

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Carolina Landau Albrecht

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM *SCAFFOLDS* CONTENDO DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ALGINATO E CLORETO DE CÁLCIO COMO
ESTRATÉGIA EM MEDICINA REGENERATIVA**

Porto Alegre

2017

Carolina Landau Albrecht

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM *SCAFFOLDS* CONTENDO DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ALGINATO E CLORETO DE CÁLCIO COMO
ESTRATÉGIA EM MEDICINA REGENERATIVA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Fisiologia

Orientador: Prof^a Dr^a Patricia Pranke
Coorientador: Dr^a Natasha Maurmann

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Albrecht, Carolina Landau

Avaliação in vitro do comportamento de células-tronco mesenquimais em scaffolds contendo diferentes concentrações de alginato e cloreto de cálcio como estratégia em medicina regenerativa / Carolina Landau Albrecht. -- 2017.

67 f.

Orientadora: Patricia Pranke.

Coorientadora: Natasha Maurmann.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Células-tronco. 2. Engenharia de Tecidos. 3. Medicina Regenerativa. 4. Biomateriais. I. Pranke, Patricia, orient. II. Maurmann, Natasha, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carolina Landau Albrecht

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM *SCAFFOLDS* CONTENDO DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ALGINATO E CLORETO DE CÁLCIO COMO
ESTRATÉGIA EM MEDICINA REGENERATIVA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Isabele Iser Marson - UFCSPA

Prof Dr Luis Alberto dos Santos - UFRGS

Prof^a Dr^a Patricia Pranke - UFRGS

Agradecimentos

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho. Aos órgãos de fomento. À UFRGS e ao Laboratório de Hematologia e Células-tronco. Ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da Faculdade de Farmácia (UFRGS), à Daniela Steffens pela ajuda nos experimentos e ao IPCT (Instituto de Pesquisa com Células-tronco). À Tay, à Natascha e à Dani, pelo companheirismo e auxílio nas tarefas do laboratório. À Cris e ao Maurício, pelas discussões científicas e também pelas risadas, que faziam até os dias mais difíceis ficarem mais leves. À professora Patricia, por me dar essa oportunidade e, por fim, à Natasha, que me ajudou em tudo desde o início, e que, sem ela, tudo isso não teria sido possível.

RESUMO

O alginato é um biomaterial amplamente utilizado nas áreas de odontologia, farmácia e indústria de alimentos, e vem sendo estudado também devido às suas potenciais aplicações em medicina regenerativa. Trata-se de um polímero natural obtido de diversas espécies de algas. Sob condições ideais de pH, com a adição de um íon bivalente, como o cálcio, é capaz de formar um hidrogel (processo chamado de *crosslinking*) que possui propriedades semelhantes à matriz extracelular, sendo um candidato à engenharia de tecidos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar quais as concentrações ideais de cálcio, alginato e células-tronco mesenquimais (CTM) para a produção de *scaffolds* como estratégia em medicina regenerativa. Primeiramente as células foram tratadas unicamente com cálcio para analisar-se o efeito tóxico do íon em excesso. Posteriormente, as células, em uma densidade de 400.000/poço, foram misturadas ao alginato 1% (m/v) e tratadas com diferentes concentrações de cloreto de cálcio (0; 25; 50; 75; e 100mM) para o *crosslinking*. Como controle, as células foram cultivadas normalmente em placa de cultura. Em um experimento subsequente, 400.000 células/poço foram misturadas a alginato 0,5% e 1%, com a adição de 50mM de cloreto de cálcio. Por fim, as CTM, em concentrações de 100.000, 200.000 e 400.000 por poço foram adicionadas ao alginato 1% e tratadas com 50 mM de cloreto de cálcio. Os experimentos foram realizados com CTMs extraídas de dentes esfoliados decíduos humanos e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e visualizada por microscopia de fluorescência após coloração com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio. Como medida de citotoxicidade, a enzima lactato desidrogenase (LDH) foi dosada e o cálcio foi quantificado. Resultados mostraram que após poucas horas, mesmo pequenas quantidades de cálcio já foram tóxicas para as células na ausência do alginato. Ainda, foi demonstrado que, após uma semana, não foi observada diferença estatística significativa entre os *scaffolds* de 1% alginato, reticulado com 50mM de cálcio, com 100.000 células e os poços controle. No entanto, em concentrações maiores (principalmente de 400.000/poço), foi observado que a viabilidade celular foi superior nos *scaffolds*. Ainda, as concentrações de cálcio livre se mantiveram constantes, e as dosagens de LDH corroboraram com os dados acima. Após sete dias, as absorvâncias médias de 400.000 células nos *scaffolds* de 1% de alginato com 25 e 50mM foram superiores ao controle; porém, experimentos

demonstraram que 25mM do íon não foram capazes de reticular completamente o alginato, gerando géis muito fluidos. Da mesma forma, os hidrogéis de alginato 1% tiveram melhor desempenho em relação ao controle, uma vez que os de 0,5% geraram *scaffolds* muito maleáveis, levando à perda de células durante sua manipulação. Esses resultados sugerem que o alginato fornece um microambiente tridimensional que parece favorecer a sobrevivência celular, enquanto que a mesma quantidade de células cultivadas na placa não possui as mesmas condições. Ainda, alginato 1% e 50mM de cloreto de cálcio demonstraram os melhores resultados ao mimetizar, tanto quanto possível, as características de uma matriz extracelular natural.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; medicina regenerativa; alginato; células-tronco mesenquimais; cálcio.

ABSTRACT

Alginate is a biomaterial widely used in the areas of odontology, pharmacy and food industry, and has been studied also due to its potential applications in regenerative medicine. It is a naturally occurring polymer obtained from different species of brown algae. In a certain pH range, with the addition of a bivalent ion such as calcium, it is capable of forming a hydrogel with properties similar to the extracellular matrix, becoming a potential tool in tissue engineering. The aim of this study was to evaluate which concentrations of calcium, alginate and mesenchymal stem cells (MSC) are ideal to the construction of scaffolds as a strategy in regenerative medicine. First, stem cells were treated only with calcium chloride, in order to analyse the toxicity of the excess of the ion to MSC. Thereafter, MSC, in a density of 400.000/well, were mixed to alginate 1% (w/v) and treated with different concentrations of calcium chloride (0; 25; 50; 75 and 100mM) to reticulate the biomaterial. As control, cells were cultivated as usual in the tissue culture plate. In another experiment, 400.000 cells/well were mixed to 0.5% and 1% alginate, and 50mM of calcium chloride were added. Ultimately, MSC, in the 100.000, 200.000 and 400.000 per well were added to 1% alginate and treated with 50mM of calcium chloride. Experiments were performed with MSC obtained from human exfoliated deciduous teeth and cell viability was assessed via MTT assay and visualized with fluorescence microscopy after fluorescein diacetate and propidium iodide staining. As a measure of cytotoxicity, the lactate dehydrogenase enzyme was dosed and free calcium was quantified. Results showed that after a few hours, even the smallest excess of calcium was toxic to the cells in the absence of alginate. Moreover, it was demonstrated that, after seven days, no significant statistical difference between scaffolds with 1% alginate, crosslinked with 50mM of calcium and 100.000 cells and the control wells (with the same concentration of MSC). However, in higher concentrations (especially 400.000/well) it was observed that cell viability was superior in the scaffolds. Furthermore, free calcium concentrations remained constant and LDH dosages corroborated with the data above. After seven days, the average absorbances of 400.000 cells in 1% alginate scaffolds with 25 and 50mM of calcium were superior to control; however, experiments have demonstrated that 25mM were not sufficient for completely reticulating alginate, giving rise to soft gels. In the same way, 1% alginate scaffolds showed better results in terms of viability when compared to control, and

0.5% alginate generated very malleable scaffolds, leading to the loss of a number of cells during manipulations. These results suggest that alginate provides a three-dimensional microenvironment which seems to favour survival of big quantities of cells, while the same amount of cells cultivated in the tissue culture plate may not have the same conditions. Besides that, 1% alginate and 50mM calcium chloride demonstrated the best results in mimicking, as far as possible, the characteristics of a natural extracellular matrix.

Key-words: tissue engineering; regenerative medicine; alginate, mesenchymal stem cells; calcium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 7AAD – do inglês *7-Amino Actinomycin D*
- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- CD103 – do inglês *Cluster of Differentiation 103*
- CD105 – do inglês *Cluster of Differentiation 105*
- CD14 – do inglês *Cluster of Differentiation 14*
- CD34 – do inglês *Cluster of Differentiation 34*
- CD44 – do inglês *Cluster of Differentiation 44*
- CD45 – do inglês *Cluster of Differentiation 45*
- CD73 – do inglês *Cluster of Differentiation 73*
- CD90 – do inglês *Cluster of Differentiation 90*
- CTMs – Células-Tronco Mesenquimais
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- FDA – do inglês *Fluorescein Diacetate* (diacetato de fluoresceína)
- FITC – do inglês *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)
- HLA-DR – do inglês *Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*
- IBMX – 3-isobutil-1-metilxantina
- IP – Iodeto de Propídio
- MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
- PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato)
- PE – do inglês *phycoerythrin* (ficoeritrina)
- SFB – Soro Fetal Bovino
- SHED – do inglês *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*
- TCP – do inglês *Tissue Culture Plate* (placa de cultura celular)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 JUSTIFICATIVA	16
1.2 OBJETIVOS	17
2 ARTIGO CIENTÍFICO	18
RESUMO	20
II MATERIAIS E MÉTODOS	22
III RESULTADOS	29
IV DISCUSSÃO	40
V AGRADECIMENTOS	44
VI REFERÊNCIAS	44
3 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “ANNALS OF BIOMEDICAL ENGINEERING”	52

1 INTRODUÇÃO GERAL

Diz-se que uma célula tem caráter tronco quando a mesma possui características específicas, tais como a auto-renovação, em que a célula é capaz de gerar outras exatamente iguais à célula-mãe, perpetuando a si mesma; ao mesmo tempo em que tem o potencial de se diferenciar - uma vez que se trata de uma célula indiferenciada - em outros tipos celulares de diferentes tecidos especializados. Nos seres humanos, as células-tronco podem ser encontradas tanto em embriões, constituindo as células-tronco embrionárias, quanto em inúmeros tecidos adultos, também chamadas de células-tronco tecido-específicas por sua capacidade de prover esses tecidos com novas células especializadas, e desse modo manter a integridade dos mesmos, a partir dos estímulos obtidos dos “nichos” (estruturas tridimensionais que fornecem as condições fisiológicas ideais para sua sobrevivência e diferenciação) onde se encontram (ZHANG e KOHN, 2012; CAN, 2008).

As células-tronco são ainda classificadas em relação ao seu potencial de desenvolvimento de novos tecidos. Dessa forma, as células-tronco podem ser rotuladas como toti, pluri, multi ou unipotentes. Células totipotentes, majoritariamente representadas pelas células presentes na massa celular interna do embrião, são aquelas que, a partir dos estímulos adequados, são capazes de se diferenciar em todo e qualquer tecido, embrionário e extra-embrionário, e dessa forma, gerar um novo organismo. As pluripotentes, por sua vez, podem diferenciar-se apenas em células das três camadas germinativas: mesoderme, ectoderme e endoderme; e ainda se autorrenovar infinitamente (ZHANG e KOHN, 2012). Já as multipotentes podem dar origem a um número restrito de tipos celulares, assim como possuem capacidade de renovação limitada. Por fim, as células-tronco unipotentes podem gerar apenas um tipo de célula específico, como, por exemplo, a célula-tronco espermatogênica.

Dentre as células-tronco multipotentes, um tipo tem atraído bastante interesse de pesquisadores em função da facilidade de isolamento e manipulação: as células-tronco mesenquimais (CTMs). Essas células, como o nome sugere, dão origem aos componentes da mesoderme, e já foram identificadas em uma variedade de órgãos e tecidos no organismo humano, como o tecido adiposo, a polpa dental, a medula óssea, o cordão umbilical (geleia de Wharton), fígado, pulmões, músculo

esquelético, entre outros (KOBOLAK et al, 2016). Em se tratando de aspectos morfológicos, as CTMs apresentam citoplasma alongado, semelhante ao formato de um fibroblasto. Ainda, elas são aderentes ao plástico sob condições ideais de cultivo *in vitro*, além de formar colônias, chamadas de Unidades Formadoras de Colônia Fibroblástica (CFU-F, sigla do inglês *Colony Forming Unit-Fibroblasts*) (BERTINE e ARAUJO, 2009). Adicionalmente, apresentam marcadores de superfície de membrana, como CD105, CD73, CD44 e CD90; e não devem expressar marcadores hematopoiéticos como CD45, CD34, CD14 e CD11 e HLA-DR. Importante ressaltar que nenhum destes marcadores é específico para as CTM, fazendo com que a sua identificação não seja tão simples. Interessantemente, essas células possuem propriedades tróficas e imunomoduladoras, em grande parte responsáveis pelo rápido aumento na exploração terapêutica de CTMs (ANKRUM et al, 2014).

A capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares e sua fácil obtenção com mínimo dano invasivo ao doador, como é o caso das células-tronco provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED – *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*) tornam as células-tronco mesenquimais uma fonte atrativa para utilização em pesquisas na área de engenharia tecidual e medicina regenerativa (GIORDANO et al, 2011; KANAFI et al, 2013). Ainda, estudos sugerem que as células obtidas de dentes têm maior capacidade proliferativa quando comparadas às células provenientes da medula óssea (GIORDANO et al, 2011).

Não há dúvidas de que a medicina moderna forneceu diversos avanços que aumentaram significativamente a expectativa de vida da população, aumentando também a taxa de envelhecimento populacional. Acompanhando o acréscimo no número de anos vividos, é natural que ocorra um maior declínio das propriedades e atividades de tecidos e órgãos e do próprio corpo como um todo (HENCH et al, 2006). Somado a isso, existem ainda diversas situações e até mesmo patologias que podem vir a acometer permanentemente órgãos e tecidos, como doenças degenerativas, congênitas e até mesmo danos em consequência de causas externas, como queimaduras, acidentes, perfurações, entre outros. Para esses casos existem algumas alternativas de reconstrução já consolidadas em âmbito cirúrgico, como o autotransplante, em que é retirada parte de algum tecido do próprio paciente para ser utilizada no reparo; o aloenxerto, que tem a desvantagem do risco de rejeição, uma vez que são utilizados órgãos ou tecidos de outros

indivíduos, além da possível propagação de doenças; o xenoenxerto, em que se utiliza tecidos obtidos de animais de outras espécies, podendo também ser rejeitados pelo corpo do receptor; e, por fim, os biomateriais (HENCH et al, 2006).

Os biomateriais já estão bastante consolidados na prática médica, uma vez que estão presentes em suturas reabsorvíveis, próteses, membranas, válvulas, implantes para cirurgia plástica, matrizes para liberação controlada de drogas, etc. No entanto, seu uso em pesquisa, na chamada engenharia de tecidos tem ganhado bastante atenção no mundo todo. A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar do conhecimento, envolvendo a biologia, a engenharia e a física, que busca unir as ferramentas dessas áreas visando construir substitutos biológicos para órgãos e tecidos que possam, ao mesmo tempo, reparar ou reconstituir aqueles danificados conduzindo o processo de regeneração, e também mimetizar as características dos mesmos para que possam ser utilizados para fins científicos em pesquisas (BERTHIAUME et al, 2011). Alguns exemplos da aplicação desse conhecimento são a criação de substitutos de pele para queimados, substitutos para vasos sanguíneos, enxertos de ossos e cartilagens, reparo de lesões medulares e até mesmo a fabricação de órgãos artificiais. Pode, ainda, ser associado a tecnologias de ponta como, por exemplo, a impressão 3D, o *eletrospinning* e *blowspinning*, e, embora, ainda seja uma área emergente e muito trabalho seja necessário para poder aplicá-lo em clínica, bastante esforço tem sido investido nesse assunto. A ideia principal é viabilizar a regeneração de tecidos, modulando processos inflamatórios e imunológicos, e, quando o alvo (órgão ou tecido) estiver estabilizado, retirar ou degradar o biomaterial, já que sua presença já não seria mais necessária (HENCH et al, 2006).

Muitas das práticas de engenharia tecidual envolvem a utilização de células vivas e mantê-las vivas é tarefa difícil e de fundamental importância para o sucesso da técnica. Desse modo, é necessário prover a elas um ambiente favorável que permita que as células vivam como se estivessem no corpo humano, em seu tecido nativo (BERTHIAUME et al, 2011). Assim, um biomaterial ideal para ser associado a células deve mimetizar as características de uma matriz extracelular, fornecendo suporte mecânico com flexibilidade adequada, nutrientes, fatores de crescimento, e fatores de diferenciação se for o caso, não ser citotóxico, formando dessa maneira um arcabouço (do inglês *scaffold*). Alguns exemplos de biomateriais já frequentemente utilizados na engenharia de tecidos são os polímeros ácido

poliláctico, ácido poliglicólico e a policaprolactona. Embora esses materiais sintéticos possuam aprovação de órgãos regulatórios para serem utilizados para tais fins, eles muitas vezes não são capazes de fornecer o ambiente 3D ideal para as células (BERTHIAUME et al, 2011).

Nesse contexto, surge a ideia de se utilizar *scaffolds* de origem natural, como aqueles à base de proteínas (como o colágeno e a fibrina) bem como aqueles à base de materiais polissacarídicos (como a quitosana, o alginato, as glicosaminoglicanas e o ácido hialurônico). Por ocorrerem naturalmente, esses biomateriais geralmente possuem boa compatibilidade e baixa imunogenicidade, fatores bastante visados nessa área. Ainda, ultimamente, pesquisadores têm apresentado bastante interesse na utilização de matrizes de órgãos descelularizados, que por sua vez eliminam consideravelmente o risco de rejeição no receptor, já que há a possibilidade de recelularizá-las com células provenientes do mesmo (BERTHIAUME et al, 2011).

O alginato, por sua vez, vem sendo muito estudado devido às suas características que o fazem um biomaterial com grande potencial para a engenharia de tecidos, com o intuito de promover a regeneração de tecidos danificados por doença ou trauma. Já é bastante utilizado em outros setores como a indústria alimentícia, como emulsificante e estabilizante, bem como na indústria farmacêutica para o encapsulamento de drogas e produção de cosméticos (REHM, 2009). O alginato é um copolímero aniônico natural de alto peso molecular composto de diferentes combinações dos monômeros ácido gulurônico e ácido manurônico, dispostos em blocos, e tem a capacidade de, sob as condições corretas, formar uma espécie de hidrogel. Pode ser obtido de diversas espécies de alga marrom, como, por exemplo, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria hyperborea*, podendo também ser produzido por bactérias como *Azotobacter* e *Pseudomonas*. Naturalmente, alginatos obtidos de fontes distintas diferem na quantidade de cada monômero, bem como no comprimento de cada bloco de monômeros, existindo, atualmente, cerca de duzentos tipos desse biomaterial; sendo assim, nenhum alginato é exatamente igual a outro (LEE e MOONEY, 2012).

Hidrogéis, por definição, são polímeros com grande capacidade de absorção de água. Os de alginato podem ser produzidos a partir da adição de cátions bivalentes como o cálcio (Ca^{2+}), o bário (Ba^{2+}) e o zinco (Zn^{2+}), na faixa de pH de 6. Sob essas condições, ocorre o *crosslinking*, ou seja, o cátion interage com grande

afinidade com os blocos de ácido gulurônico, formando, desse modo, pontes iônicas entre as moléculas de alginato, processo esse chamado de gelificação ionotrópica. Importante ressaltar que, em vista das diferenças na composição dos tipos desse polímero e, adicionalmente, da concentração de cátion utilizada para o *crosslinking*, pode haver também alterações nas propriedades físicas e químicas do material, como a viscosidade e as forças mecânicas que atuam nele. Essas propriedades são fundamentais e podem interferir na estabilidade dos géis formados (podendo formar géis rígidos demais ou flexíveis demais), na taxa de liberação de drogas e também na função e no fenótipo das células envolvidas por ele. Por exemplo, um alginato com alta viscosidade pode prejudicar as células misturadas a ele devido às elevadas forças de cisalhamento apresentadas (LEE e MOONEY, 2012).

Em geral, o alginato possui boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e relativo baixo custo, além ser não-trombogênico, não-imunogênico e apresentar características semelhantes a uma matriz extracelular quando em forma de hidrogel. Porém, não é reabsorvível ocorrendo apenas a sua dissolução ao longo do tempo. O mesmo já é utilizado em várias aplicações clínicas, como agente estabilizante para a cura de ferimentos, bem como tem sido estudado para o tratamento de doenças como o diabetes mellitus, Parkinson e outras (RUVINOV e COHEN, 2016).

1.1 JUSTIFICATIVA

Devido às informações acima, quando se fala em medicina regenerativa, é imprescindível ressaltar a importância de se obter um material que corresponda às necessidades das células nele depositados e que seja adequado aos objetivos em estudo. Sabe-se, por exemplo, que a concentração de cálcio utilizada para a produção do hidrogel de alginato é fator determinante de sua rigidez. Se for utilizada pequena concentração de cálcio, o gel ficará fluido demais, ao passo que, se o íon for adicionado em excesso, pode tornar-se tóxico às células. Assim, faz-se necessário analisar diferentes concentrações tanto de alginato quanto de cálcio a fim de se estabelecer e padronizar a composição desse biomaterial, de modo a obter os melhores resultados de seu uso para a engenharia de tecidos. Ainda, testes preliminares realizados em colaboração com a *University College London* (Londres, Inglaterra) revelaram que a concentração de células-tronco utilizada também tem

influência na sobrevivência das células nos *scaffolds* e essa quantidade deve ser considerada.

Esse estudo faz parte do projeto de pós-doutorado de Natasha Maurmann intitulado “Avaliação do efeito de diferentes compostos e sistemas nanotecnológicos sobre células-tronco mesenquimais para a medicina regenerativa”, que foi aprovado pela COMPESQ-FACFAR (projeto 27325) e obteve parecer favorável perante o comitê de ética CEP/UFRGS/CONEP sob o número 36403514.6.0000.5347.

1.2 OBJETIVOS

Avaliar o comportamento de células-tronco mesenquimais *in vitro* em *scaffolds* de alginato, contendo diferentes concentrações do composto, de cloreto de cálcio, e de células-tronco como estratégia na medicina regenerativa.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Submissão conforme exigências do periódico “Annals of Biomedical Engineering”, da Springer (www.springer.com). As normas estão contidas na seção “ANEXO A”.

Carolina L. Albrecht¹, Natasha Maurmann², Patricia Pranke³.

1. carollalb@gmail.com
2. pesquisa.natasha@gmail.com
3. patriciapranke@ufrgs.br

Laboratório de Hematologia e Células-Tronco (UFRGS)

Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT)

Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

**COMPORTAMENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM
SCAFFOLDS DE ALGINATO PARA USO EM MEDICINA REGENERATIVA**

Carolina L. Albrecht¹, Natasha Maurmann¹, Patricia Pranke^{1,2,3}.

¹ Laboratório de Hematologia e Células-Tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ² Programa de Pós-Graduação em Fisiologia (UFRGS). ³ Instituto de Pesquisa com Células-Tronco.

Endereço para correspondência: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia: Avenida Ipiranga 2752/3, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: +55 51 3308 5257. Email: patriciapranke@ufrgs.br

RESUMO

Alginato é um biomaterial bastante estudado atualmente devido ao seu potencial uso em engenharia de tecidos. Trata-se de um polímero de origem natural que, sob condições adequadas de pH e com a adição de um cátion bivalente (como o cálcio) é, capaz de formar um hidrogel que possui características semelhantes a matriz extracelular. Esse estudo visou avaliar diferentes concentrações de células-tronco mesenquimais (CTM), cálcio e alginato para futuras aplicações em engenharia tecidual. Resultados mostraram que, nos *scaffolds* com altas concentrações de células houve melhor viabilidade celular do que as CTMs cultivadas diretamente na placa de cultura. Ainda, as concentrações de cálcio mais adequadas foram as de 25 e 50mM; no entanto, a primeira foi descartada por produzir géis muito fluidos. Por fim, alginato 1% foi eleito a melhor composição, uma vez que alginato 0,5% gerou *scaffolds* maleáveis, com perda de células durante sua manipulação. Esses resultados sugerem que o alginato representa uma vantagem ao prover às CTMs um ambiente 3D, com relação às células cultivadas em placa, sendo esta condição mais favorável às células. Finalmente, alginato 1% e 50mM de cálcio foram considerados os melhores resultados por formarem *scaffolds* com as características mais adequadas à sobrevivência das CTM.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; cloreto de cálcio; *crosslinking*; concentração de alginato; consistência; hidrogel

I INTRODUÇÃO

Células-tronco são um tipo celular com características que as fazem únicas: a capacidade de auto-renovação, gerando novas células idênticas às progenitoras, bem como a possibilidade de diferenciar-se em outros tipos distintos de células. Essas células também apresentam propriedades angiogênicas, imunomoduladoras, anti-inflamatórias e capacidade de secretarem moléculas ou fatores bioativos, auxiliando a reparação tecidual [19]. As células-tronco mesenquimais obtidas da polpa de dentes decíduos esfoliados destacam-se pela fácil obtenção com mínimo dano invasivo ao doador bem como alta capacidade proliferativa [11; 8].

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa constituem ciências que buscam, por meio da integração de grandes campos do conhecimento, como a física, a biologia e a engenharia, reparar ou mesmo regenerar órgãos e tecidos do corpo humano acometidos por doenças e/ou traumas. De caráter inovador, surgem como alternativa a técnicas de reconstrução já costumeiramente utilizadas na prática médica, como auto-enxerto, aloenxerto e xenoenxerto, reduzindo consideravelmente o risco de complicações envolvido [18; 3].

A função de um biomaterial em engenharia de tecidos é, primariamente, prover um ambiente favorável às células nele depositadas, mimetizando, tanto quanto possível, as características de uma matriz extracelular ao fornecer suporte mecânico com flexibilidade adequada formando dessa maneira um arcabouço (do inglês *scaffold*). Adicionalmente, deve permitir a passagem de nutrientes, fatores de crescimento, e fatores de diferenciação. Nesse contexto, o alginato surge como um candidato em potencial para futuras aplicações nesse campo. Trata-se de um polímero de origem natural, produzido por diversas espécies de alga marrom, como, por exemplo, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria hyperborea*, bem como por bactérias como *Azotobacter* e *Pseudomonas* [14]. O alginato é um co-polímero aniônico de alto peso molecular composto por diferentes combinações dos monômeros ácido gulurônico e ácido manurônico, dispostos em blocos. Possui a capacidade de, sob as condições adequadas de pH e a adição de um cátion bivalente como o cálcio, formar um hidrogel. Isso se deve à interação de alta afinidade do cátion com os blocos de ácido gulurônico, formando, desse modo, pontes iônicas entre as moléculas de alginato, processo esse chamado de gelificação ionotrópica ou *crosslinking* [14].

Importante ressaltar que diferentes organismos produzem alginatos com diferentes proporções dos monômeros que o constituem, variando, dessa forma, as propriedades físicas e químicas do biomaterial [21]. Ainda, a concentração do cátion utilizada no *crosslinking* altera a sua consistência e estabilidade, o que deve ser considerado, pois esse fator pode interferir na função e no fenótipo das células envolvidas por ele. Por exemplo, se o gel de alginato formado tiver alta viscosidade poderá prejudicar as células misturadas a ele devido às elevadas forças de cisalhamento aplicadas [14].

Em geral, o alginato possui boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e relativo baixo custo, além de ser não-trombogênico, não-imunogênico e apresentar características semelhantes a uma matriz extracelular quando em forma de hidrogel. Porém, não é reabsorvível, ocorrendo apenas a sua dissolução ao longo do tempo. O mesmo já é utilizado em várias aplicações clínicas, como agente estabilizante para a cura de ferimentos, bem como tem sido estudado para o tratamento de doenças como o diabetes mellitus, Parkinson e outras [22]. No entanto, por ser um polímero de origem natural, suas características podem variar em razão do tipo, ou mesmo do lote de alginato adquirido. Além disso, é preciso estabelecer os melhores parâmetros para a produção de *scaffolds*, como, por exemplo, a consistência, a qual varia com a concentração de alginato bem como com a concentração do íon para a reticulação cruzada .

Assim, com o objetivo de obter os melhores resultados, estabelecer e padronizar a composição de alginato, de modo a possibilitar seu uso para a engenharia de tecidos, este estudo buscou analisar diferentes concentrações, tanto de alginato quanto de cálcio e seus efeitos em relação a viabilidade de células-tronco mesenquimais.

II MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs)

Obtenção de CTMs da polpa de dentes decíduos

As células-tronco utilizadas neste estudo foram obtidas de dentes decíduos, os quais foram doados por pacientes da Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS, após assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido pelo mesmo ou seu responsável, e aprovação no Comitê de Ética (CAAE nº 36403514.6.0000.5347).

Para o isolamento das células, a polpa foi separada cuidadosamente do tecido dentário, com o auxílio de uma colher de dentina, no fluxo laminar. Na sequência, a manipulação do tecido pulpar removido foi realizada de modo semelhante ao processamento descrito por Bernardi e colaboradores [2]. Resumidamente, a polpa de cada dente foi incubada a 37°C em contato com a solução de colagenase a 0,2% (Gibco®) por 60 minutos e, em seguida, após a centrifugação a 800g por 10 minutos, o *pellet* de células resultante foi ressuspensão com 1mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich®) suplementado (10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e semeado em placa de cultivo. A cultura foi mantida em incubadora umidificada a 5% de CO₂ e 37°C por cerca de 72 horas, quando as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas de meio subsequentes foram realizadas a cada 3-4 dias.

Após a confluência, a cultura primária foi lavada com solução tampão fosfato (PBS). Uma solução de 0,05% de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®) em PBS foi utilizada para desfazer a aderência das células à placa e as mesmas foram incubadas por cerca de três minutos, a 37°C. As células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM suplementado e transferidas para novas garrafas de cultivo celular, na densidade de 5.000 células/cm². Passagens celulares subsequentes foram realizadas de forma semelhante. As passagens (sub-culturas) foram realizadas quando a cultura atingiu a confluência.

Caracterização das células-tronco mesenquimais

Foram utilizados os protocolos descritos na literatura e já estabelecidos pelo laboratório [4; 2; 25].

Análise morfológica das culturas celulares

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

Análise imunofenotípica das células cultivadas

As CTMs foram caracterizadas imunofenotipicamente a partir da verificação da presença de marcadores de células mesenquimais e ausência de células hematopoéticas, por meio de citometria de fluxo [17]. As CTMs foram analisadas anteriormente a décima passagem da cultura celular. Os anticorpos utilizados foram os específicos para identificar os marcadores de CTM, tais como CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105; bem como confirmação da ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas, como CD14, CD34, CD45, CD184, HLA-DR e STRO-1. A presença das moléculas foi avaliada utilizando-se 2 μ L de anticorpo monoclonal anti-humano (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) para cada uma das moléculas. O 7AAD (7-Amino Actinomycin D) (Molecular Probes, Eugene) foi utilizado como critério de exclusão, para permitir a avaliação apenas de células vivas.

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

Diferenciação celular *in vitro*

A diferenciação em tipos celulares mesenquimais, necessária para confirmação da identidade da população obtida, foi testada a partir da quinta passagem. Ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica foram realizados seguindo protocolos já descritos por outros pesquisadores [2; 25].

Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, realizou-se o cultivo celular por cerca de 25 dias em meio contendo SFB (15%), dexametasona (10^{-1} mM), ácido ascórbico 2-fosfato (50mM) e β -glicerofosfato (15mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S em pH 4,2.

Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais, realizou-se o cultivo celular por cerca de 30 dias em meio DMEM contendo 10% de SFB, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (0,5mM), dexametasona (1 μ M), insulina (1,74 μ M), indometacina (50 μ M), rosiglitazona (1 μ M). Os adipócitos foram identificados por observação de gotículas de gordura ao microscópio com contraste de fase e por coloração das mesmas com o corante Oil Red O.

Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células aderentes foram cultivadas em meio de diferenciação durante 30 dias. O meio foi constituído de DMEM suplementado com SFB (10%), dexametasona (0,1 μ M), ITS 1x (0,01mg/mL de insulina humana recombinante, 5,5 μ g/mL de transferrina humana, e 5ng/mL de selenito de sódio), 10ng/mL de TGF- β 1 e 50 μ M da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). A condrogênese foi demonstrada pela coloração com *Alcian Blue*.

Todos os meios de cultivo foram trocados a cada 3-4 dias e quando diferenciadas, as células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com água mili-Q, e por fim realizada a coloração específica.

Ensaio de MTT

A viabilidade das células foi avaliada por meio do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) em uma concentração de 0,25mg/mL, por um tempo de incubação de 4h a 37°C. Após esse tempo, os sobrenadantes dos poços foram descartados e os cristais de formazan formados foram dissolvidos com dimetil sulfóxido (DMSO) ou solução de isopropanol com 0,04M de ácido clorídrico, lidos em espectrofotômetro Multiskan™ FC (Thermo Scientific) e o resultado calculado pela diferença de absorbâncias nos comprimentos de onda de 630 e 570nm.

Ensaio de coloração com iodeto de diacetato de fluoresceína-iodeto de propídio

A viabilidade celular foi também visualizada por coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) em ensaio do tipo "LIVE/DEAD". Os sobrenadantes dos poços e *scaffolds* foram desprezados e os mesmos foram lavados com tampão fosfato. Foram então adicionados 0,02mg/mL de FDA e 0,04mg/mL de IP dissolvidos em tampão fosfato, e as imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência (Nikon Ti Eclipse).

Dosagem de LDH

A citotoxicidade foi avaliada por medição da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante da cultura. A LDH é uma enzima intracelular e a sua presença no ambiente extracelular é indicativo de danos celulares. A concentração mais elevada dessa enzima no meio extracelular é relacionada com a

ruptura de membrana plasmática e conseqüentemente maior morte celular. O ensaio (kit Wiener Lab) foi realizado 7 dias após o início do experimento. Como controle negativo, foram utilizadas as células cultivadas diretamente nos poços das placas e como controle positivo foram utilizadas as células cultivadas nas placas tratadas com 1% (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), durante 10 minutos. Triton X-100 provoca a morte celular permitindo a liberação total de LDH. As medições foram realizadas no equipamento Konelab 30i (Thermo Scientific).

Dosagem de cálcio livre

A concentração dos íons cálcio no meio de cultura foi determinada utilizando kits da Wiener bem como BioClin, conforme instruções dos fabricantes e as medições foram realizadas no espectrofotômetro Multiskan™ FC (Thermo Scientific) (nos comprimentos de onda de 630 para cálcio) assim como no analisador automático Konelab 30i (Thermo Scientific).

Viabilidade celular sob diferentes concentrações de cálcio

A viabilidade das CTMs foi testada frente a diferentes concentrações de cálcio em dois experimentos distintos: sem e com a presença de *scaffolds* de alginato.

Para os testes sem alginato, as células-tronco foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços, na densidade de 7,5mil células, e, após a confluência, foram tratadas com concentrações variando entre 0 e 20 mM de CaCl₂, por 4h, 5h e 6h. A viabilidade das células foi avaliada por meio de do ensaio de MTT.

Para o segundo experimento, em placa de cultivo de 48 poços, 50µL de alginato sódico (Sigma-Aldrich®, nº W201502, previamente disperso em solução salina e esterilizado em autoclave a 1 atm por 18 minutos) foram misturados a 50µL de suspensão de células-tronco, com uma concentração de 400 mil células por poço, gerando *scaffolds* de 100uL de alginato 1%. Em seguida, foram adicionados 100µL de cloreto de cálcio, nas concentrações de zero, 25, 50, 75 ou 100mM. Os diferentes tratamentos com cloreto de cálcio ficaram em contato com a mistura de alginato e células por 30 minutos para reticulação e, em seguida, seu excesso foi

removido e os *scaffolds* foram lavados com 200µL de meio DMEM base (sem suplementação). Como controle, aqui referido como TCP (do inglês *Tissue Culture Plate*), 400 mil células foram plaqueadas por poço e foram cultivadas normalmente com meio de cultura DMEM. Adicionados 500µL de meio DMEM suplementado por poço, a placa foi levada à incubadora e a viabilidade celular foi avaliada por MTT.

Os dois experimentos foram realizados com concentrações de cálcio diferentes, pois um é complementar ao outro: o primeiro visou avaliar o prejuízo causado pelo cálcio livre, que está em excesso, ou seja, aquele que não foi utilizado no *crosslinking* do alginato; enquanto que o segundo teve por finalidade analisar o efeito das forças mecânicas que atuam em consequência das diferentes concentrações utilizadas no *crosslinking* do biomaterial.

Viabilidade celular sob diferentes concentrações de alginato

A fim de se verificar a influência da concentração do alginato na viabilidade das células-tronco, foi realizado o teste com duas concentrações finais distintas do copolímero: 0,5% e 1% (m/v). Para isso, em uma placa de 48 poços, misturou-se 50µL de alginato a 50µL de suspensão de células (400 mil por poço) para atingir as concentrações desejadas. A seguir, foram adicionados 100µL de cloreto de cálcio (50mM) aos poços para possibilitar o *crosslinking*. Após trinta minutos, o excesso de cálcio foi removido e os *scaffolds* foram lavados com 200µL de meio DMEM base. Em seguida, foram adicionados 500µL de meio DMEM suplementado a cada poço, a placa foi levada à incubadora e, passados sete dias, foi realizado o ensaio de MTT, sendo os cristais de formazan dissolvidos com solução de isopropanol ácido conforme descrito anteriormente.

Viabilidade celular sob diferentes concentrações de células

Para este experimento, 50µL de alginato foram misturados a 50µL de diferentes concentrações de células: 100, 200, e 400 mil células por poço, gerando *scaffolds* de 100uL de alginato 1%. A seguir, 100µL de cloreto de cálcio, na

concentração de 50mM, foram adicionados à mistura, e foram deixados por 30 minutos em contato. Após esse passo, o excesso do íon foi removido e os *scaffolds* foram lavados com 200µL de meio DMEM base. Por fim, foram adicionados 500µL de meio DMEM suplementado com SFB por poço e a placa foi levada à incubadora. Ao final de uma semana, foi realizado o ensaio de MTT nos poços, utilizando-se isopropanol ácido para a dissolução dos cristais de formazan.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média e avaliados utilizando ANOVA, seguida pelo teste Tukey HSD. Diferenças estatísticas significativas foram estabelecidas com $p < 0,05$. Os dados foram analisados com o software SPSS (IBM SPSS Statistics 21; SPSS Inc, Chicago, EUA).

III RESULTADOS

Avaliações biológicas

Com relação aos pré-requisitos para classificação das células como CTMs, as mesmas foram rotineiramente acompanhadas através de microscópio óptico para avaliação de sua morfologia fibroblastóide e capacidade de aderência ao plástico da placa de cultivo por aproximadamente doze passagens. Em seguida, as mesmas foram submetidas aos protocolos descritos e foram eficientemente capazes de diferenciar-se com os meios adipogênico, osteogênico e condrogênico, como pode ser observado na figura 1.

Na análise imunofenotípica da cultura primária de CTMs, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-humanos contra os marcadores celulares característicos de células-tronco. As células mostraram positividade para CD29 (99,8%), CD90 (99,7%), CD105 (99,7%), CD44 (99,8%), CD73 (99,8%). Já os marcadores de células hematopoéticas apresentaram baixa expressividade de CD14 (0,1%), CD34 (<0,1%), CD184 (0,1%), CD45 (<0,1%) (figura 1).

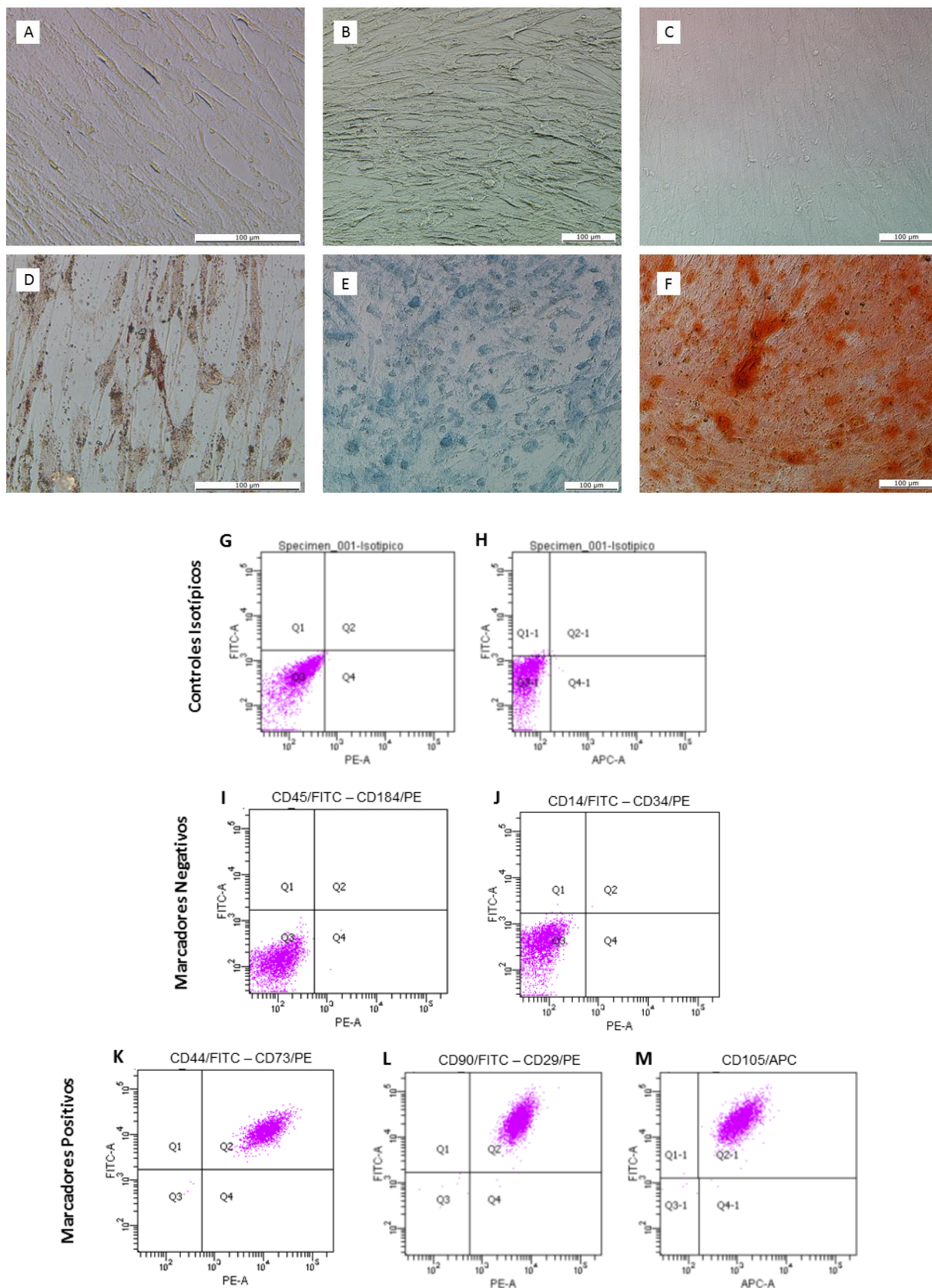


Figura 1: Caracterização das CTMs. Microfotografias da diferenciação celular. **(A)** Controle Adipogênico, **(B)** Controle condrogênico, **(C)** Controle osteogênico, **(D)** Diferenciação adipogênica, **(E)** Diferenciação condrogênica, **(F)** Diferenciação osteogênica. A escala corresponde a 100 µm. Caracterização imunofenotípica das CTM. Houve baixa expressão (<2%) para **(I)** CD45 e CD184, **(J)** CD14 e CD34. Positividade (>99,5%) para **(K)** CD44 e CD73, **(L)** CD90 e CD29, **(M)** CD105.

Como pode ser visualizado na figura anterior, as células foram capazes de produzir gotículas de gordura, coradas em vermelho no interior das células, caracterizando adipócitos (figura 1D); glicosaminoglicanas, corados em azul, acompanhados de mudança na morfologia celular, evidenciando os condrócitos (figura 1E); e matriz óssea, corada em vermelho no exterior das células (figura 1F).

Viabilidade celular é prejudicada frente ao cálcio na ausência do alginato

Quando a viabilidade das células-tronco foi avaliada unicamente em relação à quantidade de cloreto de cálcio contida no meio, sem a presença de alginato, foi possível perceber que, em 4h de tratamento, até mesmo o menor excesso de cálcio (como a concentração de 2mM) foi deletéria às CTMs quando comparado ao controle sem cálcio. Logicamente, foi observado que, quanto maior a concentração de cálcio adicionada, maior era o prejuízo às células, e menor a viabilidade (%), como pode ser constatado pela figura 2. Nos experimentos com 5h e 6h de tratamento com cloreto de cálcio o mesmo padrão foi também observado.

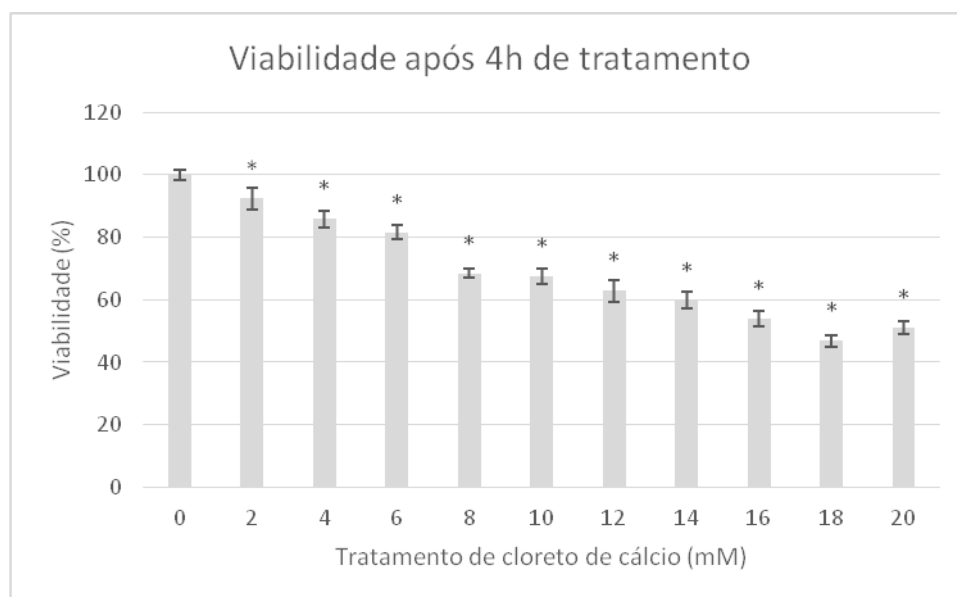


Figura 2: CTMs foram plaqueadas e então tratadas com 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ou 20 mM de cloreto de cálcio. Como controle, as células foram cultivadas sem excesso de cálcio. Viabilidade celular foi obtida pelo ensaio de MTT. A viabilidade do controle foi considerada como 100%. Após 4h de tratamento com CaCl_2 , a viabilidade das CTMs foi prejudicada mesmo na menor concentração utilizada, de 2mM (média=92,55±11,10; $p<0,05$). Os dados representam a média ± erro padrão da média de dois experimentos independentes, cada um realizado em triplicata e os asteriscos representam $p<0,05$.

Viabilidade celular é maior no alginato com diferentes concentrações de cálcio

Neste experimento, foi avaliado o efeito da quantidade de cálcio utilizada para o *crosslinking* dos *scaffolds* de alginato. Conforme a figura 3A, constatou-se que os *scaffolds* de todas as concentrações de cálcio obtiveram melhores resultados quanto à viabilidade celular, apresentando diferenças significativas em relação às células plaqueadas nos poços controle bem como aquelas no alginato sem cálcio. Os *scaffolds* de 25mM e 50mM de cloreto de cálcio foram, dentre todos, aqueles que apresentaram os valores mais elevados de viabilidade celular, embora não estatisticamente significativo em relação aos outros *scaffolds*. No entanto, apenas 25mM de CaCl_2 não foram capazes de reticular completamente o alginato, gerando, dessa forma, géis muito fluidos. Para corroborar, nos poços tratados com 75 e 100mM de cloreto de cálcio, haviam quantidades significativamente maiores de cálcio em excesso, quando comparados aos demais poços (figura 3B). Em razão desses resultados, a concentração de 50mM de CaCl_2 foi escolhida para o *crosslinking* do alginato nos experimentos subsequentes.

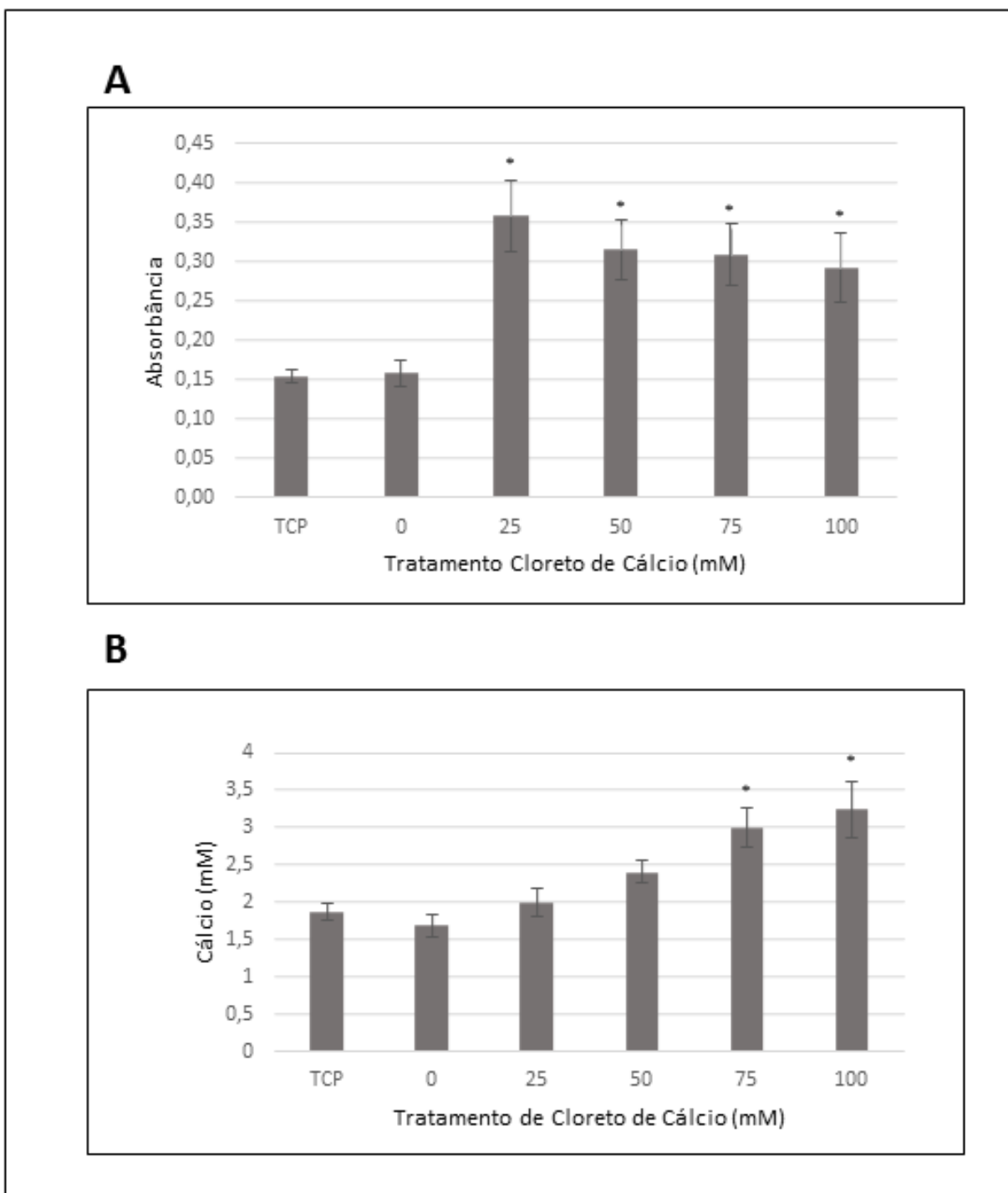


Figura 3: *Scaffolds* de alginato com 400.000 células e zero, 25, 50, 75 ou 100mM de cálcio. Como controle, 400.000 células foram cultivadas normalmente em placa de cultura celular. **(A)** Viabilidade celular em *scaffolds* de alginato com diferentes concentrações de cloreto de cálcio após 7 dias. Não houve diferença significativa no alginato puro (sem cálcio). Já nas concentrações de 25, 50, 75 e 100mM, a viabilidade das CTMs foi significativamente maior ($p < 0,001$ para a concentração de 25mM e $p < 0,05$ para as demais). **(B)** Dosagem de cálcio livre por teste colorimétrico. Foram observadas diferenças significativas apenas nos poços tratados com 75 e 100mM de cálcio em relação ao controle (TCP). Os dados representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes, cada um realizado pelo menos em triplicata.

A viabilidade das CTMs foi também visualizada por microscopia de fluorescência após coloração com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio (figura 4).

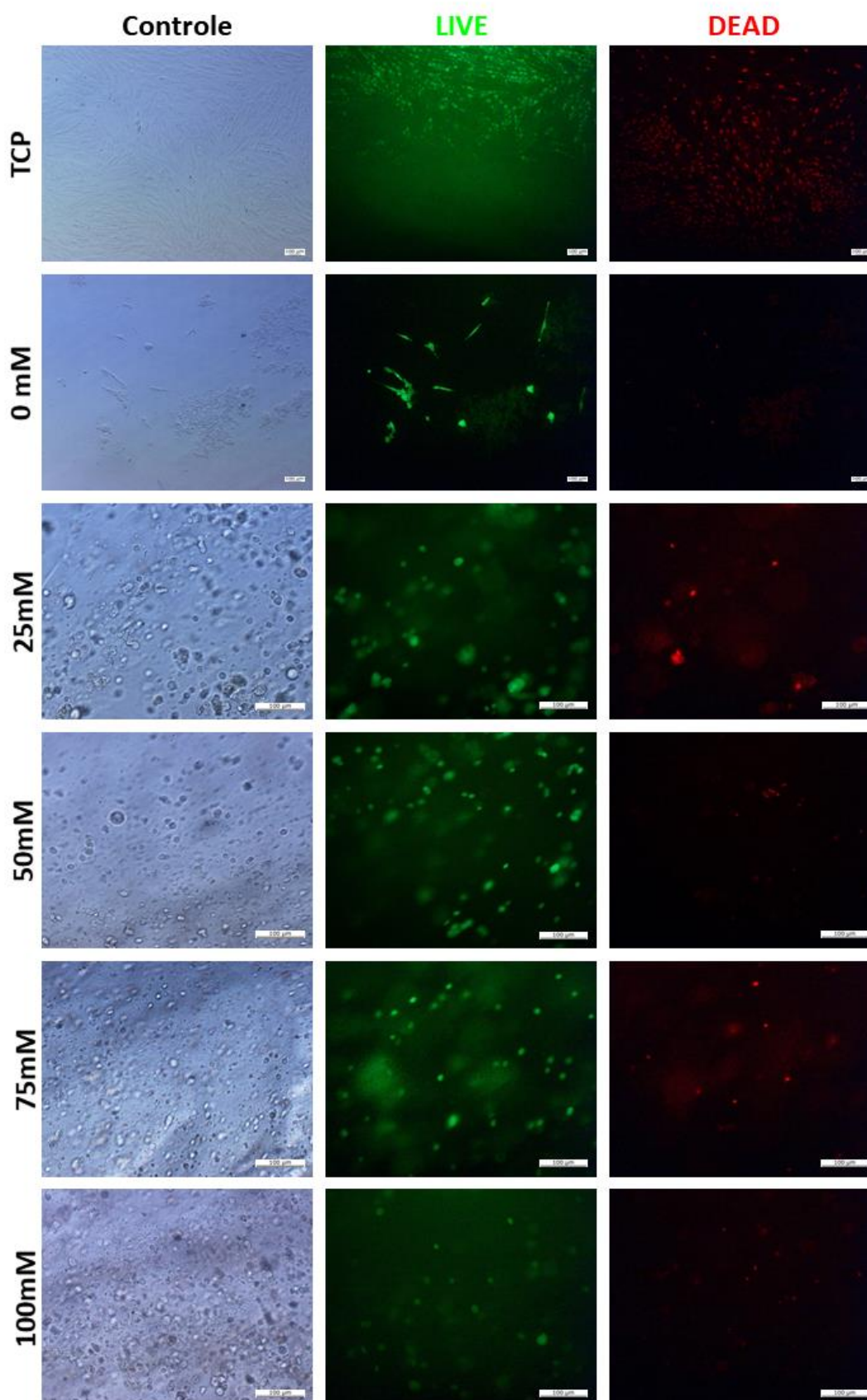


Figura 4: *Scaffolds* de alginato com 400.000 células e zero, 25, 50, 75 ou 100mM de cálcio. Como controle, 400.000 células foram cultivadas normalmente em placa de cultura celular. Imagens de microscopia de fase na coluna da esquerda; FDA (células viáveis em verde - LIVE) na coluna central e IP (células não viáveis em vermelho - DEAD) na coluna da direita obtidas em microscópio de

fluorescência. De cima para baixo, TCP (controle); alginato sem cálcio (0mM); alginato com 25mM CaCl₂; alginato com 50mM CaCl₂; alginato com 75mM CaCl₂; alginato com 100mM CaCl₂.

A consistência do alginato influi na viabilidade das células

A fim de se escolher a concentração ideal do alginato para as células, esse teste foi realizado com duas concentrações distintas do polímero, com a mesma densidade de células e concentração de cálcio. Em relação aos poços controle, as células contidas nos *scaffolds* de alginato 1% apresentaram melhores resultados de viabilidade (figura 5). Além disso, os géis de alginato 0,5% mostraram-se muito maleáveis, levando, por consequência, à perda de certa quantidade de células durante as manipulações do experimento. Por estes motivos, a concentração de 1% do alginato foi eleita, juntamente com a concentração de cálcio de 50mM, para a obtenção de *scaffolds* por melhor mimetizar, tanto quanto possível, as condições de uma matriz extracelular.

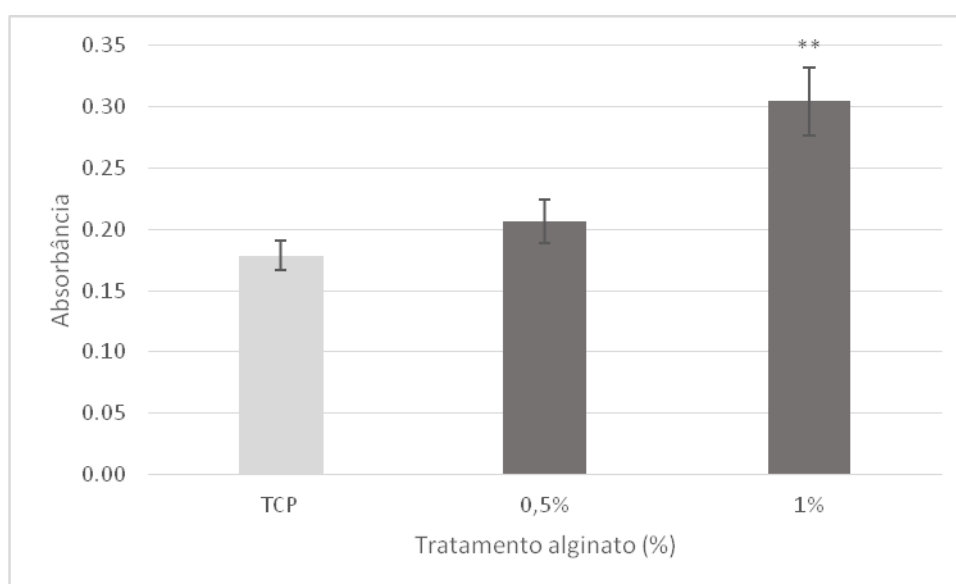


Figura 5: Viabilidade celular em *scaffolds* com diferentes concentrações de alginato (0,5 ou 1%), contendo 400.000 células e reticulado com 50mM de cloreto de cálcio após 7 dias. Como controle, 400.000 células foram cultivadas normalmente em placa de cultura celular. Na concentração de 1% de alginato a viabilidade das CTMs foi significativamente maior ($p < 0,001$). Os dados representam a absorbância média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes, cada um realizado pelo menos em triplicata. Os dois asteriscos representam $p < 0,01$.

A viabilidade celular é superior no alginato quando em altas concentrações de células

Ao analisar-se o efeito da quantidade de CTMs contida nos *scaffolds* sobre a viabilidade das mesmas, pôde-se observar que, após sete dias, na concentração mais baixa de células (100.000 por poço), a presença de alginato não representou uma vantagem significativa. Já nas concentrações de 200.000 e 400.000 células por poço, a viabilidade celular no alginato foi significativamente maior do que as células cultivadas diretamente na placa de cultura (figura 6, $p < 0,01$ em ambos os casos). A viabilidade foi também visualizada por microscopia de fluorescência após coloração com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio (figura 7).

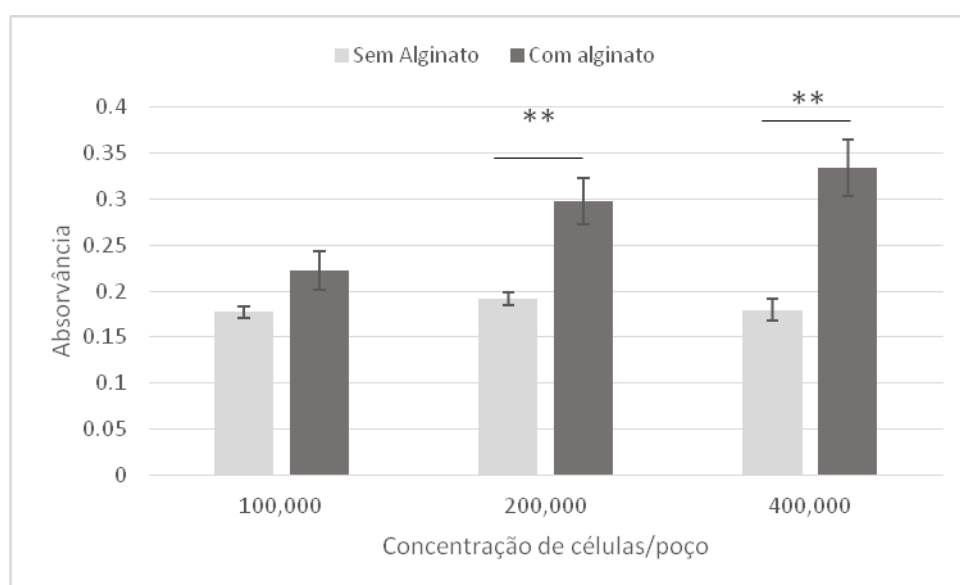


Figura 6: *Scaffolds* de alginato com 100.000, 200.000 ou 400.000 células, seguido por reticulação com 50mM de cálcio e como controle as mesmas concentrações de células foram cultivadas normalmente na placa de cultura celular. Viabilidade celular pelo teste de MTT após sete dias. Não houve diferença significativa entre os controles e os *scaffolds* na concentração de 100.000 células/poço. Já nas concentrações mais elevadas, a viabilidade foi significativamente maior nos *scaffolds* ($p < 0,01$ para ambas). Os dados representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes, cada um realizado pelo menos em triplicata.

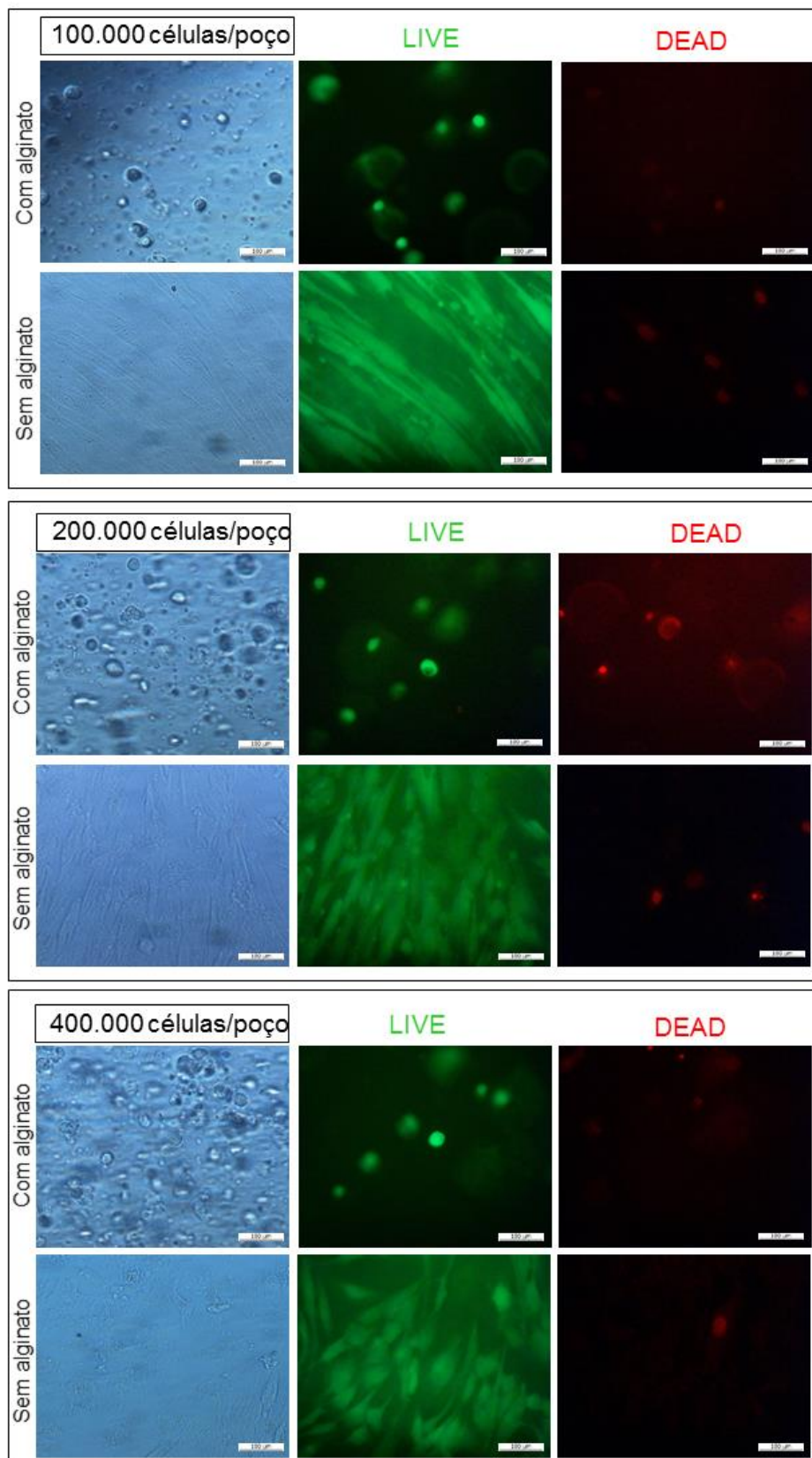


Figura 7: *Scaffolds* de alginato com 100.000, 200.000 ou 400.000 células, seguido por reticulação com 50mM de cálcio e como controle as mesmas concentrações de células foram cultivadas normalmente na placa de cultura celular. Imagens de microscopia de fase na coluna da esquerda; FDA (células viáveis em verde - LIVE) na coluna central e IP (células não viáveis em vermelho - DEAD) na coluna da esquerda obtidas em microscópio de fluorescência. As imagens correspondem a

scaffolds contendo 100.000, 200.000 e 400.000 células/poço nos painéis superior, médio e inferior, respectivamente.

As quantidades de cálcio livre nos poços se mantiveram constantes, visto que não houve diferenças significativas, tanto na comparação entre *scaffold* e placa de cultura, quanto entre os grupos com diferentes concentrações de células (figura 8A).

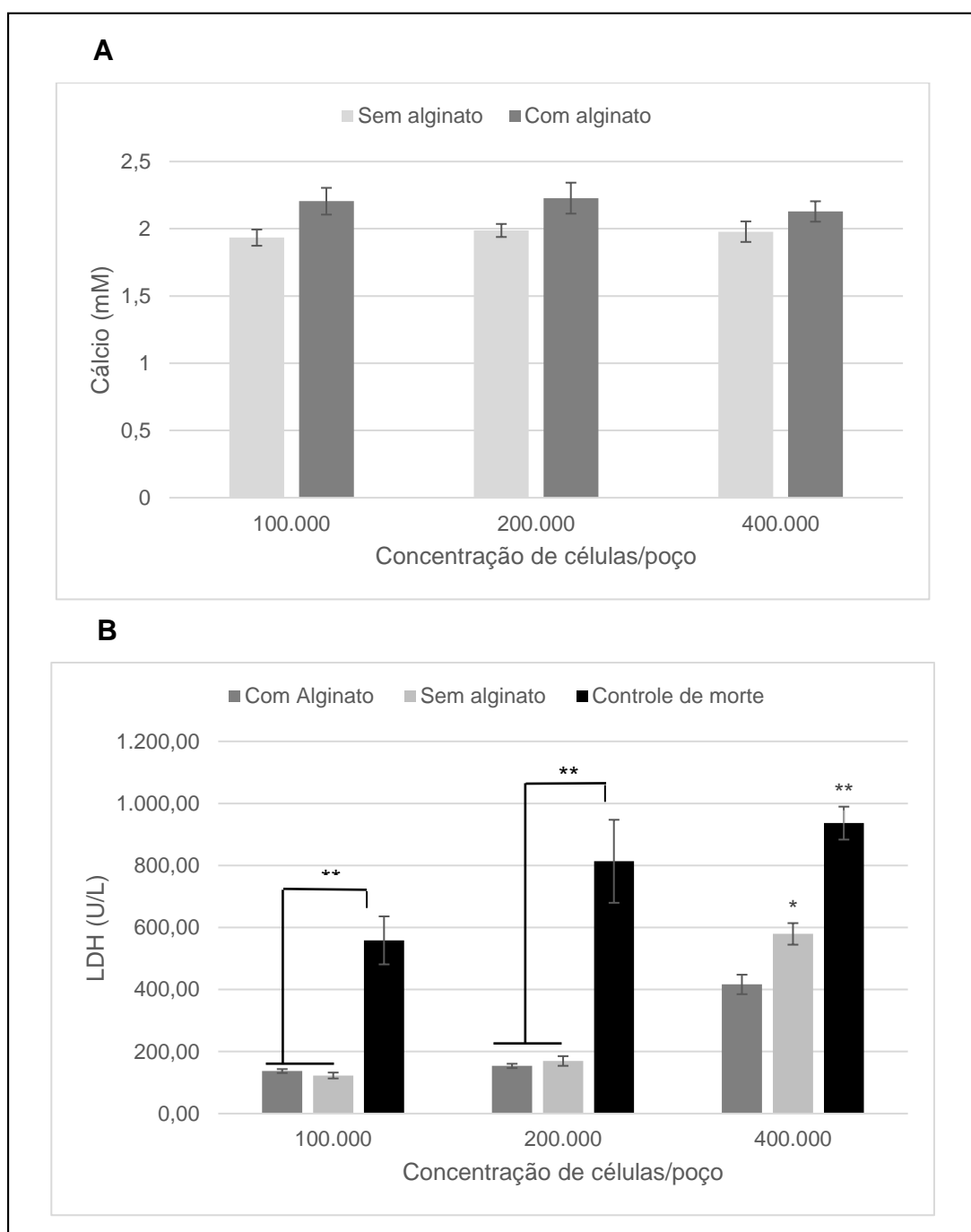


Figura 8: *Scaffolds* de alginato com 100.000, 200.000 ou 400.000 células, seguido por reticulação com 50mM de cálcio e como controle as mesmas concentrações de células foram cultivadas normalmente na placa de cultura celular. **(A)** Dosagem de cálcio livre nos poços via kit colorimétrico. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados. **(B)** Dosagem de LDH nos sobrenadantes dos poços. *equivale a $p < 0,05$ e ** a $p < 0,01$. Como controle positivo, as células foram

tratadas com Triton 1% por 10 min. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes, cada um realizado pelo menos em triplicata.

Os dados obtidos com a dosagem de LDH dos poços (figura 8B) reforçaram os resultados de viabilidade celular, uma vez que foi observada diferença na quantidade de LDH dos poços sem alginato e com 400.000 células: sem a presença de alginato, houve um aumento significativo nos níveis da enzima, indicando maior citotoxicidade.

IV DISCUSSÃO

Segundo a Conferencia de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas de 1982, entende-se por biomaterial: “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais”. Mais recentemente, Huebsch e Mooney descreveram biomateriais como produtos da combinação de materiais e compostos bioativos, os quais interagem diretamente através de vias de sinalização com células e tecidos, de forma a direcionar respostas biológicas [9]. Dessa maneira, quando se estuda um biomaterial para aplicação em engenharia de tecidos, é fundamental conhecer suas características e efeitos sobre as células as quais serão associadas a ele. Várias propriedades do biomaterial são capazes de interferir em processos celulares como adesão, proliferação e diferenciação [28]. Sabe-se, por exemplo, que a topografia da superfície de um material pode ser fator determinante da função e do comportamento de células-tronco aderidas [13]. Desse modo, é preciso padronizar as condições sob as quais o biomaterial será construído, de forma a alcançar os melhores resultados em termos de adesão, proliferação e diferenciação celular, repercutindo diretamente na regeneração tecidual.

Assim, o *scaffold* de alginato, bem como qualquer outro biomaterial, deve apresentar propriedades mecânicas, biológicas e estruturais que mimetizem a matriz extracelular, apresentando, por exemplo, rigidez adequada e ausência de agentes tóxicos. Lee e Mooney sugerem, adicionalmente, que podem ser inseridos no

alginate peptídeos de adesão às células de forma a promover e regular interações celulares, uma vez que esse material não possui sítios específicos de adesão e reconhecimento por células de mamíferos [14]. O alginato já é amplamente utilizado em outras áreas, e vem sendo estudado para uso em regeneração de ossos, cartilagens e nervos, além de cicatrização de feridas e queimaduras [28]. Por ter origem natural, possui vantagens sobre biomateriais artificiais, como melhor biocompatibilidade e menor toxicidade, além de possuir grande quantidade de água absorvida, característica de hidrogéis. A preponderância de biomateriais naturais foi testada por Galler e colaboradores, que demonstraram que, após 14 dias de cultura, a viabilidade de células-tronco de polpa dental (obtidas de terceiros molares extraídos) foi maior em *scaffolds* de origem natural (colágeno e sobretudo a fibrina) quando comparados a polímeros sintéticos, como aqueles à base de polietilenoglicol [7]. Outro estudo, conduzido por Jalayeri e colaboradores, mostrou que o alginato não afetou a viabilidade e a morfologia de células-tronco de espermatogônias encapsuladas. Além disso, foi capaz de difundir adequadamente oxigênio e nutrientes a elas [10].

Para se obter o hidrogel de fato, deve-se promover o processo de gelificação ionotrópica (*crosslinking*) com cálcio. Contudo, na prática, caso pouca quantidade de cálcio seja adicionada, o gel resultante acaba por ser fluido demais. No outro extremo, se grande concentração do íon é adicionada, é gerado um gel com rigidez elevada que pode ser tóxico às células em decorrência do excesso de cálcio e também pelas forças mecânicas que apresenta [1]. Ademais, a fonte de obtenção desse biomaterial também deve ser considerada em vista das diferentes composições de alginato (em termos de proporções de cada monômero) que cada organismo produz, o que também influencia nas propriedades do gel formado. Banerjee e colaboradores relatam, em um de seus estudos, que a taxa de proliferação de células-tronco neurais diminui em virtude do aumento da rigidez de hidrogéis de alginato, por exemplo [1].

O cálcio é sabidamente um íon imprescindível para o bom funcionamento das células, uma vez que está diretamente envolvido em diversos processos fisiológicos, como regulação enzimática, secreção hormonal, sinalização celular, excitação, apoptose, adesão, excitabilidade celular, entre outros. Desse modo, seus níveis devem ser rigorosamente controlados pelo organismo, através de mecanismos intracelulares e também sistêmicos, a fim de manter sua homeostasia. Além disso,

no caso das células-tronco, esse íon é ainda mais importante por estar também associado à proliferação e diferenciação [26]. Dessa forma, os efeitos tóxicos decorrentes do excesso desse íon devem ser considerados, como desbalanços de potencial de membrana, mudanças em expressão gênica e até mesmo morte celular [12]. No presente estudo, foi demonstrado que o menor excesso de cálcio no meio, o qual seria uma representação do cálcio livre (que não participa do *crosslinking*), já causa prejuízo às células-tronco mesenquimais, levando ao decréscimo de suas viabilidades se comparado àquelas contidas em meio sem cálcio extra.

Uma hipótese para explicar a menor viabilidade celular nos controles em relação aos *scaffolds* quando foram testadas diferentes concentrações de células é a chamada inibição por contato. Nesses casos, as células formam uma monocamada (2D) quando aderidas ao fundo do poço. Principalmente em altas concentrações de células (200.000 e 400.000/poço), a área do poço (de aproximadamente 0,84cm²) torna-se insuficiente para tamanhas densidades de células. Como há muita confluência, as células param de proliferar e, ainda, começam a morrer por falta de espaço [6], o que foi visualizado a partir da coloração com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio. Além disso, as células também apresentaram mudança em sua morfologia. Já os *scaffolds* de alginato, por proverem às células um microambiente com estrutura tridimensional, acabam favorecendo sua sobrevivência. Por outro lado, pode-se pensar que 200.000 e 400.000 células são quantidades muito grandes para um *scaffold* de 100µL de volume; porém, considerando-se o número de células contidas em um tecido vivo, essa quantidade é bem pequena. Corroborando com isso, foi possível visualizar nas imagens de microscopia de fase e após coloração com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio que, nos *scaffolds*, as células ficam bem distanciadas umas das outras e ainda há muito espaço livre.

Quando foram testadas diferentes concentrações de cloreto de cálcio para o *crosslinking* do alginato, foi possível observar que, mesmo que com algum excesso do íon, as células nos *scaffolds* apresentaram melhor viabilidade que os poços controle. Esse resultado sugere o possível efeito protetor do alginato: enquanto as células, na ausência do alginato, foram prejudicadas com algum excesso de cálcio, quando na sua presença apresentaram maior viabilidade. Sugere-se que isso se deva ao fato de que quando em contato com o cálcio, o alginato gelifica, dificultando, dessa maneira, a passagem do íon para o seu interior. Somado a isso, deve estar

associada à vantagem do alginato em prover um ambiente 3D que se assemelha a um tecido vivo às CTM. Similarmente, um estudo realizado por Li e colaboradores mostrou que células tumorais apresentaram resistência à agentes citotóxicos quando cultivadas em arcabouços 3D (matrigel) se comparado às culturas 2D [15].

Em se tratando de transplante de biomateriais e CTM, de acordo com Hench et al., o sucesso de um biomaterial depende do chamado biorreconhecimento da superfície do mesmo pelas células do organismo que irá recebê-lo [18]. Esse processo se dá pela ação de receptores de membrana das mesmas, que reconhecem proteínas específicas contidas no biomaterial, promovendo a adesão e a estimulação do metabolismo intracelular. Se isso não ocorre, há a sinalização para o desenvolvimento de um processo inflamatório e consequente formação de cápsula fibrosa ao redor do biomaterial [18]. O alginato já demonstrou efeito favorável na regeneração de órgãos, como o fígado: uma matriz de alginato (sem células) implantada em camundongos manteve o fígado remanescente após a hepatectomia parcial prolongada, eliminando, assim, a lesão hepática e levando a um aumento da sobrevivência dos animais [23]. Outro estudo demonstrou vantagens do cultivo de células em matrizes de alginato como um promotor eficaz para a maturação de células de fígado em tecido hepático funcional, capaz de manter funções hepatocelulares prolongadas [5]. Outra estratégia a ser utilizada para futuras aplicações *in vivo* do alginato seria a associação do polímero com outros substratos, como por exemplo a fibronectina (proteína adesiva contida no plasma), que pode ser reconhecida por integrinas de células do organismo (receptores de membrana diretamente relacionados à adesão celular). Isso seria vantajoso não apenas às células circundantes ao biomaterial (no caso de um transplante) mas também àquelas contidas nele, uma vez que a adesão celular via integrinas facilita o início da sinalização para a diferenciação e consequentemente, a regeneração tecidual [18].

Hench e colaboradores também argumentam que a concentração de proteínas adesivas de um biomaterial tem influência direta na morfologia e metabolismo das células contidas nele. Pouca quantidade resulta em células esféricas, com apoptose elevada, baixas atividade celular e probabilidade de proliferação. Em grandes concentrações, as células tornam-se achatadas, com apoptose reduzida, atividade celular elevada e maior probabilidade de proliferação. Já em concentrações intermediárias, as células ficam arredondadas, com níveis medianos de apoptose, atividade celular e proliferação [18]. Assim sendo, a

associação de proteínas adesivas como a fibronectina ao alginato pode trazer grandes vantagens e isso ainda deve ser mais amplamente estudado com relação às células-tronco mesenquimais.

Pesquisadores também vêm investigando a combinação de alginato com outros biomateriais, como o ácido hialurônico [27], a hidroxiapatita [27], a poliacrilamida [20], a quitosana [16], a queratina [24], entre outros, apresentando, de modo geral, resultados promissores em termos de viabilidade celular. A escolha correta do material a ser associado ao alginato está intimamente ligada ao propósito de regeneração que se deseja obter. Por exemplo, o uso de materiais inorgânicos, como hidroxiapatita e vidros bioativos, leva à mineralização e à regeneração óssea; assim como o colágeno, que é utilizado para a regeneração de cartilagem [28].

Concluindo, o alginato, por todos os motivos expostos acima, bem como sua versatilidade de utilização, tem se tornado um candidato em potencial para uso em engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Trata-se de um biomaterial promissor e vem sendo extensivamente estudado a fim de se otimizar suas características para melhor se adaptar aos objetivos propostos. Com relação ao seu uso com célula-tronco, deve ser mais amplamente analisado com testes *in vivo* antes que se possa aplicá-lo em clínica.

V AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao apoio do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT).

VI REFERÊNCIAS

1. Banerjee, A., M. Artha, S. Choudhary, R. S. Ashton, S. R. Bhatia, D. V. Schaffer and R. S. Kane. The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials* 30:4695-4699, 2009.

2. Bernardi, L., S. B. Luisi, R. Fernandes, T. P. Dalberto, L. Valentim et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *JOE* 37:973-979, 2011.
3. Berthiaume, F., T. J. Maguire, M. L. Yarmush. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2:403-430, 2011.
4. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, E. M. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315- 317, 2006.
5. Dvir-Ginzberg M., Elkayam T., Cohen S. Induced differentiation and maturation of newborn liver cells into functional hepatic tissue in macroporous alginate scaffolds. *FASEB J.* 22:1440-1449, 2008.
6. Galle J., L. Preziosi, A. Tosin. Contact inhibition of growth described using a multiphase model and an individual cell based model. *Appl Math Lett* 22:1483-1490, 2009.
7. Galler K. M., F. P. Brandl, S. Kirchpof, M. Widbiller et al. Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, in press, 2017.
8. Giordano G, La Monaca G, Annibali S, Cicconetti A, Ottolenghi L. Stem cells from oral niches: a review. *Ann Stomatol.* 2:3-8, 2011.
9. Huebsch N., D. J. Mooney. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* 462:426-432, 2009.
10. Jalayeri M., A. Pirnia, E. P. Najafabad, A. M. Varzi, M. Gholami. Evaluation of alginate hydrogel cytotoxicity on three-dimensional culture of type A spermatogonial stem cells. *Int J Biol Macromol* 95:888-894, 2017.

11. Kanafi M. M., R. Pal, P. K. Gupta. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells. *Cell Biol Int.*, 37:126-136, 2013.
12. Kawano S., K. Otsu, S. Shoji, K. Yamagata, M. Hiraoka. Ca^{2+} oscillations regulated by Na^+ - Ca^{2+} exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 34:145-156, 2003.
13. Kumar G., C. K. Tison, K. Chatterjee, P. S. Pine, J. H. McDaniel, M. L. Salit, M. F. Young, C. G. Simon. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* 32:9188-9196, 2011.
14. Lee K. Y., D. J. Mooney. Alginate: properties biomedical applications. *Prog in Polymer Sci* 37:106-126, 2012.
15. Li Q., A. B. Chow, R. R. Mattingly. Three-dimensional overlay culture models of human breast cancer reveal a critical sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 332:821-828, 2010.
16. Li Z., H. R. Ramay, K. D. Hauch, D. Xiao, M. Zhang. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26:3919-3928, 2005.
17. Maurmann N., D. P. Pereira, D. Burguez, F. Pereira, P. I. Neto, R. Rezende, D. Gamba, J. Silva, P. Pranke. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. *Biomed Phys Eng Express*, in press, 2017.
18. Hench L. L., M. M. Pereira, R. L. Oréfice e J. R. Jones. "Biocompatibilidade, bioatividade e engenharia de tecidos" In: Biomateriais: fundamentos e aplicações, editado por R. L. Oréfice, M. M. Pereira e H. S. Mansur. Cultura Médica, 2006, pp. 481-506.
19. Priya R. B. and T. C. McDevitt. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med* 5:121-143, 2010.

20. Rana D., M. Ramalingam. Enhanced proliferation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells on tough hydrogel substrates. *Mater Sci Eng C* 76:1057-1065, 2017.
21. Rehm B. H. A. Alginates: biology and applications. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg; 2009.
22. Ruvinov E., S. Cohen. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook from ocean algae to patient bedside. *Adv Drug Del Rev* 96:54-76, 2016.
23. Shteyer E., A. Ben Ya'acov, L. Zolotaryova, A. Sinai, Y. Lichtenstein, O. Pappo, O. Kryukov, T. Elkayam, S. Cohen, Y. Ilan. Reduced liver cell death using an alginate scaffold bandage: a novel approach for liver reconstruction after extended partial hepatectomy. *Acta Biomater* 10:3209-3216, 2014.
24. Silva R., R. Singh, B. Sarker, D. G. Papageorgiou et al. Hybrid hydrogels based on keratin and alginate for tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* 2:5441-5451, 2014.
25. Siqueira R., N. Maurmann, D. Burguêz, D. P. Pereira, A. N. S. Rastelli, O. Peitl, P. Pranke, E. D. Zanotto. Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against *Streptococcus mutans*. *Mat Sci Eng C*. 76:233-241, 2017.
26. Tonelli F. M., A. K. Santos, D. A. Gomes, S. L. da Silva, K. N. Gomes, L. O. Ladeira, R. R. Resende. Stem cells and calcium signaling. *Adv Exp Med Biol* 740:891-916, 2012.
27. Yu H., G. Cauchois, N. Louvet, Y. Chen, R. Rahouad, C. Huseltstein. Comparison of MSC properties in two different hydrogels. Impact of mechanical properties. *BioMed Mater Eng* 28:S193-S200, 2017.
28. Zhang N., Kohn D.H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. *Birth Defects Res* 96:63-81, 2012.

3 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi possível estudar e avaliar diversos parâmetros na produção de *scaffolds* de alginato para futuras aplicações na engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Foi possível, de certa forma, padronizar tais variáveis, o que contribuirá imensamente para estudos posteriores sobre o tema. O alginato mostrou-se vantajoso principalmente quando utilizado com grandes concentrações de células, por provê-las de uma microarquitetura tridimensional com boa biocompatibilidade. Foi, ainda, capaz de difundir adequadamente os nutrientes às CTM, o que refletiu na maior viabilidade das células nos *scaffolds* ao final dos experimentos. Além disso, o alginato com concentração final de 1% (m/v) e 50mM de cloreto de cálcio para o *crosslinking* foram considerados os melhores parâmetros para a produção dos hidrogéis adequados aos objetivos propostos, mimetizando tanto quanto possível, as características de uma matriz extracelular.

Como perspectivas para trabalhos futuros, pode-se pensar em investigar outras variáveis, de forma a aprofundar o entendimento sobre o comportamento das células-tronco mesenquimais nos *scaffolds*. Por exemplo, avaliar o ciclo celular por citometria de fluxo (tal experimento estava originalmente contido no projeto deste trabalho de conclusão de curso, porém, por problemas técnicos, não foi possível realizá-lo), ensaio de diferenciação celular no biomaterial e avaliação do possível efeito protetor do alginato via análise de expressão de genes envolvidos em apoptose. Ainda, a associação do alginato com outros substratos e/ou biomateriais, como proteínas de adesão, fibrina e quitosana, por exemplo, parece ser promissora. Por fim, seria também interessante realizar testes *in vivo* baseados nos resultados obtidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ANKRUM, James A; ONG, Joon F.; KARP, Jeffrey M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nature Biotechnology**, v. 32, p.252-260, fev 2014.
- BANERJEE, Akhilesh et al. The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. **Biomaterials**, v.30, p.4695-4699, set 2009.
- BERNARDI, Lisiane et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **JOE**, v. 37, p. 973-979, jul 2011.
- BERTHIAUME, François; MAGUIRE, Timothy J.; YARMUSH, Martin L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 2: p. 403-430, jul 2011.
- BERTINE, Mônica A. H.; ARAUJO, Felipe S. Biologia e uso clínico das células-tronco mesenquimais: uma revisão concisa. **Investigação**, v. 9, n. 2/3, p. 105-110, dez 2009.
- CAN, Alp. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. **Turk J Hematol**, v. 25, n. 2: p.57-59, jun 2008.
- DOMINICI, Massimo et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, fev 2006.
- DVIR-GINZBERG, Mona; ELKAYAM, Tsiona; COHEN, Smadar. Induced differentiation and maturation of newborn liver cells into functional hepatic tissue in macroporous alginate scaffolds. **FASEB J**, v. 22, n. 5, p. 1440-1449, dez 2008.
- GALLE, Jorg; PREZIOSI Luigi; TOSIN, Andrea. Contact inhibition of growth described using a multiphase model and an individual cell based model. **Applied Mathematics Letters** v. 22, n. 10, p. 1483-1490, out 2009.
- GALLER, Kerstin M et al. Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. **Tissue Eng Part A**, in press, 2017.
- GIORDANO, Guido et al. Stem cells from oral niches: a review. **Ann Stomatol**, v. 2, p. 3-8, jun 2011.
- HENCH, Larry L.; PEREIRA, Marivalda M.; ORÉFICE, Rodrigo L. e JONES, Julian R. Biocompatibilidade, bioatividade e engenharia de tecidos. In ORÉFICE, Rodrigo L.; PEREIRA, Marivalda M.; MANSUR, Herman S (Edt.). **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro. Cultura Médica, 2006, p 481-506.
- HUEBSCH, Nathaniel, MOONEY, David J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, v. 462, p. 426-432, nov 2009.

JALAYERI, Maryam et al. Evaluation of alginate hydrogel cytotoxicity on three-dimensional culture of type A spermatogonial stem cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 888-894, fev 2017.

KANAFI, Mohammad M; PAL, Rajarshi; GUPTA, Pawan K. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells. **Cell Biol Int** v. 37, p. 126-136, jan 2013.

KAWANO, Seiko et al. Ca^{2+} oscillations regulated by Na^{+} - Ca^{2+} exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells. **Cell Calcium**, v. 34, p.145-56, ago 2003.

KOBOLAK, Julianna et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p. 62-68, abr 2016.

KUMAR, Girish et al. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. **Biomaterials**, v. 32, n, 35, p. 9188-9196, dez 2011.

LEE Kouen Y; MOONEY David J. Alginate: properties biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, jan 2012.

LI Quanwen; CHOW, Albert B; MATTINGLY, Raymond R. Three-dimensional overlay culture models of human breast cancer reveal a critical sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 332, n. 3, p. 821-828, mar 2010.

LI Zhensheng et al. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3919-3928, jun 2005.

MAURMANN, Natasha et al. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express**, in press, 2017.

RANA, Deepti; RAMALINGAM, Murugan. Enhanced proliferation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells on tough hydrogel substrates. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 1057-1065, mar 2017.

REHM Bernd H. A. **Alginates: biology and applications**. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg; 2009, 266 pp.

RUVINOV, Emil; COHEN, Smadar. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook from ocean algae to patient bedside. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 96, p. 54-76, jan 2016.

SHTEYER, Eyal et al. Reduced liver cell death using an alginate scaffold bandage: a novel approach for liver reconstruction after extended partial hepatectomy. **Acta Biomater**, v. 10, n. 7, p. 3209-3216, jul 2014.

SIQUEIRA, Renato et al. Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against *Streptococcus mutans*. **Materials Science & Engineering C**, v. 76, p. 233-241, mar 2017.

TONELLI, FERNANDA M. P et al. Stem cells and calcium signaling. **Adv Exp Med Biol**, v. 740, p. 891-916, fev 2012.

YU, Hao et al. Comparison of MSC properties in two different hydrogels. Impact of mechanical properties. **Bio-Medical Materials and Engineering** v. 28, n. 1, p. 193-200, mar 2017.

ZHANG, Nianli; KOHN, David H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. **Birth defects research (Part C)** v. 96, p. 63-81, mar 2012.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “ANNALS OF BIOMEDICAL ENGINEERING”

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Annals of Biomedical Engineering

MANUSCRIPT SIZE AND FORMAT

Manuscripts that do not meet our author guidelines will be rejected without review.

Manuscripts that report original research must NOT exceed 6,000 words, including references, but not tables and figures. The manuscript must have 1” margins and written in 12-point Arial or Calibri font. Authors should limit figures to a manageable number (no more than 8 Figures).

Authors may consider publishing additional illustrations as Electronic Supplementary Material. Rare exceptions to these guidelines will be made at the editor’s discretion. Figures and tables may be incorporated into the body of the text or included at the end of the text, after the references. If at the end of the text, please make sure they appear sequentially in the order in which they appear in the text, and indicate approximate placement in the text. Pages should be numbered consecutively beginning with the title page. Each original manuscript must have the following sections only: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if any), References.

Please use the indicated subheading titles and not other titles.

Each section should be clearly labeled. Pages must be arranged, and labeled, as follows:

1. Title page
2. Abstract and key terms
3. Introduction
4. Materials and Methods
5. Results
6. Discussion
7. Acknowledgments

8. References

Review manuscripts may be longer, but no more than 8,000 words, excluding references, and they do not need to include the same section labels.

The text should be clear and concise, conforming to accepted standards of English. As indicated, unless manuscripts follow these guidelines, they will be rejected without review.

REFERENCES AND CITATION FORMAT

References are limited to pertinent published works or papers that have been accepted for publication. Usually this is achieved with fewer than 30 references. An abstract may be cited only when it is the sole source.

References should be typed separately, double-spaced, arranged alphabetically by author, and numbered serially, with only one reference per number. The number appropriate to each reference should be superscripted at the proper point in the text. The formats are:

Journal articles. Last name of first author, followed by initials, initials and last names of each coauthor; title of article (first word only capitalized); name of journal (abbreviated as in *Serial Sources for the BIOSIS Data Base*, published by BioSciences Information Service), volume, inclusive pages, and year.

Example: 1. Haselton, F. R., R. E. Parker, R. J. Roselli, and T. R. Harris. Analysis of lung multiple indicator data with an effective diffusivity model of capillary exchange. *J. Appl. Physiol.* 57:98–109, 1984.

Book references. Author(s) as above; title of book (main words capitalized); city of publication; publisher; year and pages, e.g.,: Thompson, D. A. W. *On Growth and Form*. Cambridge: Cambridge University Press, 1961, 346 pp.

For chapter in an edited book: Glass, L. and A. Shrier. "Low dimensional chaos in the heart." In: *Theory of Heart: Biomechanics, Biophysics, and Nonlinear Dynamics of Cardiac Function*, edited by L. Glass, P. Hunter, and A. McCulloch. New York: Springer-Verlag, 1991, pp. 289--312.

For full author instructions, please click on the links below:

[Manuscript Size and Format](#)

[Suggesting Reviewers and Associate Editor](#)

Submission
Research Articles
Revisions
References and Citation Format
Figures
Submission of Electronic Figures, General
Submission of Scanned Figures
Tables
Mathematical Formulas and Equations
Review Articles
Letters to the Editor
Auxiliary Materials
Unique Materials, Data and Computer Code
Experimental Procedures
Copyright
Permissions
Proofs
Reprints
Springer Open Choice
Examples of Areas of Interest
Guiding Principles for Research

Manuscripts that do not meet our author guidelines will be rejected without review.

Manuscripts that report original research must NOT exceed 6,000 words, including references, but not tables and figures. The manuscript must have 1" margins and written in 12-point Arial or Calibri font. Authors should limit figures to a manageable number (no more than 8 Figures).

Authors may consider publishing additional illustrations as Electronic Supplementary Material. Rare exceptions to these guidelines will be made at the editor's discretion. Figures and tables may be incorporated into the body of the text or included at the end of the text, after the references. If at the end of the text, please make sure they appear sequentially in the order in which they appear in the text, and indicate approximate placement in the text. Pages should be numbered

consecutively beginning with the title page. Each original manuscript must have the following sections only: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if any), References.

Please use the indicated subheading titles and not other titles.

Each section should be clearly labeled. Pages must be arranged, and labeled, as follows:

1. Title page
2. Abstract and key terms
3. Introduction
4. Materials and Methods
5. Results
6. Discussion
7. Acknowledgments
8. References

Review manuscripts may be longer, but no more than 8,000 words, excluding references, and they do not need to include the same section labels.

The text should be clear and concise, conforming to accepted standards of English. As indicated, unless manuscripts follow these guidelines, they will be rejected without review.

- Title:

The title should be informative. It should contain no unnecessary words and should not exceed 116 characters including spaces between words. The title page should have the title of the article, author(s), department and institution in which the work was done with address, an abbreviated title for the running head (not exceeding 55 characters including spaces between words), name and address for correspondence, and a contact telephone number, FAX number, and email.

- Abstract:

A one-paragraph abstract of not more than 200 words must accompany each manuscript. It should state concisely the reason for the study, what was done, what was found, what was concluded, and the relevance.

- Key Terms:

After the abstract, list three to ten terms not included in the title.

- Abbreviations, symbols, and terminology:

Include in the manuscript a list of new or special abbreviations used in the paper, with spelled-out form or definition. Frequently used abbreviations need only be defined at first mention. For commonly accepted abbreviations, word usage, symbols, etc., authors are referred to the CBE Style Manual (sixth edition, 1994). Chemical and biochemical terms and abbreviations should be in accordance with the recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature. Isotope specification should conform to the IUPAC system.

- Glossary of terms:

When only a few symbols and terms are used, define each one when it is first introduced.

The definition should include:

- 1) the symbol (Roman or Greek),
- 2) its name,
- 3) a definition in words, and
- 4) units.

- Units:

Authors should use the International System of Units (SI) except where common usage contradicts. Authors may follow the SI units with the equivalent value in common units (usually c.g.s. system) in parentheses. Units with more than two components should be written without slashes or dots, using superscripts, as in $\text{ml g}^{-1} \text{s}^{-1}$ for flow per gram of tissue. Units such as ml/g/s are unacceptable.

- Spelling:

Follow Webster's Third New International Dictionary for spelling, compounding, and word division.

- Drugs, Chemicals, and Trade Names:

Proprietary (trademarked) names should be capitalized. Check spelling. The chemical or generic name should precede the trade name or abbreviation the first time it appears.

- Footnotes:

Avoid footnotes. Use parenthetical statements in the text instead.

- Acknowledgments:

At the end of the article one or more statements should specify

- (a) contributions that do not justify authorship;
- (b) technical help;
- (c) financial and material support, specifying the nature of the support;
- (d) financial relationships that may pose a conflict of interest.

Manuscripts should meet the requirements outlined above to avoid delay in review and publication. With the exception of the style and ordering of the references, these style requirements match the "Uniform Requirements" published by the International Committee of Medical Journal Editors (Ann. Intern. Med. 126:36--47, 1997). An online version of the "Uniform Requirements" can be viewed at the end of the chapter.

ABME discourages submissions of routine computational simulations that produce easily anticipated results, lack experimental validation, or represent incremental advancements of understanding.

Papers must be submitted via upload in a word processing format, preferably in Microsoft Word. Authors can submit LaTeX manuscripts as is through our online submission process. Our software can accept LaTeX manuscripts, and usually formats them properly when converting them to PDF. Errors that occur in the conversion to PDF will be fixed when the paper is being prepared for publication. However, Microsoft Word files are preferred for upload.

Persons who have contributed intellectually to the paper but whose contributions do not justify authorship may be named and their function or contribution described. For example, "scientific advisor," "critical review of study proposal," "data collection," or "participation in clinical trial" are appropriate. Such persons must have given their permission to be named. Authors are responsible for obtaining written permission from persons acknowledged by name.

Reviewers and Associate Editor

Authors must suggest at least one (1) Associate Editor to oversee their manuscript, and also suggest at least four (4) potential reviewers. Reviewer suggestions must include email addresses. However, there is no guarantee that the suggested associate editor or reviewers will be used. Authors must also select five

(5) classifications for their manuscript. Authors should also add personal classifications if they like.

Submission

Manuscripts are to be submitted on–line at the link below.

- <http://abme.edmgr.com>

RESEARCH ARTICLES

Research manuscripts must be original papers, submitted in English. Language must conform to acceptable English usage and syntax. The contents must be clear, accurate, coherent, and logical. In accepting or rejecting a manuscript, the editors will also consider its originality, teaching value, and validity. Manuscripts are accepted for review with the understanding that the same work has not been and will not be published elsewhere, that all persons listed as authors have given their approval for the submission of the paper and further, that any person cited as a source of personal communications or whose effort is recognized in an acknowledgment has approved such citation. Written authorization may be required at the Editor's discretion. Articles published in the ANNALS represent the opinions of the author(s) and should not be construed to reflect the opinions of the Editor(s) or the Publisher.

Revisions

Manuscripts are considered for up to two revisions only. If a manuscript cannot be accepted after the second revision, it will no longer be considered.

References and Citation Format

References are limited to pertinent published works or papers that have been accepted for publication. Usually this is achieved with fewer than 30 references. An abstract may be cited only when it is the sole source.

References should be typed separately, double–spaced, arranged alphabetically by author, and numbered serially, with only one reference per number.

The number appropriate to each reference should be superscripted at the proper point in the text. The formats are:

- Journal articles. Last name of first author, followed by initials, initials and last names of each coauthor; title of article (first word only capitalized); name of journal (abbreviated as in Serial Sources for the BIOSIS Data Base, published by BioSciences Information Service), volume, inclusive pages, and year.

Example: 1. Haselton, F. R., R. E. Parker, R. J. Roselli, and T. R. Harris. Analysis of lung multiple indicator data with an effective diffusivity model of capillary exchange. *J. Appl. Physiol.* 57:98–109, 1984.

- Book references. Author(s) as above; title of book (main words capitalized); city of publication; publisher; year and pages, e.g., Thompson, D. A. W. *On Growth and Form*.

Cambridge: Cambridge University Press, 1961, 346 pp.

For chapter in an edited book: Glass, L. and A. Shrier. "Low dimensional chaos in the heart." In: *Theory of Heart: Biomechanics, Biophysics, and Nonlinear Dynamics of Cardiac Function*, edited by L. Glass, P. Hunter, and A. McCulloch. New York: Springer-Verlag, 1991, pp. 289--312.

References to government technical documents should be included only when their availability is assured. Citations such as "unpublished observations" or "personal communication" should not be included in the reference list but may be added in parentheses in the text. Authors are responsible for obtaining permissions for reproduced material, cited correspondence.

FIGURES

Figures published in the journal may be scanned using a digital scanner and integrated with the text of the article to compose completely electronic pages. Please conform with the following guidelines when preparing your illustrations for submission.

Submission of Electronic Figures, General

Authors are requested to supply electronic versions of figures in either Encapsulated PostScript (EPS) or TIFF format. Many other formats, e.g., Proprietary Formats, PiCT (Macintosh) and WMF (Windows), are discouraged and may require hard copy submission.

Figures should be saved in separate files without their captions. Captions should appear with the text of the article. Files should be named according to DOS conventions, e.g., figure1.eps. For vector graphics, EPS is the preferred format. Lines should not be thinner than 0.25pts and in-fill patterns and screens should have a density of at least 10%. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman and Helvetica. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: black-and-white line figures — 1200 dpi; line figures with some gray or colored lines — 600 dpi; photographs — 300 dpi; screen dumps — leave as is.

Submission of Scanned Figures

- Number figures in the order in which they appear in text. Label illustrations with their number, the name of the first author, and "ABME" on the front of the figure well outside the image area. Indicate the top of the figure.
- Place only one figure per page. Place separate parts of the same figure on one sheet of paper, spaced 1/4 in. apart and leaving a 2-inch bottom margin. Label all figure parts with (a), (b), etc. Make sure each figure is straight on the page. Photocopies of artwork are not acceptable.
- Prepare illustrations in the final published size, not over-sized. Figures should be sized for one column width of the journal (3.25 in.) in order to avoid problems arising from large reductions in size during scanning. This is especially important for screened or shaded illustration. Reduction of screened/shaded originals during the digitizing process introduces a Moir pattern.
- Do not use correction fluid or tape on the illustrations. The scanner is extremely sensitive and reproduces all flaws (e.g., correction fluid, tape, smudges, dust). Do not write on the back of the figure because it will be picked up by the scanner.

- Ensure a minimum of 8–point type size (2.8 mm high; 1/8 in. high) and 1–point line width with illustrations (a 3–point line width if reduction is required.) Avoid inconsistencies in lettering within individual figures, and from one figure to the next. Lettering and symbols must not be handwritten. Avoid small open symbols that tend to fill in if any reduction is necessary.
- Author's laser–generated graphics are acceptable only if the lettering and lines are dark enough, and thick enough, to reproduce clearly, especially if reduction is necessary. Remember that fine lines in laser–generated graphics tend to disappear upon reduction.
- Submit continuous–tone photographs in final published size on white glossy or matte paper. Avoid glossy paper stock that is off–white, ivory, or colored because contrast within the illustration will be lost in reproduction. Print the photograph with more contrast than is desired in the final printed journal page. Avoid dull, textured paper stock, which will cause illustrations to lose contrast and detail when reproduced.
- All color images submitted will be published in full color in print and online at no extra charge.
- The approximate position of each figure should be indicated in the manuscript.

Tables

- Statistical summary tables are acceptable. Tables with many lines of individual values may be submitted as Supplementary Material (see below).
- Number tables consecutively with Arabic numerals and prepare with the size of the journal page in mind: 3.25 inches wide, single column; 6.75 inches wide, double column
- Type each table double–spaced on a separate page.
- Give each table a brief title; explanatory matter should be in footnotes, not in the title.
- Tables must not duplicate material in text or figures.

- Omit horizontal and vertical rules when possible.
- Omit non-significant decimal places in tabular data.
- Use short or abbreviated column heads and expand in footnotes if necessary.
- Identify statistical measures of variations, e.g., SD, s.e.m., etc.
- List table footnotes in the order of their appearance and reference them with the standard symbols (* | ?) — consecutive superior letters should be used throughout.
- The approximate position of each table should be indicated in the manuscript.

MATHEMATICAL FORMULAS AND EQUATIONS

Mathematical aspects should be addressed to readers who are not mathematicians. The presentation should include the mathematical strategy, the assumptions on which the mathematics are based, and a summary of the meaning of the final mathematical statement and its limitations. Lengthy or complex mathematical developments central to the article may be put in an appendix.

Structural chemical formulas and complicated mathematical equations should be simplified as much as possible and carefully checked. All subscripts, superscripts, Greek letters, and other unusual characters must be clearly identified in penciled notes in the margin where they first appear. Distinguish between 1 (one) and the letter l (el), 0 (zero) and the letter O, Ç and letter x. Use the slant line (/) for simple fractions (a b)/(x y) in the text rather than the built up fraction, which should be used if the equation is offset from the text. Use subscripts or superscripts wherever feasible and appropriate, because they often simplify the equations [RARD instead of RARD or (RA) (RD)]. Use circles for pools in compartmental or flow-type models and whole arrows for interconnections or flows (not arrows with half-heads, as in reversible chemical equations). Do not use nonstandard mathematical notations; e.g., do not use computer symbols in equations (* for multiplication). Use lowercase letters for time-varying symbols in compartmental model equations, preferably q(t) for masses, c(t) for concentrations, with subscripts as needed. Our convention for numerical

subscripts for rate constants (k_{21}) is the same as that used in most life sciences but opposite to that currently used in pharmacokinetics, i.e., our k_{ij} is the fractional rate of transfer from compartment j to compartment i (or to compartment i from compartment j). Our notation is consistent with standard nomenclature in applied mathematics for matrices and matrix manipulation algorithms in commercial software packages for scientific/mathematical computations involving matrices. See Glossary of terms (above).

REVIEW ARTICLES

Submission of review articles is usually by invitation. However, authors who wish to submit a review article should contact the editor.

Letters to the Editor

Letters to the Editor that highlight controversies, ambiguities, or misapplications of theory or method can also be considered. Letters must be typewritten, double-spaced, and include a title. They should be short. Letters are reviewed by the appropriate editor and are subject to editing and possible abridgment. If a letter is found acceptable, a copy will be sent to the author of the article under discussion. The author will have an opportunity to respond with material that will be also considered for publication.

Auxiliary Materials

The Editor, after acceptance, may recommend that auxiliary material containing important data too extensive to publish be deposited with an archival service, such as the National Auxiliary Publications Service in the United States, or otherwise made available by the authors. In that event, an appropriate statement supplied by the authors should be added to the accepted manuscript. Submit such materials for consideration along with the manuscript.

Unique Materials, Data and Computer Code

Work published in the Journal must necessarily be independently verifiable. Authors describing results derived from the use of antibodies, recombinant plasmids and cloned DNAs, mutant cell lines or viruses, and other similarly unique materials are expected to make such materials available to qualified investigators on request.

Authors should also submit published nucleic acid/amino acid sequences to a widely accessible data bank.

Authors are encouraged to archive experimental methods of procedure, data, models, detailed derivations of equations, computer algorithms and subroutines.

Computer codes used for special analyses or modeling should be made available to reviewers and readers whenever possible, either through e-mail, via FTP, or other means.

Experimental Procedures

The Society endorses the principles embodied in the Declaration of Helsinki as defined in the "Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings."

COPYRIGHT TRANSFER

The Journal is copyrighted for the protection of authors and the Society. A copyright transfer form will be sent to the author who submits the manuscript. The transfer form must be completed and returned before the work will be typeset.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice License.

CODE OF PUBLICATION ETHICS

The Biomedical Engineering Society seeks to maintain high standards concerning publication ethics within its professional community and within the broader publishing community. In order to insure adherence to these standards, authors will be asked to respond to a set of declarations about research conduct and publication preparation at time of submission of an article to a BMES journal. Authors will be asked to indicate that:

- all authors listed have agreed to be named as authors on this manuscript;
- any work (data, text, or theories) of others besides the authors has been properly acknowledged;

- the work is original and not previously published, except possibly as an abstract or conference proceeding and not in full-length form; and that,
- all data are true and accurate to the knowledge of the authors.

If the work involves human subjects, authors will be asked to indicate that the work has been performed with approval by the appropriate ethics review committees related to the institution(s) in which it was performed (e.g. Institutional Review Board, IRB), that the subjects gave informed consent to their inclusion in the study as required, and that the work adheres to the Declaration of Helsinki. In addition, authors will need to include a statement regarding approval, accordance, and consent in the Methods section of the manuscript.

If the work involves vertebrate animals, authors will be asked to indicate that the work was approved by and performed in accordance with guidelines of the institution(s) where it was performed (e.g. Institutional Animal Use and Care Committee, IACUC), and that it adheres to the Guide in the Care and Use of Laboratory Animals established by the U.S. National Academy of Sciences (or guidelines that insure equivalent or higher standards of care). In addition, authors will need to include a statement regarding approval and accordance appears in the Methods section of the manuscript.

If the work involves human embryonic stem cells, authors will be asked to indicate that the procurement and research has been performed with approval by the appropriate ethical committees (e.g. Embryonic Stem Cell Research Oversight committee, ESCRO) related to the institution(s) in which it was performed, and that it adheres to Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research established by the U.S. National Academy of Sciences (or equivalent guidelines regulating use of human embryonic stem cells as required by the government or funding agency supporting research at the institution(s)). In addition, authors will need to include a statement regarding approval and accordance in the Methods section of the manuscript.

If the study makes use of cells or tissues obtained by means other than commercial sale, authors will be asked to indicate that they have been obtained by means approved by the appropriate ethical committees (e.g. IRB) related to the institution(s) in which it was performed. In addition, authors will need to include a statement regarding approval and accordance in the Methods section of the manuscript.

Finally, the authors will be asked to declare all conflicts of interest relevant to their manuscript in a Conflict of Interest statement that must appear within the manuscript. In addition, authors will submit a Disclosure of Potential Conflicts of Interest Form with their manuscript at the time of initial submission to the BMES journal.

The Editor reserves the right to retract any published manuscript that is subsequently determined to involve a violation of one of the publication standards set forth above.

BMES Journals Code of Publications Ethics, adopted by BMES October, 2010.