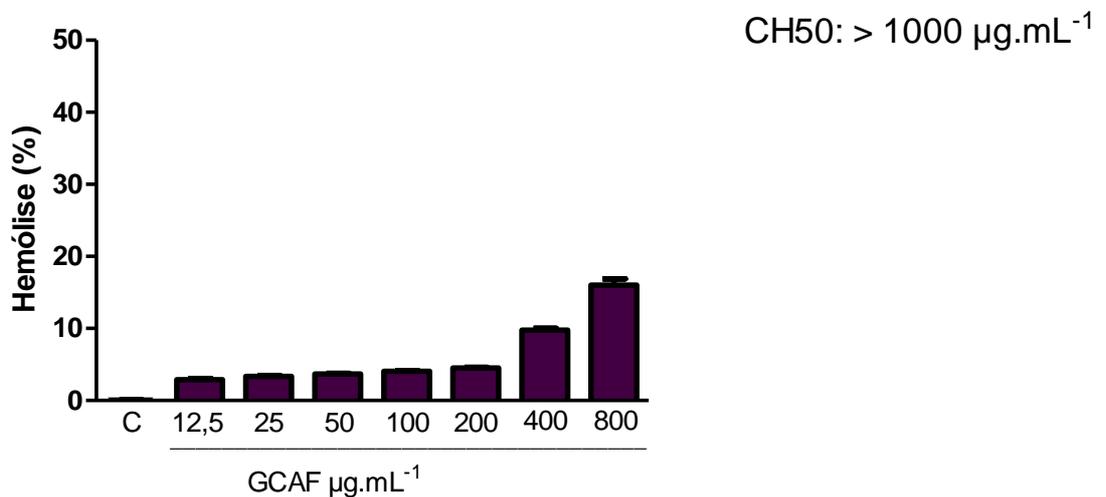
As CTMPDh foram incubadas com diferentes concentrações da quitosana. Foi realizado ANOVA *One Way*, sendo *** $p < 0,001$. C – Controle

O teste de citotoxicidade é útil principalmente para avaliar se o material tem a capacidade de produzir efeitos letais ou subletais no meio biológico a nível celular e deve ser aplicado a todos os tipos de biomateriais (PEREIRA, 2008).

A avaliação da atividade hemolítica da GCAF confirma e complementa o resultado da viabilidade celular utilizando o método do MTT, evidenciando que este polissacarídeo apresenta grande potencial para aplicação na área clínica, uma vez que o mesmo apresentou taxa de hemólise inferior a 20% e CH_{50} superior a 1000 µg/ml⁻¹ (Gráfico 3).

Este resultado apresenta-se condizente com a literatura, onde é descrito que a lise da membrana dos eritrócitos com consequente liberação da hemoglobina para o plasma, chamada de hemólise, pode ocorrer em virtude do uso de substâncias ou compostos utilizados, como medicamentos e plantas medicinais (PAULA et al., 2014). Em laboratórios, este teste vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais e de interesse pecuário (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

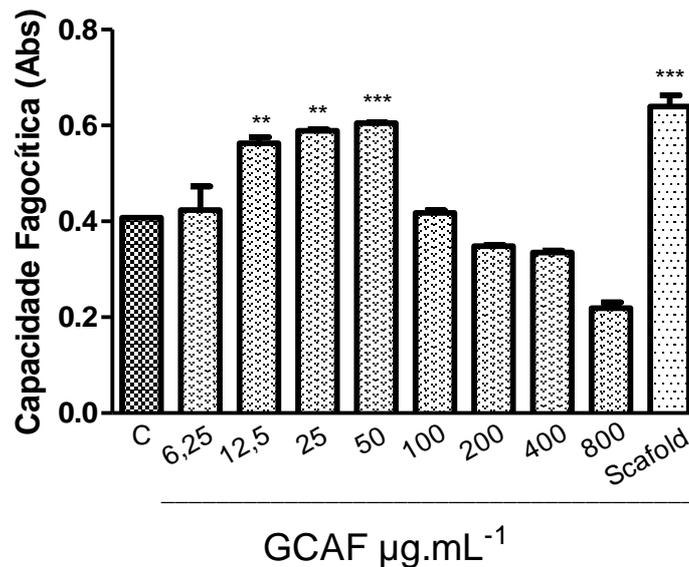
Gráfico 3: Efeito da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico sobre eritrócitos de caprinos



Eritrócitos de caprino foram incubados em diferentes concentrações de goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico. Foi realizado ANOVA *One Way*, sendo $*p < 0,05$. C – Controle.

Quando avaliada em relação à capacidade de ativação dos macrófagos, a solução da GCAF apresentou uma redução da sua atividade, a partir da concentração de $100 \mu\text{g/ml}^{-1}$. Infere-se que este fato pode ter ocorrido em virtude da diminuição da viabilidade celular observada no teste de citotoxicidade através do MTT. No entanto, pode-se observar que houve um aumento significativo na ativação dos macrófagos quando utilizado o *scaffold* fabricado. Com este resultado, pode-se deduzir que a atividade fagocítica dos macrófagos aumentou devido a degradabilidade do *scaffold* em contato com as células (Gráfico 4), característica desejável em polímeros e dispositivos sólidos, e refere-se ao fato de quando implantados no sistema, sofrerem degradação por partículas biológicas e também dispersão celular (BOLSON et al., 2005), formando fragmentos ou outros subprodutos (TAMAI et al., 2002).

Gráfico 4: Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com a goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico e sobre *scaffold* fabricado



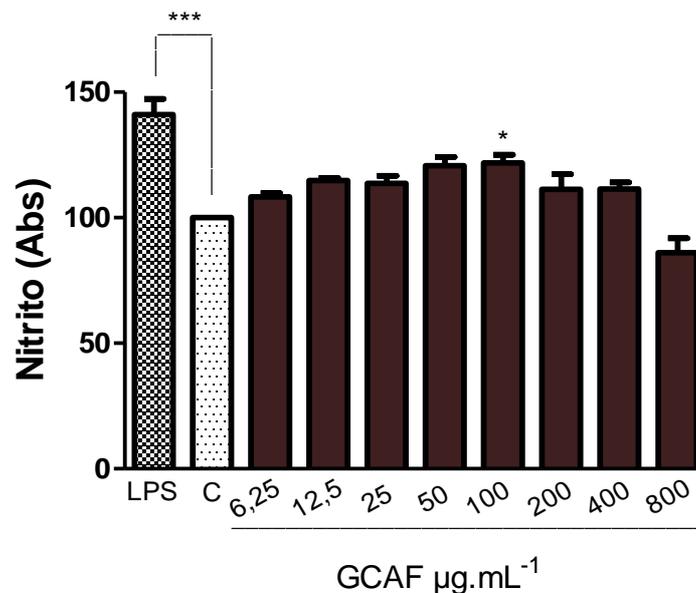
A fagocitose das partículas de zimosan foi determinada colorimetricamente após a solubilização da GMAF e sobre o *scaffold* fabricado. Foi realizado ANOVA *One Way*, sendo ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. C – Controle.

Bispo (2009) afirma que as matrizes híbridas, utilizadas na regeneração tecidual, são produzidas visando potencial para se degradarem na proporção que ocorre a regeneração do tecido danificado.

Outro parâmetro utilizado na verificação do processo de ativação de macrófagos, foi a avaliação da síntese do óxido nítrico (Gráfico 5). Esta síntese, ocorre após ativação da expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), que apresenta pequena expressão em macrófagos não ativados. Estas células utilizam desta via de sinalização para eliminação de microorganismos e moléculas fagocitadas (KORHONEN et al., 2005). Os resultados desta pesquisa sobre o teste do óxido nítrico demonstraram uma redução da atividade dos macrófagos a partir da concentração de $200 \mu\text{g/ml}^{-1}$, que pode ter ocorrido em virtude da diminuição da viabilidade celular mostrada no teste do MTT. O aumento da atividade dos macrófagos ocorreu até a concentração de $100 \mu\text{g/ml}^{-1}$, no entanto ainda assim, esta atividade não apresentou superior a atividade do LPS, utilizado como controle positivo no estudo, e que induziu ao

máximo a atividade fagocítica dos macrófagos. Esse aumento na produção de NO nas células aponta provavelmente para um papel imunomodulatório adicional da GCAF.

Gráfico 5: Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com a goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) modificada com anidrido ftálico



O óxido nítrico foi dosado a partir da concentração de nitritos produzido por macrófagos tratados com GCAF. Foi realizado ANOVA *One Way*, sendo $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$. C – Controle e LPS – Lipopolissacarídeo.

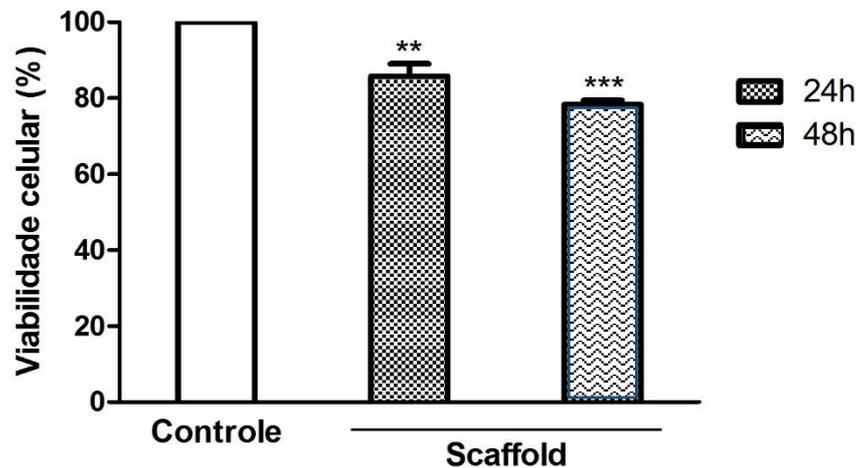
A avaliação da citotoxicidade do *scaffold* sobre as CTMPDh, demonstrou uma pequena redução na viabilidade celular nos dois tempos avaliados, 24 e 48 horas, não chegando a atingir 20%, o que pode ter ocorrido em virtude da migração das células para o interior do *scaffold* (Gráfico 6).

Uma propriedade crucial para o estabelecimento de um *scaffold* é a capacidade de possuir poros interconectados, favoráveis à adesão e crescimento celular. Conforme demonstrado microscopicamente o preenchimento das células nos poros, pode-se inferir que as células já aderidas ao fundo da placa, ao entrarem em contato com *scaffold*, migraram para o seu interior, interferindo na concentração celular avaliada pelo teste do MTT das células aderidas na placa.

A migração das células para interior dos poros do *scaffold*, foi verificada também por Galdino et al. (2014) utilizando *scaffolds* de hidroxiapatita – titânia, no qual observaram

coloração roxa dos *scaffolds* após teste com MTT, indicando que as células estavam presentes no interior dos poros permanecendo viáveis em contato com o material.

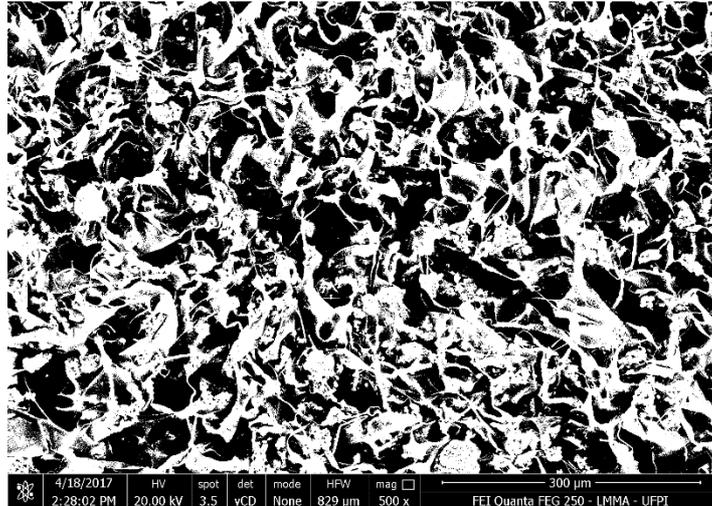
Gráfico 6: Viabilidade celular de células-tronco mesenquimais da polpa dente humano avaliada pelo método do MTT após 24 e 48h de incubação com *scaffold* desenvolvido



O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100% de viabilidade. Foi realizado ANOVA *One Way*, sendo ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Ao analisar o tamanho dos poros do *scaffold* mediante software ImajeJ, verificou-se em sua estrutura microporos e macroporos, com dimensões variando entre 73 μm à 124 μm , com tamanho médio de 86 μm (figura 13). Outros estudos utilizando mesma metodologia de análise para determinação de tamanho de poros de *scaffolds* já foram realizados (MACEDO, 2013; WATTANUTCHARIYA E CHANGKOWCHAI, 2014). Baseado no estudo realizado por Majore et al (2009), mostrando que o tamanho das células mesenquimais podem variar de 11 à 19 μm , acredita-se que o tamanho dos poros apresentados no *scaffold* desenvolvido neste estudo seja suficiente para o crescimento celular, possibilitando a troca de nutrientes e metabólitos entre as células permeadas no interior da material.

Figura 13. Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do *scaffold* modificada através do software ImajeJ para mensuração do tamanho dos poros.



Wattanuchariya, Changkowchai (2014), produziram *scaffolds* a base de quitosana-gelatina/hidroxiapatita, obtendo dimensões de poros variando de 50 a 350 µm. Na literatura é relatado que o tamanho, distribuição e conectividade dos poros nos *scaffolds* são fatores importantes na determinação de sua funcionalidade e que poros extremamente grandes podem prejudicar a vascularização do biomaterial por dificultar o contato entre as células (BRAGHIROLI, 2012).

Matrizes porosas tridimensionais apresentam superfície e tamanhos dos poros ideais para promoverem a migração, proliferação e diferenciação celular. Quando utilizadas junto com células mesenquimais, são capazes de promover a remodelação e formação de tecido conjuntivo, em toda região onde o mesmo é necessário (ORÉFICE et al., 2006).

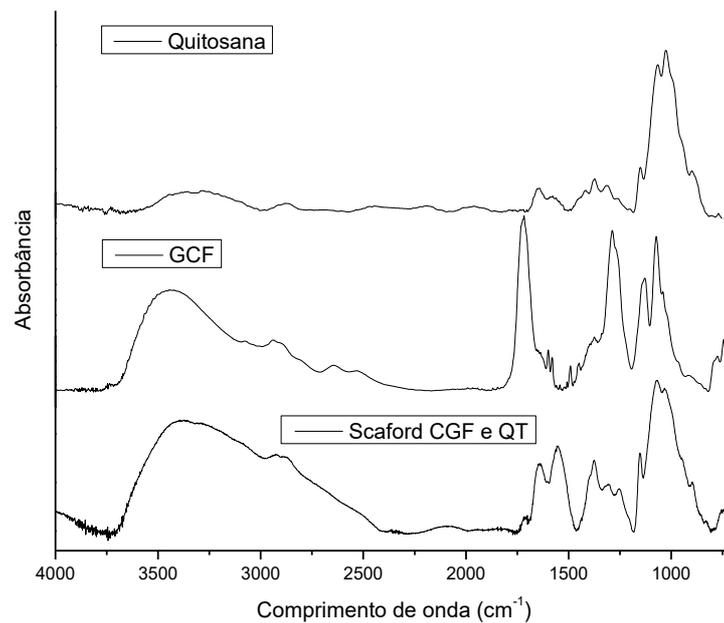
Na análise da capacidade de absorção de água do *scaffold* produzido, verificou-se taxa de intumescimento equivalente à 96,4%, corroborando com estudo realizado por Wattanuchariya, Changkowchai (2014) que apresentaram taxa de intumescimento de 95,5% para *scaffold* produzido a base de quitosana/gelatina/hidroxiapatita, afirmando que quanto maior e mais rápida a capacidade de expansão e inchaço do *scaffold*, mais benéfico ao sistema esta característica se apresenta.

Para realização da caracterização físico-química dos polímeros utilizados e do *scaffold* fabricado, foram desenvolvidos testes de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), difração de raios X (DRX) e análise termogravimétrica (TGA).

No espectro do FT-IR da quitosana (gráfico 7), assim como apresentado na literatura (MACEA et al., 2015; MESSA et al., 2016), foi observado uma banda em torno de 3412 cm⁻¹

referente ao estiramento axial de OH, sobreposta à banda de estiramento N-H. A banda em 2880 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico do grupo C-H. O espectro, apresentou ainda bandas de 1650 a 1560 cm^{-1} referentes à presença de bandas de amida I e II, respectivamente. Bandas típicas em 1065 a 1035 cm^{-1} foram observadas para estiramento C-O em grupo éter. A GCAF apresentou banda larga em 3650 a 3100 cm^{-1} referentes a estiramento O-H, banda em 1755 cm^{-1} caracterizando a presença da carbonila de grupos $-\text{COOH}$, a qual representa o maior indício da modificação com anidrido ftálico, banda em 1300 a 1231 cm^{-1} referente ao estiramento do C-O. As bandas das regiões de 1125 a 1030 cm^{-1} , podem ser atribuídas a estiramentos de vibração referentes aos grupos éter da ligação glicosídica e deformação de $-\text{OH}$, álcool (CHADLIA; FAROUK, 2010; SILVA et al. 2010; VIEIRA et al., 2010). No espectro do *scaffold* produzido o aparecimento de novas bandas na região de $1560\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$ atribuídos a grupos NH_3^+ é um indício da formação de complexo polieletrólítico entre a goma modificada e a quitosana (SILVA et al. 2010).

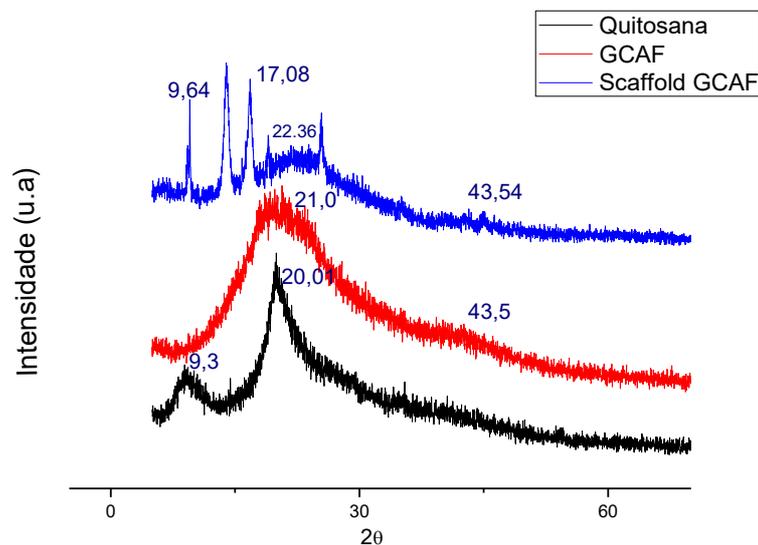
Gráfico 7: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da quitosana, da GCAF do *scaffold* fabricado



A técnica difratometria de raios X foi utilizada para identificar a estrutura cristalina dos polímeros e do *scaffold*. Assim, os difratogramas da GCAF, da quitosana e do *scaffold* sintetizado são observados no gráfico 8.

No difratograma da quitosana, observou-se a presença de picos característicos para este material, já citados por Monteiro (1999), com 2θ igual a $9,3^\circ$ e $20,1^\circ$ respectivamente. No difratograma da GCAF foi possível observar um primeiro pico largo em 2θ igual a $21,0^\circ$ e um segundo pico mais discreto com 2θ igual a $43,5^\circ$. No DRX do *scaffold*, observou-se que após a interação da GCAF com a quitosana, o material formado apresentou uma maior cristalinidade devido apresentar picos mais definidos em sua estrutura o que pode inferir o sucesso da interação entre os dois polímeros. Além disso, foram verificados a presença de picos característicos para a quitosana, representados em 2θ por $9,7^\circ$ e $17,1^\circ$, este último apresentando um leve deslocamento provavelmente em virtude da interação com a GCAF. Nesse contexto, os picos presentes em 2θ igual a $22,0^\circ$ e $43,5^\circ$ mostram-se característicos aos presentes na GCAF, apresentando no primeiro pico um deslocamento e diminuição do mesmo, passando de $20,0^\circ$ para $22,0^\circ$. Houve ainda o aparecimento de novos picos, com valores em 2θ de $14,0^\circ$ e $25,4^\circ$, que pode ter ocorrido devido o surgimento de novas ligações de hidrogênio proporcionado pela interação entre a quitosana e a GCAF sugerindo assim que a interação entre os materiais quitosana e GCAF ocorreu de forma satisfatória.

Gráfico 8: Difractometria de Raios X da quitosana, da GCAF e do *scaffold* fabricado



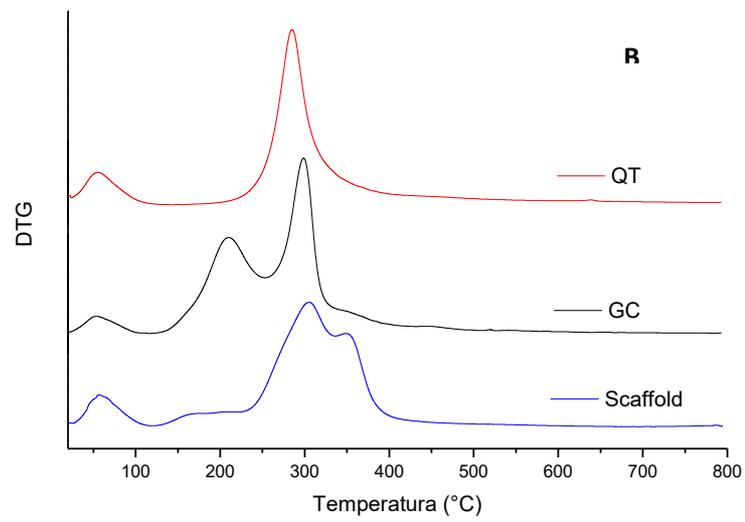
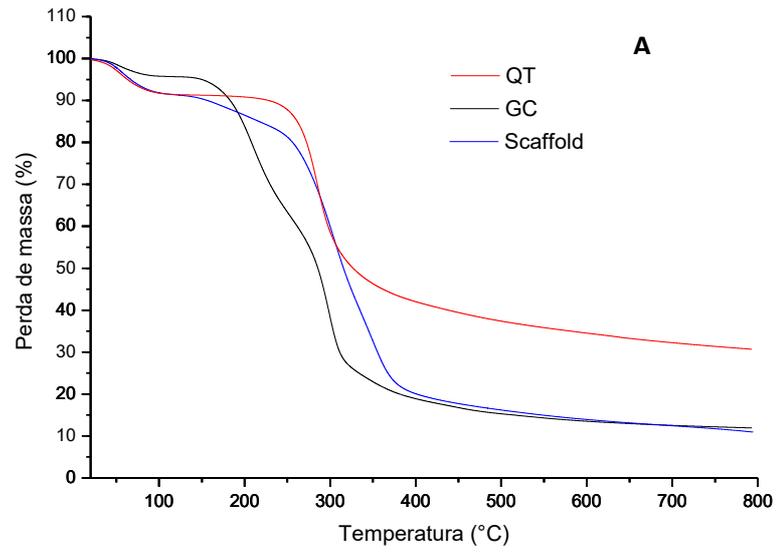
A análise termogravimétrica para os polímeros e o *scaffold* é apresentado no gráfico 9, no qual demonstra o perfil de decomposição dos mesmos. Para a quitosana, o perfil de decomposição ocorreu em 2 eventos. O primeiro foi observado na temperatura de 52°C , sendo este referente a água fisisorvida. O segundo evento, representativo da maior perda de massa,

foi entre 210 e 391 °C, totalizando 60% de massa perdida, e indicando a completa decomposição do material, pois a partir deste evento não houve o surgimento de novos picos no DTG (gráfico 9B). Este resultado corrobora com estudo desenvolvido por Furuya (2015) que apresentou também 2 eventos de perda de massa para a quitosana com picos exotérmicos em 61 e 299 °C, este último apresentando também 57, 4% de perda de massa.

O perfil termogravimétrico da GCAF ocorreu em 3 eventos. O primeiro evento, assim como na quitosana, apresentou-se na temperatura de 52 °C, sendo da mesma forma, referente a perda de compostos voláteis. Na temperatura de 135 °C iniciou-se o segundo evento, havendo no mesmo a perda de 72% de massa que pode ter ocorrido em virtude da quebra e saída de grupos funcionais do polissacarídeo. O terceiro e contínuo evento é finalizado na temperatura de 471 °C com a completa decomposição do material.

A curva termogravimétrica do *scaffold* apresentou 4 eventos. O primeiro evento, assim como na quitosana e na GCAF, ocorreu na em virtude da perda de compostos voláteis na temperatura de 56 °C. O segundo, porém discreto evento, inicia-se na temperatura de 138 °C, corroborando neste ponto, com o início do segundo evento apresentado na curva da GCAF. O evento 3 aparece em temperatura semelhante à verificada na GCAF e quitosana, em torno de 300 °C, seguido pelo quarto e último evento que ocorre na temperatura de 354 °C e apresenta cerca de 30% de perda de massa. O *scaffold* produzido apresentou temperatura de decomposição maior que os polissacarídeos usados para sua fabricação. Esse fato pode ter ocorrido em virtude da quebra e formação de novas ligações, proporcionando ao *scaffold* maior estabilidade térmica e maior temperatura de decomposição que os demais polissacarídeos. Já, Furuya et al. (2015) avaliando curva termogravimétrica de *scaffold* a base de quitosana, observaram apenas 2 eventos de perda de massa. O primeiro evento de acordo com a primeira perda de massa do *scaffold* e o segundo, conforme o terceiro evento de perda de massa do *scaffold* em estudo, aproximadamente a 350 °C.

Gráfico 9: Curvas termogravimétricas para a quitosana, GCAF e *scaffold* fabricado. A (TG) B (DTG).



5 CONCLUSÃO

O *scaffold* fabricado à base de quitosana e GCAF, apresenta aplicabilidade para cultivo celular *in vitro*, atuando como uma matriz de suporte para o crescimento das células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária humana (CTMPDh). Surge, portanto, como um importante biomaterial a ser utilizado como suporte e meio de transporte de células em processos de regeneração tecidual.

Os polímeros utilizados na fabricação do *scaffold*, não apresentaram efeitos tóxicos, como também, o *scaffold* desenvolvido, evidenciando-se, assim sua propriedade biocompatível e possibilidade de utilização para testes *in vitro* e *in vivo*.

A caracterização físico-química mostrou que o *scaffold* desenvolvido apresentou maior cristalinidade proporcionada pela interação positiva entre quitosana e a GCAF, demonstrando ainda melhor estabilidade térmica que os polímeros individuais, avaliada por meio da análise termogravimétrica.

Considerando o período de duração deste ensaio, de apenas sete dias, acredita-se que as células tendem a preencher por completo os poros, porém, se faz necessária a realização de ensaios com período mais longo para avaliar a ocorrência desse preenchimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV), Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada (LMMA) e Laboratório de Atividades Anti-leishmania, Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB) da Universidade Federal do Piauí, pelo apoio na realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W., et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**. Vol. 58, p.1688–1713, 2006.
- AGHA-HOSSEINI, F. et al. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. **Clin Transplant, Tehran**, v. 24, n. 2, p. 23-28, 2010.
- ALSALAMEH, S.; et al. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, v. 50, p. 1522-1532, 2004.
- ANDRADE, K.C.S.; CARVALHO, C.W.P.; TAKEITI, C.Y.; AZEREDO, H.M.C.; CORRÊA, J.S.; CALDAS, C.M. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): Avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, v. 23, n. 5, pp 1-5, 2013.
- ANNAPOORNA, M., et al. Biochemical properties of *Hemigraphis alternata* incorporated chitosan hydrogel *scaffold*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1561– 1565, 2013.
- AROSARENA, O. Tissue engineering. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v.13, n.4, Aug, p.233-41. 2005.
- AZEREDO, H. M. C. de; MAGALHÃES, U. S.; OLIVEIRA, S. A.; BRITO, E. S.; RIBEIRO, H. L. Filmes comestíveis de alginato e goma de cajueiro. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 3 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 168).
- AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Monografia. Faculdade de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.
- AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p. 27-34, 2007.
- ATALA, A. Engineering tissues, organs and cells. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, 1: 83–96, 2007.
- BADDOO, M.; et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. **J. Cell. Biochem.**, v. 89, p. 1235-1249, 2003.
- BALIC, A. et al. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone*, v. 46, p. 1639-1651, 2010.

BARRY, F.P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Birth defects Research Part C: Embryo Today**, v.69, p.250-256, 2003

BATOULI, S.; MIURA, M.; BRAHIM, J.; TSUTSUI, L.W.; FISHER, L. W.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P. G. SHI, S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. **J Dent Res**, v. 82, n.12, 976-981, 2003.

BISPO, V. M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. Belo Horizonte, 2009, 206 páginas. Tese de Doutorado (Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica e Minas) Universidade Federal de Minas Gerais.

BIEBACK K, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, v.22, n.4, p.625-634, 2004.

BOLSON, J. et al. Análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*), submetido ao implante da poliuretana derivada do polímero de mamona (*Ricinus communis*). **Ciencia Rural**, v.35, n.5, p.1123-1130, 2005.

BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v.30, n.10, p.546-549, 2012.

BRAGHIROLI, D.I. **Produção de scaffolds contendo células-tronco para uso na engenharia de tecidos através da associação das técnicas de electrospinning e bio-electrospraying**. Porto Alegre, 2012, 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BRODY, D. E.; BRODY, A. R. *As Sete Maiores Descobertas Científicas da História, Parte 2*, Cia das Letras, São Paulo, 2000.

BURG, K. J. L.; PORTER, S.; KELLAM, J. K. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials, Surrey**, v.21, n.23, p. 2347- 2359, 2000.

CAMPOS, D.A.; RIBEIRO, A.C.; COSTA, E.M.; FERNANDES, J.C.; TAVARIA, F.K.; ARARUNA, F.B.; EIRAS, C.; EATON, P.; LEITE, J.R.S.A.; PINTADO, M.M. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v.90, pp 270-274, 2012.

CARVALHO, P. H. et al. Differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell into cardiomyocytes. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.100, n.1, p. 82-89, 2013.

- CARVALHO, Y.K.P. et al. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesq. Vet. Bras**, v.35, n6, 2015.
- CASAGRANDE, L.; LAUXEN, I. S.; FERNANDES, M. I. O Emprego da Engenharia Tecidual na Odontologia. **Rev. Fac. Odontol.** Porto Alegre, v. 50, n. 1, p. 20-23, jan./abr., 2009.
- CHADLIA, A.; FAROUK, M. M. Chemical modification of Posidonia with cyclic anhydrides: effect on thermal stability. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 2, p. 264–269, 2010.
- CHAN, C.W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. **Analytical biotechnology**. v.13, n.1, p.40-46. 2002.
- CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G.A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v.38, p.586-591, 2013.
- CHIN, K. L.; AHMAD, S. H. Biomedical-Grade Chitosan in Wound Management and its Biocompatibility in vitro. **Biopolimers**. Scyo, v. 1, p 19-36, 2010.
- CORDEIRO, M.M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, Chicago, v. 34, no. 8, p.962-969, Aug. 2008.
- COSTA, C. R. M. **Ensaio clínico com células-tronco derivadas do tecido adiposo na reparação da glândula mamária de caprinos com mastite**. Teresina, 2015, 107 páginas. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Piauí.
- CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos na biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, 32, 649-660, 2009.
- DASH, M.; et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981 - 1014, 2011.
- DENG, B. et al. Delivery of alginate-chitosan hydrogel promotes endogenous repair and preserves cardiac function in rats with myocardial infarction. **J Biomed Mater Res A**, v. 103, p.907-18, 2015.
- DEWEZ, J. L.; LHOEST, J. B.; DETRAIT, E.; BERGER, V.; DUPONT-GILLAIN, C. C.; VINCENT, L.-M.; SCHNEIDER, Y.-J.; BERTRAND, P. & ROUXHET, P.G. - **Biomaterials**, v.19, p.1441 ,1998.

- DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric *Scaffolds* in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal of Polymer Science**, v.2011, p. 1-20, 2011.
- DOMINGOS, M. **Caracterização mecânica e biológica de scaffolds produzidos por biocell printing**. Girona, 2012, 274 páginas. Tese de doutorado. Universidade de Girona.
- DI MARTINO, et al. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v.26, n.30, Oct, p.5983-90. 2005.
- DISSANAYAKA, W.L., et al. Characterization of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Canine Premolars. **J Endod**, v.37, p.1074–1080, 2011.
- DOMINICI, M. et al. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315–317, 2006.
- DOMINGOS, M., et al. Polycaprolactone *scaffolds* fabricate via bioextrusion for tissue engineering applications. **International Journal of Biomaterials**. vol 2009, Article ID 239643, 9 pages, 2009.
- DONATI, I., et al. The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan. **Biomaterials**, v.26, p. 987-998, 2004.
- FERREIRA, I. L. **Preparação e caracterização de biomateriais poliméricos para avaliação da viabilidade de uso como *phantom* biológico**. Uberlândia, 2016, 165p. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal de Uberlândia.
- FERNANDES, L. L. et al. Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan *scaffolds* for tissue engineering. **Polímeros**, vol. 21, nº 1, p. 1-6, 2011.
- FRIENDESTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**. Moscow, v. 16, n. 3, p. 581-390, 1966.
- FUNAKOSHI, T., et al. Novel chitosan based hyaluronan hybrid polymer fibers as a *scaffold* in ligament tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, vol. 74, no. 3, pp. 338–346, 2005.
- FURTADO et al., 2013 - Modificação Química de Goma de Cajueiro: Novas Características e Potencialidades de Aplicações. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 3 p. (Embrapa Agroindústria Tropical.Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 86).
- FURUYA, D. C. **Desenvolvimento e caracterização de *scaffolds* à base de fibras de alginato e quitosana para aplicações médicas**. São Paulo, 2015, 107 páginas. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo.

- GALDINO, A. G. S., et al. Análise de ensaios in vitro do compósito de 50% HA-50% TiO₂ fabricados pelo método da esponja polimérica. **Cerâmica**, 60, p 586-593, 2014.
- GE, Z., et al. Manufacture of degradable polymeric *scaffolds* for bone regeneration. **Biomed Mater**, v.3, n.2, Jun, p.1-11. 2008.
- GOMES, M.E. et al. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells culture on starch-based threedimensional *scaffolds*. **Journal Biomedical Materials Research**, v.67A, p.87-95, 2003.
- GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of dental research**, v. 81, n. 08, p. 531-535, 2002.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.
- HAU, G. R. et al. Levantamento preliminar sobre a possibilidade de obtenção de dentes de reposição a partir de células-tronco. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, 12 (2): 29-38, jun. 2006.
- HEINEMANN, C., et al. Novel Textile Chitosan *Scaffolds* Promote Spreading, Proliferation, and Differentiation of Osteoblasts. **Biomacromolecules** v.9, p.2913-2920, 2008
- HUTMACHER, DW. *Scaffold* design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives. **J Biomater Sci Polym**, v.12, n.1, pp 107-124, 2001.
- JO, Y. Y. et al. Isolation and Characterization of Postnatal Stem Cells from Human Dental Tissues. **Tissue engineering**, v. 13, n. 04, 2007.
- JONES, A. J., et al. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic *scaffolds* with bone ingrowth. **Biomaterials**. vol. 30; p. 1440-1451, 2009.
- KERKIS, I., et al. Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. **Cells Tissues Organs**, v.184: p.105-116, 2006.
- KOLYA, C. L.; CASTANHO, F. L. Células-tronco e a odontologia. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1, p. 165-171, 2007.
- KORHONEN, R. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current drug targets. **Inflammation and allergy**, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.
- KUZNETSOV SA, et al. Circulating skeletal stem cells. **J Cell Biol**, v.153, n.5, p.1133-1140, 2001.

- LI, Z. et al. Chitosan-alginato hybrid *scaffolds* for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.26, p.3919-3928, 2005.
- LINARES, I. A. P. Estudos citotóxicos de moléculas antitumorais e antiparasitárias em células de câncer de fígado (HepG2) e de fibroblasto de hamster (V79-4). São Carlos, 2013, 77 páginas. Dissertação Mestrado (Mestre em Ciências). Universidade de São Paulo.
- LOFGREN, S. E., et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197-202, 2008.
- MACEA, R. B. et. al. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. **Polímeros**, v. 25, n.1, p. 58-69, 2015.
- MACEDO, T. L. **Características estruturais e degradação de matrizes de poli(álcool vinílico)/ quitosana/ vidro bioativo obtidas por liofilização**. Belo Horizonte, 2013, 83 páginas. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em engenharia de minas e metalúrgica de minas). Universidade Federal de Minas Gerais.
- MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. Porous chitosan *scaffolds* for tissue engineering. **Biomaterial**, v. 20, p. 1133-1142, 1999.
- MAJORE, I., et al. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. **Cell Communication and Signaling**, 2009.
- MALAFAYA, P. B., et al. Chitosan particles agglomerated *scaffolds* for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.16, p. 1077-1085. 2005
- MARQUARDT, L.M.; HEILSHORN, S.C. Design of Injectable Materials to Improve Stem Cell Transplantation. **Curr Stem Cell Rep**, v.2, 2016.
- MARQUES, M. R; ALBUQUERQUE, L.M.B; XAVIER-FILHO. Antimicrobial and insecticidal activities of cashew tree gum exudate. **Ann. Appl. Biol.**, v.121, p. 371-377, 1992.
- MESSA, L. L. et al. Híbridos de quitosana-argila para encapsulamento e liberação sustentada do fertilizante nitrato de potássio. **Química Nova**, v.39, n.10, p.1215-1220, 2016.
- MIDIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan *scaffolds* for tissue engineering. **Biomaterials**, v.20, p.1133-1142, 1999

MIRANDA, S. C. C. C. **Engenharia de tecido ósseo a partir da cultura de células-tronco mesenquimais em matriz de quitosana-gelatina: avaliação in vitro e in vivo, em alvéolos dentários de ratos.** Belo Horizonte, 2010, 109 páginas. Tese de Doutorado (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais.

MIRANDA, R. L. Cashew Tree Bark Secretion – Perspectives for its use in protein isolation strategies. **Open Glycoscience**, v.2, p. 16-19, 2009.

MITTAL, A., et al. Integration of porosity and bio-functionalization to form a 3D *scaffold*: cell culture studies and in vitro degradation. **Biomed. Mater**, v.5, p.2-17, 2010.

MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v.100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.

MONTEIRO Jr, O. A. C; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **Biological Macromolecules**, v. 26, p. 119-128, 1999.

MOTHÉ, C. G.; CORREIA, D. Z.; Caracterização reológica de blendas de gomas de cajueiro e xantana em suco. **Analytica**, v.2, pp 59-64, 2002.

MOTHÉ, C. G.; RAO, M. A. Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. **Thermochim Acta**, v.358, p. 9-13, 2000.

MUNDSTOCK et al., 2012. Avaliação da biocompatibilidade de vidro e vitrocerâmica do sistema SNCP(-----). **Química Nova**, v.35, n.4, p.665-670, 2012.

OLIVEIRA, D. M., et al. Labeling of human mesenchymal stem cells with quantum dots allows tracking of transplanted cells engrafted in infarcted. **Eintein**, v. 7, p. 284-289, 2009.

ORÉFICE, R. L. Biomateriais; fundamentos e aplicações/ Rodrigo Lambert Oréfice, Marivalda de Magalhães Pereira, Herman Sander Mansur. – Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

OSÓRIO, E., et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.

PAINO, F., et al. Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes. **European Cells and Materials**, v. 20, p.295 – 305, 2010.

PAULA, H. C. B., et al. Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeri**, v.20, n.2, p. 112-120, 2010.

PEQUENO, N. F. & SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientia e Veterinariae**, v.34, n.1, p.45-48, 2006.

PEREIRA, L. V. A importância do uso de células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n. 1, p. 7-14, 2008.

PINO, A. M., ROSEN, C. J., RODRIGUEZ, J.P. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. **Bio Res**, v.45, p.279-287, 2012.

PISCIOTTA, M. et al. Human Dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. **BMC Developmental Biology**, v. 15, n.14, 2015.

PITTEMBERGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, n. 284, p. 143-147, 1999.

PORTO, B.C. **Efeito da alta pressão dinâmica nas propriedades tecnológicas da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*)**. Campinas, 2013, 109 páginas. Dissertação Mestrado (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

QUELEMES, P. V. et al. Quaternized cashew gum: an anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 567-575, 2017.

RANGEL, M.; BRAGANÇA, F. C. R. Representações de gestantes sobre o uso de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 11, n. 1, p. 100-109, 2009.

RIBEIRO, G.B.M. Obtenção de biomateriais porosos utilizando sílica coloidal como aglutinante. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2009.

ROCHA, A. R. **Roedor silvestre como fonte de células-tronco: Caracterização e multipotencialidade de células mesenquimais estromais e adiposas de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*)**. Teresina, 2015, 88 páginas. Tese de doutorado (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al. Chitosan and Its Potential Use as a *Scaffold* for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed Research International**, 2015.

ROSEN, A. B. et al. Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. **Stem cells**, v. 25, p. 2128-2138, 2007.

- SABER-SAMANDARI, S. et al. In vitro evaluation for apatite-forming ability of cellulose-based nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p.434 - 442, 2016.
- SANTOS JUNIOR, A. R.; WADA, M. L. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.
- SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F.; TAMBOURGI, E.B.; OLIVEIRA, L.A. A goma do cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*) como sistema inovador de extração líquido-líquido. **Exacta**. v.5, n.1, p. 145-154, 2007.
- SHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; FILHO, J. L. L.; LEÃO, A. M. A. C. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale L.* na fase inflamatória do processo cicatricial de camundongos. **Cienc. Rur.**, 36, 149-154, 2006.
- SILVA, A. R. P. **Avaliação da Diferenciação Osteogênica de Células-Tronco Do Tecido Adiposo Humano Cultivadas em Espuma de Vidro Bioativo e Biorreator de Perfusão para Engenharia de Tecido Ósseo**. 2012, Belo Horizonte, 148 páginas. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, de Minas e de Materiais). Universidade Federal de Minas Gerais.
- SILVA, D. A. et al. Polysaccharide-based nanoparticles formation by polyelectrolyte complexation of carboxymethylated cashew gum and chitosan. **Journal of Materials Science**, v. 45, p. 5605, 2010
- SILVA G.A., DUCHEYNE P., REIS R.L. Materials in particulate form for tissue engineering. Basic concepts, **J. Tissue Eng Regen Med**, 1: 4-24, 2007.
- SILVA, M. C. C. et al. Prospecção tecnológica: aplicação da goma do cajueiro (*anacardium occidentale*) em nanotecnologia. **Revista GEINTEC**, v.3, n.4, p.55-69, 2013.
- SOARES, G. D. A.; GRANJEIRO, J. M. Conceitos Básicos de Ciência e Engenharia de Materiais. In: José Mauro Granjeiro; Glória Dulce Soares de Almeida. (Org.). *Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações*. 1ed.São Paulo: VM Cultural Editora Ltda, 2011, v. 1, p. 21-30.
- SOUMYA, S., et al. Development of a phytochemical *scaffold* for bone tissue engineering using *Cissus quadrangularis* extract. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.1787– 1795, 2012.

SOUZA, C. F. S. et al. Células-tronco mesenquimais: Células ideais para regeneração cardíaca? **Rev Bras Cardiol Invasiva**, v.18, n.3, p. 344-353, 2010.

SUN, L. P. et al. Biological evaluation of collagen-chitosan *scaffolds* for dermis tissue engineering. **Biomed Mater**, v.4, n.5, Oct, p.1-6. 2009.

TAMAI, T. et al. Novel hidroxyapatite ceramics with in interconnective porous structure inhibit superior osteoconduction in vivo. **Journal Biomedical Materials Research**, n.59, p.110-117, 2002.

TORQUATO, D. S.; FERREIRA, M. L.; SÁ, G. C.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEVEDO, E. H. F. Evaluation of antimicrobial activity of cahew tree gum. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, p. 505-507, 2004.

VIEIRA, A. P. et al. Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babassu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp. **Chemical Engineering Journal**, v. 161, n. 1–2, p. 99–105, 2010

VITORINO FILHO, R.N.L. **Uso de Polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*) na terapêutica tópica de feridas.** Teresina, 2011, 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí.

VOLPANI, A.A.; PANG, Y.; SHARPE, P.T. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. **Trends Cell Biol**, v. 20, p. 715–722, 2010.

WATTANUTCHARIYA, W.; CHANGKOWCHAI, W. Characterization of Porous Scaffold from Chitosan-Gelatin/Hidroxyapatite for Bone Grafting. **Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists 2014**, Hong Kong, v. II, IMECS 2014.

WOBUS, A. M. e BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev**, v.85, n.2, Apr, p.635-78. 2005.

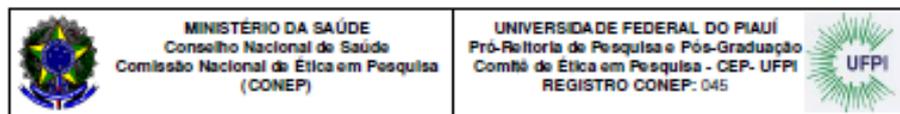
YAMASSAKI, F.T. **Caracterização química, atividade imunomoduladora e antioxidante de extratos aquosos e hidroalcoólicos da goma de exsudato vegetal de *Anacardium occidentale* L. e de folhas de *Persea americana* mill.** 2013, Curitiba, 140 páginas. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná.

YAN, L. P., et al. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic *scaffolds* for articular cartilage tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research**, Part A, vol. 95, no. 2, pp. 465–475, 2010.

ZUANAZZI J. A. S.; MAYORGA P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1421-1428, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1: Carta de Aprovação Comitê de Ética Humano



CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais provenientes da Polpa de Dentes Humanos.

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0218.0.045.000-11

Pesquisador Responsável: Carmem Milena Rodrigues Siqueira Carvalho

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

ANEXO 2: Comitê de Ética em Experimentação Animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Correlação entre os inibidores de crescimento Axonal NOGO A/OMG/AMG e a formação da cicatriz Glial em modelo animal de transecção dorsal da medula espinal", protocolo nº 143/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. MATHEUS LEVI TAJRA FEITOSA- NUPCelt/ CCA/ UFPI que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 17/06/2016.

Vigência do Projeto	Julho/ 2016 à Fevereiro/ 2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	40
Peso/ Idade	250± 50g/ 4 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério no Centro de Ciências Agrárias/UFPI.

Teresina, 17 de Junho de 2016.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-560
 Telefone (66) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

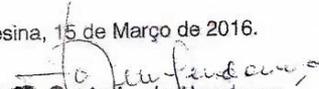


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do potencial de utilização de células-tronco no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e na regeneração *in vivo* de tecido ovariano lesionado", protocolo nº 117/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **MARIA ACELINA MARTINS DE CARVALHO- CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/03/2016**.

Vigência do Projeto	Abril/ 2016 à Dezembro/ 2018
Espécie/Linhagem	Caprinos/ Sem raça
Nº de Animais	20
Peso/ Idade	35-45 kg/ 2 anos
Sexo	fêmeas
Origem	Abatedouros credenciados à inspeção sanitária regional e fazendas de caprinos.

Teresina, 15 de Março de 2016.


Prof. Dr. Maria Acelina Martins de Carvalho
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO 3: Requerimento para solicitação de depósito de patente e declaração de tramitação da mesma



REQUERIMENTO

Ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal do Piauí:

O requerente solicita análise da documentação técnica e formal para fins de depósito/registro junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.

1. Dados do Requerente			
Nome civil completo: José Roberto de Souza de Almeida Leite			
Centro/Unidade: Faculdade de Medicina/UNB		Departamento: Morfologia	
Fone institucional: +55 31071891.	Celular: +55 11 974904394	E-mail: jrsaleite@gmail.com	
2. Dados do Objeto de Proteção			
O que o requerente deseja proteger? Marque com um "x" a opção desejada.			
<input checked="" type="checkbox"/> Patente <input type="checkbox"/> Marca <input type="checkbox"/> Programa de Computador <input type="checkbox"/> Desenho Industrial			
Título do Objeto de Proteção: MATRIZ POROSA DESENVOLVIDA À BASE DE QUITOSANA E GOMA DO CAJUEIRO (<i>Anacardium occidentale</i> L.) MODIFICADA COM ANIDRIDO FTÁLICO PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS			
3. Documentos anexados a este formulário			
Informar quantidade de folhas de cada documento ou de CD's necessários para depósito/registro.			
Documento	Qde.	Documento	Qde.
Relatório de Invenção	06fls.	Resumo (Patente)	01fls.
Dados dos Inventores	04fls.	Solicitação de Registro de <i>Software</i>	fls.
Termo de Ciência	02fls.	Declaração de contrato de Trabalho ou Vínculo Institucional (<i>software</i>)	fls.
Relatório Descritivo (Patente)	04fls.	Termo de Cessão (<i>software</i>)	fls.
Desenhos (Patente)	fls.	CD (código-fonte / <i>software</i>)	unid.
Reivindicações (Patente)	01fls.	Outro:	
3.1. Total de folhas anexadas (referentes ao campo 3): fls.			
4. Declaro:			
4.1 que a documentação técnica referente ao objeto de proteção foi elaborado de acordo com as Leis, Atos Normativos e Resoluções do INPI referentes à matéria do presente requerimento;			
4.2 sob penas da Lei, que todas as informações apresentadas neste formulário e em documentos anexos são completas e verdadeiras.			

Nestes termos, pede deferimento.

Local e Data

Assinatura do Requerente

ANEXO 4: Declaração de depósito de pedido de patente de invenção



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 10:06 horas do dia 08/06/2017, sob o número de Protocolo do INPI: 870170038899 o depósito de Pedido de Patente de Invenção intitulado “MATRIZ POROSA DESENVOLVIDA À BASE DE QUITOSANA E POLISSACARÍDEO EXSUDATO DA *Anacardium occidentale* L. MODIFICADO COM ANIDRIDO FTÁLICO PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS”, com o número **BR 10 2017 012139-9** desenvolvido pelos inventores:

JOSÉ ROBERTO DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE
 YULLA KLINGER DE CARVALHO LEITE
 NAPOLEÃO MARTINS ARGÔLO NETO
 MARIA ACELINA MARTINS DE CARVALHO
 DURCILENE ALVES DA SILVA
 ANTÔNIA CARLA DE JESUS OLIVEIRA
 PATRICK VERAS QUELEMES
 CAMILA ERNANDA SOUSA DE CARVALHO

Teresina, 23 de junho de 2017.

Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
 Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia