

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

---

**USO DE MATRIZES DE NANOFIBRAS  
PRODUZIDAS ATRAVÉS DE *ELECTROSPINNING*  
NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO**

Geancarlo Zanatta

Orientador: Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-orientadora: Dra. Patrícia Pranke

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

---

**USO DE MATRIZES DE NANOFIBRAS  
PRODUZIDAS ATRAVÉS DE *ELECTROSPINNING*  
NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO**

Geancarlo Zanatta

Orientador: Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-orientadora: Dra. Patrícia Pranke

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2010

## Agradecimentos

- Ao professor Dr. Carlos Alexandre Netto pela orientação, oportunidade e palavras de incentivo;
- À professora Dra. Patrícia Pranke pela co-orientação e oportunidade de trabalhar com células-tronco e *electrospinning*;
- À professora Dra. Carmem Gottfried por todo o apoio, paciência e horas dedicadas ao meu auxílio e educação;
- Ao Dr. Markus Rudisile por ter me ensinado a técnica de *electrospinning*;
- À professora Dra. Melissa Camassola pelos ensinamentos sobre isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais;
- À professora Dra. Nance Nardi pelo carinho e auxílio na caracterização celular por citometria de fluxo;
- À professora Dra. Anna Christina Medeiros Fossati pelo carinho, instrução e livros emprestados;
- À professora Dra. Fátima Costa Guma pelo auxílio na caracterização celular;
- À professora Dra. Lenir Orlandi Pereira pelo auxílio estatístico;
- À Dra. Fernanda Timm pelo auxílio prestado com as culturas celulares;
- À Dra. Lucia Martini, Norma Silva da Silva e Luis Paulo Braga pela amizade;
- Aos colegas de laboratório: Daniela Steffens, Lisiane Bernardi, Daikelly Iglesias, Felipe Sassi, Maria da Glória Tramunt, Eduardo Sanches, Rafael Goldani, Regis G. Mestriner, Simone N. Weis, Luciano P. Rodrigues, Fernanda Cehetti, Cibele Canal Castro, Aline de Souza Pagnussat e Lauren Valentim;
- À Jaqueline, minha esposa, por todos os momentos em que esteve ao meu lado fornecendo seu carinho, apoio, compreensão e amor;
- E, aos demais que contribuíram de alguma maneira para este trabalho.

# Sumário

## Parte I

---

Resumo	2
Abstract	3
Lista de abreviaturas	4
Introdução	5
1.1 - Células-tronco	7
1.1.1 - Caracterização de Células-tronco Mesenquimais	8
1.2 - <i>Electrospinning</i>	10
1.3 - Cultivo de células-tronco em matrizes de nanofibras	12
1.4 - Distribuição celular em matrizes de nanofibras tridimensionais	16
Objetivos	19

## Parte II

---

Resultados	
Capítulo I	21
Capítulo II	43

## Parte III

---

Discussão	
4.1 – Obtenção e caracterização de matrizes de nanofibras produzidas por <i>electrospinning</i>	70
4.2 – Obtenção e caracterização de CTMs	71
4.3 - Diferenciação condrogênica em matrizes de nanofibras de PLGA	74
4.4 - A adesão de CTM em matrizes de nanofibras de PLGA é dependente de receptores integrina - $\beta$ 1	75
4.5 - Viabilidade celular após a incorporação em fibras de PVA através do processo de <i>electrospinning</i>	79
4.5 - Considerações finais	80
Conclusões	83
Bibliografia	84



# Parte I

## Resumo

A medicina regenerativa é um campo fascinante e tem chamado a atenção, nos últimos anos, pelo crescente esforço multidisciplinar em busca de metodologias adequadas para a reposição de tecidos danificados no corpo humano. Entre as técnicas utilizadas para desenvolver matrizes para o uso em engenharia tecidual está o *electrospinning*. Essa técnica que permite a produção de nanofibras através do uso de forças electrostáticas e tem sido empregado para a produção de matrizes fibrosas. As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco adultas com alta plasticidade e por isto alvo de muitos estudos terapêuticos. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos sendo que cada um tratou de um objetivo, como segue: (1) cultivar e diferenciar células-tronco mesenquimais em matrizes de nanofibras de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) produzidas através da técnica de *electrospinning* e investigar o envolvimento de receptores integrina- $\beta$ 1 no processo de adesão em matrizes de PLGA; (2) avaliar a viabilidade celular de células-tronco mesenquimais ou células mononucleares (CMNs) misturadas a uma solução de poli(álcool vinílico) (PVA) e submetidas a produção de fibras por *electrospinning*. No capítulo I, as CTM foram isoladas de camundongos da linhagem C57BL/6, cultivadas e submetidas a diferenciação condrogênica em matrizes de nanofibras de PLGA produzidas por *electrospinning*. Análises realizadas 24 horas após a semeadura demonstraram que as CTM eram responsivas e apresentavam morfologia semelhante a de fibroblastos com a presença de fibras de estresse de actina. O bloqueio dos receptores integrina- $\beta$ 1 reduziu (em cerca de 20%) a adesão celular e as observações demonstraram a perda das fibras de estresse de actina. Estes resultados demonstraram a habilidade das nanofibras de PLGA em ativar respostas celulares mediadas por adesão via integrina. No capítulo II foi avaliada a viabilidade de CTM e CMNs após terem sido processadas pelo *electrospinning*. As CTM foram extraídas da parede de cordão umbilical e as CMNs do sangue de cordão umbilical. Ambas as células foram misturadas a uma solução de PVA 10% e esta suspensão foi utilizada para produzir fibras pelo processo de *electrospinning* durante 30 minutos utilizando-se uma voltagem de 21 kV. Após o procedimento a viabilidade celular foi mensurada através de contagem celular com exclusão de células mortas por coloração com Trypan Blue. As CTM tiveram a viabilidade reduzida para 19.6%, e as CMNs para 8.38%. Os dados coletados sugerem a necessidade de mais estudos na busca de estratégias de proteção celular durante o *electrospinning*, uma vez que a elevada perda da viabilidade celular pode estar relacionada à alta viscosidade da solução polimérica, levando a redução do acesso ao meio nutritivo, associada aos efeitos do estresse mecânico e elétrico inerentes do procedimento. Os resultados gerais destes capítulos (1) demonstraram a habilidade das matrizes de nanofibras de PLGA em ativar respostas celulares via receptores integrinas- $\beta$ 1; (2) sugerem que a incorporação de células em matrizes fibrosas durante a produção de fibras através da técnica de *electrospinning* é um procedimento viável e pode ser utilizado como estratégia para a melhor distribuição celular na matriz formada. Juntamente, estes dados contribuem para o entendimento do comportamento das CTM em matrizes biodegradáveis e biocompatíveis produzidas por *electrospinning*, as quais podem ser utilizadas como material carreador em tratamentos clínicos envolvendo transplante celular.

## Abstract

Regenerative medicine is an amazing field that has called attention, in the last years, due to the multidisciplinary efforts to find suitable methodologies to regenerate damage tissues. Electrospinning is an important technique used to produce nanofibers and is employed to develop fibrous scaffolds. Mesenchymal stem cells (MSC) are adult stem cells with high plasticity and, for this reason, are widely studied in therapeutic approaches. The present study is composed by two chapters, with different aims, as follow: (1) culture MSC on poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanofiber scaffolds and induce them to chondrogenic differentiation and, analyze the influence of the integrin- $\beta$ 1 receptor in the adhesion of MSC on PLGA scaffolds; (2) analyze the viability of MSC and mononuclear cells (MNCs) mixed to a PVA solution after electrospinning. In the Chapter I, MSCs were isolated from C57BL/6 mice, cultured on PLGA scaffold produced by electrospinning technique and differentiated into chondrogenic lineage. After seeding, MSCs were responsive and become flattened with fibroblast-like morphology demonstrated by the presence of actin stress fibers. Integrin- $\beta$ 1 receptor blockage reduced (about 20%) cell adhesion with loss of actin stress fibers, demonstrating the ability of PLGA nanofiber to trigger integrin receptor-mediated cell adhesion. In the Chapter II, the viability of MSC and MNC after electrospinning were analyzed. MSC were extracted from the wall of the umbilical cord, and MNC from the umbilical cord blood. Cells were resuspended in a solution of poly(vinyl alcohol) (PVA) 10% and subjected to electrospinning during 30 minutes under a voltage of 21kV. Cell viability was assessed before and after the procedure by exclusion of dead cells by Trypan Blue staining. After electrospinning the MSC viability reduced to 19.6%, and the MNCs viability to 8.38%. These data suggest the need for more investigations looking for strategies to protect cell from the damages caused by electrospinning, as the loss of viability can be related to the high viscosity of the polymeric solution which reduced the access to nutrients associated to the electric and mechanical stress during electrospinning. The results of both chapters (1) demonstrated the ability of PLGA nanofiber to trigger integrin receptor-mediated cell adhesion; (2) suggested that the cellular incorporation into fibrous scaffolds produced by electrospinning is a viable process and can be used to improve the cellular distribution into scaffolds. The present data contribute to the understanding of MSCs' behavior on these biodegradable and biocompatible scaffolds that can be used as carriers in treatments involving cell transplantation.

## Lista de abreviaturas

CMNs	Células mononucleares
CTM	Células-tronco mesenquimais
MEC	Matriz extracelular
PGA	Poli(glicolato)
PLA	Poli(lactato)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador beta-1

# 1 - INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa é um campo fascinante e tem chamado a atenção, nos últimos anos, pelo crescente esforço multidisciplinar em busca de metodologias adequadas para a reposição de tecidos danificados no corpo humano (Langer e Vacanti, 1993; Modino e Sharpe, 2005). Devido aos avanços no entendimento de processos celulares/moleculares e às potencialidades apresentadas pela engenharia de materiais a união destes campos apresenta muitas possibilidades para a medicina regenerativa (Langer e Vacanti, 1993).

Reconstruir estruturalmente e funcionalmente um tecido lesado é uma tarefa complexa e o grau de dificuldade varia conforme as características naturais da região lesada. De forma simplificada, pode-se dizer que há três importantes aspectos envolvidos no sucesso da engenharia de tecidos: 1) o tipo celular utilizado; 2) o material utilizado como suporte; 3) a presença de moléculas sinalizadoras e sua influência no sistema.

A escolha do tipo e da origem celular depende de vários fatores, tais como as características da lesão, quantidade de material necessário e tecido a ser reconstruído. Um bom exemplo são as lesões de cartilagem, onde o número de condrócitos presentes no tecido adjacente à lesão não é, na maioria dos casos, suficiente para a adequada regeneração. Esse tecido, além de ser avascular, possui uma densa e complexa matriz extracelular (MEC), o que dificulta a mobilidade dos condrócitos residuais presentes na região periférica à área lesionada (Chung e Burdick, 2007; Pelttari *et al.*, 2009) limitando assim a auto-renovação espontânea. Uma alternativa ao baixo número de condrócitos e as dificuldades em multiplicá-los *in vitro* tem sido o uso de células-tronco adultas (Chung e Burdick, 2007), tais como as células-tronco mesenquimais (CTM),

que são capazes de substituir os condrócitos e apresentam propriedades imunomoduladoras desejáveis ao processo (Zeidan-Chulia e Noda, 2009).

Outra estratégia importante na engenharia de tecidos é a utilização de materiais sintéticos que forneçam adequado suporte mecânico e que sejam capazes de mimetizar a arquitetura, a estrutura e a função dos componentes da MEC natural (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2008). A MEC é uma estrutura complexa e elaborada contendo várias proteínas e polissacarídeos. Além de atuar como suporte mecânico na manutenção de tecidos e órgãos, a MEC também está envolvida em vários processos celulares, tais como proliferação, crescimento, sobrevivência, mudanças morfológicas, migração e diferenciação (Daley *et al.*, 2008). O remodelamento da MEC é um processo dinâmico e realizado através de interações celulares (receptores de MEC, tais como integrinas, lamininas e sindecans; proteínas modificadoras de MEC tais como metaloproteinases; tensão celular), sendo especialmente aumentado durante o desenvolvimento, cicatrização de lesões, doenças e em resposta a infecções (Daley *et al.*, 2008).

Vários esforços têm sido realizados buscando-se o entendimento da influência do microambiente na mobilização e ativação de células precursoras, bem como na indução da diferenciação de células-tronco. Em estudos de associação de células com biomateriais tem-se observado não somente a influência de fatores solúveis sobre mecanismos moleculares e alterações morfológicas, mas também de fatores físicos intrínsecos da matriz utilizada, tais como a topografia da superfície, o grau de porosidade, a área de contato e a presença de diferentes estruturas de ancoramento (Dalby *et al.*, 2002; Dalby *et al.*, 2003; Yim e Leong, 2005)

Ao longo deste trabalho será discutida a aplicação de CTM em associação com matrizes produzidas a partir de polímeros sintéticos pela técnica de *electrospinning* e alguns aspectos deste sistema.

## 1.1 - Células-tronco

As células-tronco, por definição, são células imaturas com a capacidade de auto-renovação por longos períodos que, quando devidamente estimuladas, são capazes de deixar o local onde estão, migrando para outra região onde darão origem a outros tipos celulares especializados, com morfologia e função definidas, capazes de substituir ou regenerar tecidos em um organismo vivo (Preston *et al.*, 2003).

As células-tronco podem ser classificadas em relação a sua origem como embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são aquelas oriundas da massa celular interna do blastocisto, e por isto são tidas como células imaturas presentes em um tecido imaturo em desenvolvimento. Essas células são capazes de dar origem aos 3 folhetos germinativos: ectoderma, mesoderma e endoderma. Já as células-tronco adultas são encontradas em vários locais de órgãos e tecidos já formados e consistem em células imaturas presentes em um tecido especializado. No tecido adulto as células-tronco são responsáveis pela homeostase respondendo a estímulos do ambiente (Walker *et al.*, 2009). Ainda, células-tronco podem ser classificadas, de acordo com a sua capacidade de gerar outros tipos celulares, na seguinte forma:

- 1) Totipotentes: células capazes de dar origem a todos os tipos celulares incluindo os anexos embrionários, tais como placenta e cordão umbilical;
- 2) Pluripotentes: são as células altamente versáteis, capazes de dar origem a linhagens celulares provenientes das três camadas germinativas de um embrião, mas não os anexos embrionários;
- 3) Multipotentes: são células em estágio mais avançado que as anteriores e são capazes de dar origem a vários outros tipos celulares, porém em número

limitado; as principais representantes desta classe são as células-tronco hematopoéticas.

As CTM são células-tronco adultas que apresentam grande plasticidade, sendo capazes de diferenciar-se em tipos celulares específicos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. As CTMs foram isoladas inicialmente em medula óssea e eram conhecidas como células estromais (Donald, 2002). Atualmente admite-se a possibilidade de residirem praticamente em todos os órgãos e tecidos em nichos perivasculares (Meirelles *et al.*, 2006). Sob determinadas condições, essas células podem ser estimuladas a replicar e/ou deixar o nicho em direção a tecidos lesados aonde irão se diferenciar para promover a regeneração da área afetada.

### **1.1.1 - Caracterização de Células-tronco Mesenquimais**

Segundo Dominici e colaboradores (2006), os critérios mínimos para que uma célula seja caracterizada como tronco mesenquimal devem ser: 1) adesão ao plástico em condições padrões de cultura; 2) caracterização imunofenotípica com expressão de marcadores específicos de células-tronco mesenquimais, tais como, CD105, CD73 e CD90, e ausência de expressão de marcadores hematopoéticos, tais como CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA-DR; 3) capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

A aderência de CTM ao plástico é uma etapa característica do processo de isolamento e cultivo, a qual permite uma seleção entre outros tipos celulares não aderentes. Meirelles e Nardi (2003), ao isolarem CTM observaram a presença de células da linhagem hematopoética em passagens iniciais com sua redução e homogeneidade das culturas após a décima passagem (Meirelles e Nardi, 2003). Novamente, ao isolarem CTM de medula óssea e baço, os mesmos autores observaram a presença de



pequena população de células com características de macrófagos nas primeiras passagens - indicando contaminação hematopoética - com a posterior purificação da cultura nas passagens subseqüentes (Meirelles *et al.*, 2006).

Para a identificação imunofenotípica pode-se recorrer à literatura, onde há uma vasta descrição de receptores e moléculas de superfície presentes na membrana celular, os quais, além de exercerem funções biológicas específicas, são freqüentemente empregados para na identificação de CTM (Meirelles e Nardi, 2003; Dominici *et al.*, 2006). Contudo, embora as CTM apresentem um grande número de marcadores de superfície, não há um marcador específico que possa isoladamente caracterizá-las, sendo necessário o uso de um painel contendo vários marcadores celulares para identificá-las, tais como a expressão de Sca-1, CD29, CD44, CD49d e CD49e (Meirelles e Nardi, 2003; Meirelles *et al.*, 2006).

Outro passo necessário após a obtenção de uma cultura homogênea é submetê-la a processos de indução de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. Vários protocolos podem ser encontrados na literatura descrevendo metodologias para a diferenciação celular e a escolha da técnica a ser utilizada, tanto para a diferenciação quanto para a detecção da diferenciação (quer seja por marcadores específicos ou corantes menos específicos) varia conforme o foco do trabalho ou os recursos disponíveis. Entre os métodos de coloração, que são simples e acessíveis, encontram-se alguns reagentes amplamente utilizados: *oil red O* ou *Sudan black* para evidenciar a presença de gotículas de gordura em adipócitos; *Alizarin red* ou *Van Kossa* que indicam a diferenciação osteogênica pela reação com a matriz secretada pelos osteoblastos; *Alcian blue* para evidenciar a diferenciação condrogênica através da coloração dos glicosaminoglicanos secretados (Chamberlain *et al.*, 2007; Dominici *et al.*, 2006). Outros métodos mais complexos, tais como RT-PCR e imunoistoquímica, podem

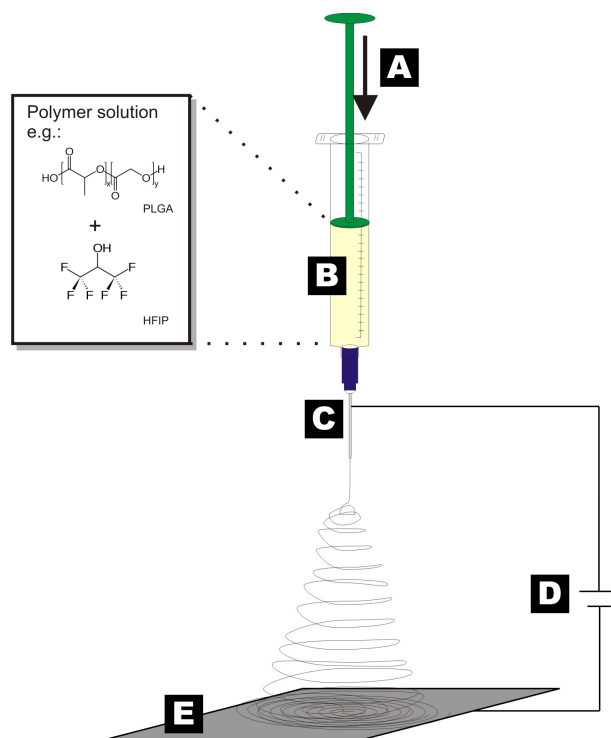
também ser empregados dependendo das moléculas ou estruturas que se pretende visualizar.

### **1.2 - *Electrospinning***

O *electrospinning* é uma técnica utilizada para criar filamentos sintéticos utilizando forças eletrostáticas. Esse processo tem ganhado muita atenção nas últimas décadas como método de produção de fios em tamanho nanométrico (Greiner e Wendorff, 2007). Essa técnica permite a produção de fibras poliméricas com diâmetros variando de 3 nm à mais de 5  $\mu\text{m}$  (Subbiah *et al.*, 2005). Tais fibras, com poros menores e maior área de superfície que fibras regulares, têm várias aplicações em nanocatálise, engenharia de tecidos, roupas protetoras, membranas filtrantes e eletrônica óptica (Frenot e Chronakis, 2003; Subbiah *et al.*, 2005).

O *electrospinning* é uma técnica atraente devido à simplicidade do equipamento utilizado, o qual consiste em uma seringa ou container, contendo polímeros derretidos ou uma solução polimérica, conectada à uma agulha ou capilar, uma bomba de pressão cuja finalidade é controlar o fluxo do polímero no sistema, uma fonte elétrica de alta voltagem e uma placa coletora feita de material condutor. Para o processamento do material, a solução é bombeada pelo capilar e um campo elétrico de alta voltagem é aplicado de forma a induzir a repulsão entre as cargas na solução polimérica. Devido à voltagem aplicada, ocorre uma deformação na gota formada na extremidade do capilar, alterando a sua forma para uma estrutura semelhante a de um cone (Taylor, 1964). Quando a força eletrostática supera a tensão superficial do polímero na extremidade do capilar a formação do jato é iniciada. Conforme o jato viaja em direção ao outro pólo, o solvente evapora permitindo a solidificação do material e formando uma fibra contínua

que será recolhida na placa coletora (Pham *et al.*, 2006). Um esquema de um aparelho de *electrospinning* pode ser visto na figura 1.



**Figura 1.** Esquema do processo de *electrospinning*. (A) Mecanismo utilizado para bombear a solução polimérica para fora do reservatório a uma velocidade controlada; (B) solução polimérica ou polímero derretido em condições específicas de concentração e viscosidade; (C) agulha metálica ou capilar conectada a um eletrodo; (D) fonte de alta voltagem; e, (E) placa coletora conectada ao outro eletrodo.

As características finais das fibras produzidas, tais como seu diâmetro, morfologia, grau de alinhamento e resistência mecânica podem sofrer interferência de vários parâmetros ajustáveis na técnica. Para esclarecer esses efeitos, vários estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar a correlação entre os parâmetros utilizados e a fibra resultante. Pham e colaboradores (2006) em sua revisão indicaram as variações de morfologia e diâmetro das fibras em função das mudanças nos parâmetros do

*electrospinning* (Pham *et al.*, 2006). Lee e colaboradores (2004) estudaram a influência do peso molecular sobre a estrutura as propriedades de nanofibras de PVA e demonstraram as condições ótimas para a obtenção de fibras uniformes (Lee *et al.*, 2004).

Entre os parâmetros que afetam o processo estão: o polímero utilizado e a conformação da sua cadeia, o solvente, a viscosidade e a concentração da solução, elasticidade, condutividade, polaridade e tensão superficial do solvente, campo elétrico aplicado, distância entre o capilar e o coletor, velocidade de fluxo da solução polimérica pelo sistema, temperatura e umidade relativa do ar (Frenot e Chronakis, 2003; Huang *et al.*, 2003).

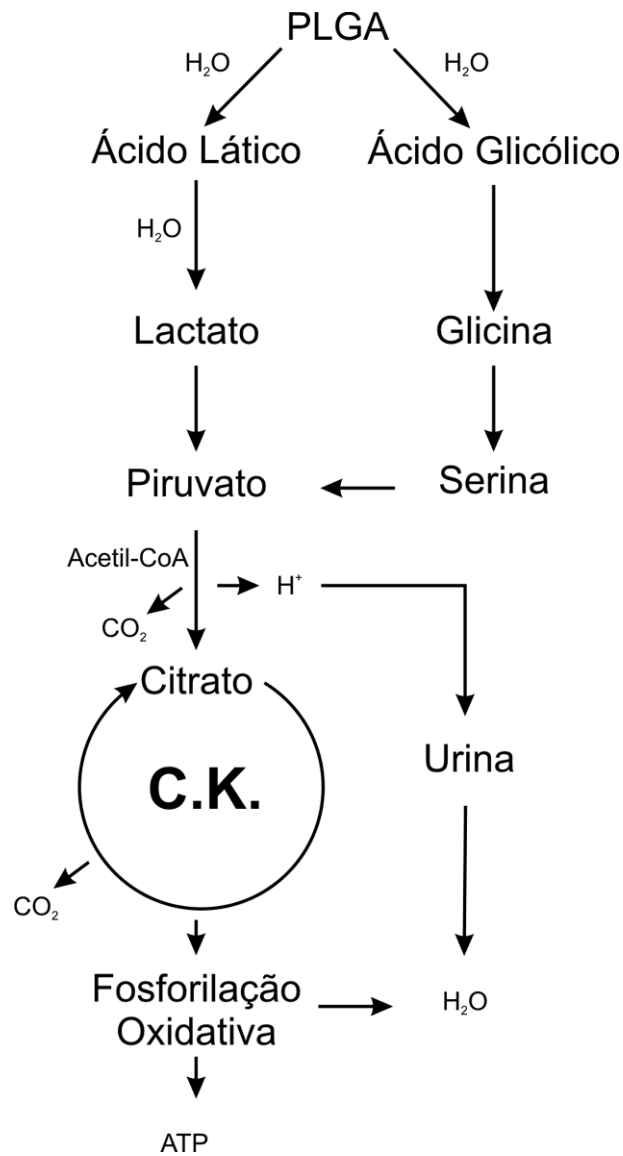
### **1.3 - Cultivo de células-tronco em matrizes de nanofibras**

Uma importante característica das matrizes de nanofibras produzidas por *electrospinning* é a elevada área de superfície em relação ao seu volume total. Nos últimos anos tem crescido o número de investigações sobre o uso desses materiais em áreas de interesse médico, tais como engenharia de tecidos, e encapsulamento e liberação controlada de drogas, entre outras aplicações (Zeng *et al.*, 2005; Dror *et al.*, 2008).

Dentre os materiais que podem ser processados através do *electrospinning* estão os biomateriais, os quais podem ser bioestáveis e/ou biodegradáveis. Para que um polímero seja considerado um biomaterial este deve apresentar algumas características, tais como: não-toxicidade, funcionalidade, biocompatibilidade e ser esterilizável (Rosiak *et al.*, 1995). Uma vez estabelecida a metodologia para a produção de fibras a partir de materiais biodegradáveis e biocompatíveis, estas poderão vir a ser utilizadas na fabricação de matrizes mais complexas que funcionem como suporte mecânico para as células, auxiliando a regeneração e/ou construção de tecidos, guiando células,

propiciando sua adesão e proliferação. Essas matrizes podem ser desenvolvidas com base em substâncias naturais ou sintéticas e, por sua natureza, estão sujeitas à degradação enquanto a regeneração e/ou construção de um novo tecido ocorrem (Boudriot *et al.*, 2006).

Dentre as opções de polímeros utilizados para produção de nanofibras para o cultivo celular está o copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA). Esse material, por ser biocompatível e apresentar propriedade de interesse clínico, tem sido amplamente utilizado em procedimentos médicos como sutura cirúrgica, carreadores de medicamentos e matrizes temporárias na engenharia de tecidos. Matrizes produzidas com PLGA, devido a natureza do copolímero, apresentam propriedades físicas, mecânicas, bem como o grau de degradação alterados conforme a proporção entre o poli(lactato) (PLA) e o poli(glicolato) (PGA) (Zong *et al.*, 2003). Quando degradado, o PLGA libera moléculas de ácido láctico e ácido glicólico, as quais são metabolizadas pelas células para a produção de energia (figura 2).



**Figura 2.** Rota metabólica de bioreabsorção dos poli(a-hidroxi ácidos) (PLA e PGA). Adaptado de Barbanti e colaboradores (Barbanti *et al.*, 2005).

Devido a influência exercida pelo microambiente no comportamento celular, um dos principais objetivos da engenharia de tecidos é obter materiais sintéticos capazes de mimetizar em algum grau a arquitetura, estrutura e função da MEC natural (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2008). Nesse contexto, sabe-se que variações topográficas e a funcionalização da superfície do biomaterial utilizado são responsáveis por alterações na atividade e metabolismo celular (Yim e Leong, 2005). Estudos têm demonstrado que

fibras produzidas por *electrospinning* possuem o potencial de mimetizar, em determinada escala, a MEC natural e de fornecer suporte à adesão, proliferação e manutenção do fenótipo ou diferenciação celular (Boudriot *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2006).

A adesão celular ao substrato sintético é regida por processos metabólicos envolvendo a participação de várias moléculas, tais como receptores integrina, citoesqueleto de actina e proteínas intracelulares associadas ao citoesqueleto como vinculina e talina (Daley *et al.*, 2008).

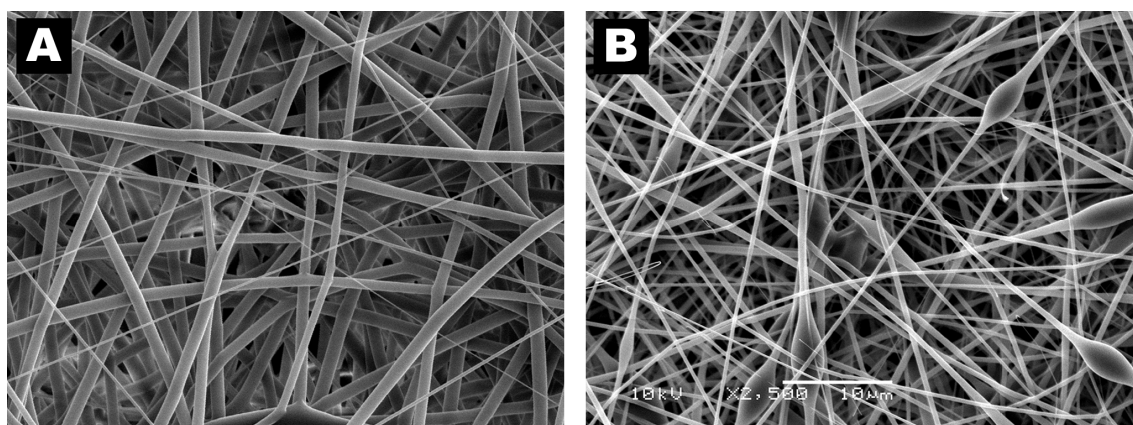
Os receptores integrinas consistem em uma família de receptores de membrana celular dispostos em heterodímeros formados por subunidades alfa e beta, as quais podem ser associadas em diferentes combinações alfa-beta e responder a diferentes ligantes (Hynes, 2002). As integrinas são moléculas que estão em contato com componentes da matriz extracelular e com o interior celular sendo, portanto responsáveis pela sinalização em sentido duplo: (a) transmitindo ao meio intracelular informações sobre o meio externo e (b) remodelando/interagindo com a MEC a partir de estímulos internos (Delon e Brown, 2007).

A adesão celular mediada por integrina é de relevante importância, uma vez que esta é responsável por ligar componentes da MEC com o citoesqueleto e modular cascatas de sinalização responsáveis pela regulação da morfologia celular, diferenciação, adesão, migração e proliferação (Schwartz e Assoian, 2001; Lathia *et al.*, 2009). Além do que, estudos tem demonstrado o envolvimento de receptores integrina- $\beta 1$  na retenção de células-tronco em seu nicho (Alonso e Fuchs, 2003) ou a mobilização para fora dele (Leone *et al.*, 2005).

#### 1.4 - Distribuição celular em matrizes de nanofibras tridimensionais

A reduzida porosidade muitas vezes encontrada em matrizes fibrosas pode dificultar a distribuição tridimensional das células por dificultar a sua penetração em camadas internas da estrutura.

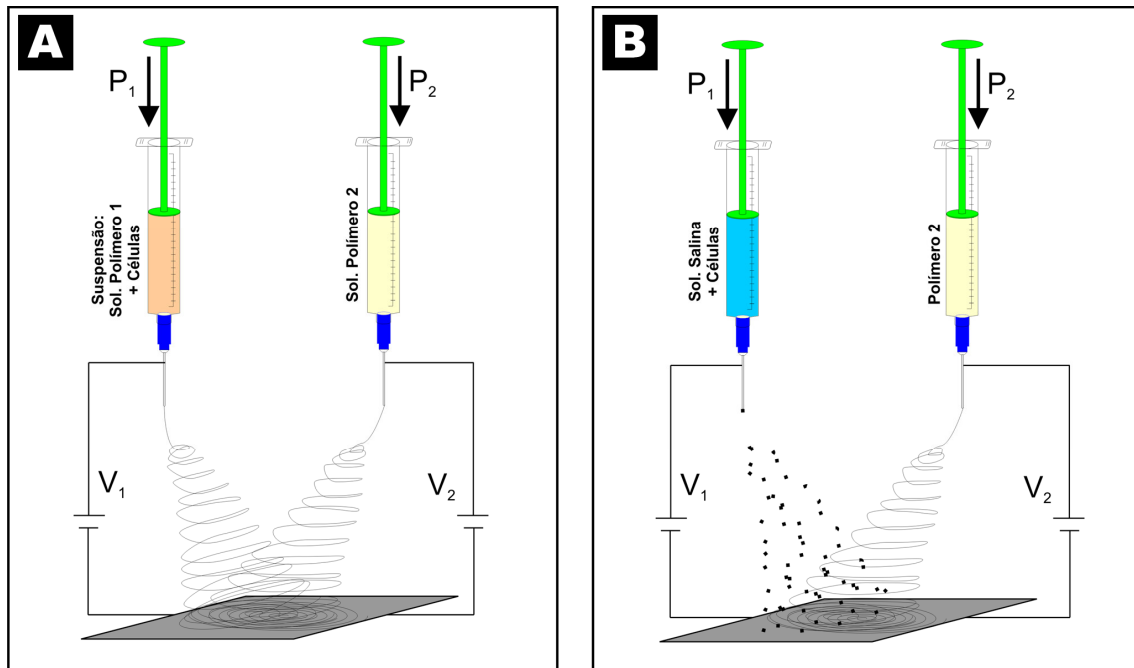
Durante a produção de matrizes através da técnica de *electrospinning* há vários parâmetros ajustáveis que interferem diretamente no diâmetro, formato e distribuição das fibras, entre outros aspectos. Quando as fibras são depositadas muito próximas umas das outras ocorre a redução na porosidade da malha criada, dificultando a posterior migração da célula para o interior da estrutura tridimensional. A modificação de alguns parâmetros pode produzir variações na topografia da superfície, tais como, a formação de estruturas conhecidas como *beads* ou o alargamento alternado da fibra (figura 3). Tais variações na superfície fazem com que sejam criadas regiões com diferentes densidades (Boudriot *et al.*, 2006), resultando em variações nos tamanhos dos poros, facilitando a migração/penetração celular.



**Figura 3.** Micrografias de nanofibras de PLGA, produzidas por *electrospinning*, demonstrando variações na porosidade final da matriz. (A) Fibras com superfície uniforme de diâmetro médio de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$ . (B) Fibras de diâmetro aproximado de 400 nm , com a presença de *beads*. Ampliação de 2.500 x.



Outra estratégia potencialmente utilizada consiste na distribuição das células em camadas internas da estrutura tridimensional, durante a fabricação da matriz, de forma que estas fiquem retidas e envolvidas pelas nanofibras, no interior da estrutura. Duas estratégias que podem ser utilizadas para este fim utilizando-se a técnica de *electrospinning* são: *electrospraying-electrospinning* e *co-electrospinning*. No *electrospraying-electrospinning* as fibras são formadas através de *electrospinning* e, simultaneamente, as células em solução salina são distribuídas entre as fibras depositadas através de *electrospraying* (figura 4B). Já a técnica de *co-electrospinning* é utilizada para a produção simultânea de dois tipos distintos de fibras e pode ser adaptada para facilitar a distribuição celular em estruturas tridimensionais através da mistura de células a uma solução polimérica a ser processada para a obtenção de fibras. Nesta proposta de *co-electrospinning*, dois capilares contendo diferentes soluções poliméricas são utilizados simultaneamente e há uma mescla entre as diferentes fibras durante a formação da estrutura. Como um dos polímeros tem a função de agir somente como veículo celular, o resultado final é a melhor distribuição das células na estrutura tridimensional (figura 4A).



**Figura 4.** Variações de processos para a produção de matrizes com células infiltradas na estrutura tridimensional. (A) Co-electrospinning: produção simultânea de dois tipos distintos de fibras por *electrospinning*, sendo que uma atua como veículo celular direcionando as células para a placa coletora. As fibras se misturam ao se aproximarem da placa coletora produzindo uma matriz mesclada. (B) *Electro-spraying-Electrospinning*: produção de matriz fibrosa por *electrospinning* com *spray* simultâneo de células pela técnica de *electro-spraying*. As células são depositadas na placa coletora de forma a ficarem retidas entre as camadas de fibras depositadas sobre elas.

## 2 - Objetivos

### Objetivos Gerais

- Cultivar e diferenciar células-tronco mesenquimais em matrizes de nanofibras de PLGA produzidas através da técnica de *electrospinning* e investigar os mecanismos envolvidos no processo de adesão em matrizes de PLGA;
- Avaliar a viabilidade celular quando células-tronco mesenquimais ou células mononucleares são misturadas a uma solução de PVA e submetidas a produção de fibras por *electrospinning*.

### Objetivos Específicos

- Estabelecer uma metodologia para diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais em matrizes de nanofibras de PLGA;
- Avaliar a influência do receptor integrina, subunidade  $\beta 1$ , no processo de adesão e na morfologia de células-tronco mesenquimais murinas cultivadas em nanofibras de PLGA;
- Mensurar a viabilidade de células-tronco mesenquimais originadas de cordão umbilical e de células mononucleares isoladas de SCUP após o processo de *electrospinning*;

## **Parte II**

## **3 – Resultados**

### **3.1 – Capítulo I**

Artigo submetido à revista *Bioprocess and Biosystems Engineering*.

## **Mesenchymal stem cell adherence on Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanofibers scaffold is integrin- $\beta$ 1 receptor dependent.**

Geancarlo Zanatta <sup>1,2</sup>, Markus Rudisile <sup>3</sup>, Melissa Camassola <sup>4</sup>, Joachim Wendorff <sup>3</sup>, Nance Nardi <sup>4,5</sup>, Carmem Gottfried <sup>6</sup>, Patricia Pranke <sup>2</sup>; Carlos Alexandre Netto <sup>1</sup>

1 Cerebral Ischemia Laboratory, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Prédio Anexo, 90035-003, Brazil;

2 Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Brazil;

3 Philipps-Universität Marburg, Department of Chemistry and Scientific Center for Materials Science, Hans Meerwein Strasse, 35032 Marburg, Germany;

4 Stem Cell and Gene Therapy Laboratory, Universidade Luterana do Brasil, Av. Farroupilha, nº 8001, 92425-900, Brazil;

5 Immunogenetics Laboratory, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91540-970, Brazil;

6 Neuroglial Plasticity Laboratory, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Prédio Anexo, 90035-003, Brazil.

### **CORRESPONDING AUTHOR**

Carlos Alexandre Netto

netto@gabinete.ufrgs.br

Phone: + 55 51 33083600

Fax: + 55 51 33083975

## **ABSTRACT**

Tissue engineering is a potential approach to regenerate damaged tissue by the combination and synergism among the scaffolding material, cell source and signaling factors. In the present study, MSCs were isolated from C57BL/6 mice, cultured on poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffold produced by electrospinning technique and differentiated into chondrogenic lineage. After seeding, MSCs were responsive and become flattened with fibroblast-like morphology demonstrated by the presence of actin stress fibers. Integrin- $\beta$ 1 receptor blockage reduced (about 20%) cell adhesion with loss of actin stress fibers, demonstrating the ability of PLGA nanofiber to trigger integrin receptor-mediated cell adhesion. The present data contribute to the understanding of MSCs' behavior on these biodegradable and biocompatible scaffolds that can be used as carriers in treatments involving cell transplantation.

## **KEYWORDS**

Mesenchymal stem cells; PLGA electrospun nanofibers; integrin- $\beta$ 1 receptor; cell adhesion

## 1 - Introduction

Tissue engineering is a potential approach to regenerate damaged tissue; the combination of synthetic materials, such as scaffolds, and cells has received special attention in the last few years (Liao *et al.*, 2006; Vasita e Katti, 2006). Nevertheless, the success of this approach depends upon the synergism among the scaffolding material, cell source and signaling factors present in the microenvironment (Chung e Burdick, 2007; Mano *et al.*, 2007).

Among the various types of materials used in tissue engineering, scaffolds based on nanofibers produced by electrospinning are widely studied. This technique is used to create synthetic filaments by the use of electrostatic forces. (Vasita e Katti, 2006; Greiner e Wendorff, 2007). Electrospun nanofibers have a large surface-to-volume ratio, giving support to the attachment and proliferation of a wide variety of cell types that are able to maintain their phenotypes (Boudriot *et al.*, 2006; Kim e Park, 2006; Pham *et al.*, 2006). The correct combination of electrospun scaffolds with cells from the appropriated source is of great importance for the success of engineered tissue.

MSCs are multipotent cells and were first found in bone marrow stroma. They have been identified in many tissues and function as pericytes on the surface of blood vessels; under the appropriate conditions these cells can differentiate to many cell lineages, including the chondrogenic lineage (Meirelles *et al.*, 2006). In the last few years, adult stem cells have been studied as an alternative for cartilage tissue engineering (Chung e Burdick, 2007) mainly because of their ability to substitute chondrocytes and immunomodulatory properties (Zeidan-Chulia e Noda, 2009). In addition, induction of *in vivo* chondrogenesis and cartilage formation were achieved when bone marrow derived-MSCs from Japanese rabbits were cultured on biodegradable and biocompatible PLGA scaffolds (Uematsu *et al.*, 2005). PLGA, after a suitable time, degrades into products that are harmless to the cells and tissues in the body and has been approved for several biomedical applications in humans and widely used to make sutures and other implantable structures, as well as 3-dimensional scaffolds to be used in tissue engineering (Wen *et al.*, 2007). Moreover, human mesenchymal stem cells (hMSCs) seeded in



PLGA nanofiber scaffolds were able to proliferate and differentiate into chondrogenic and osteogenic lineage (Xin *et al.*, 2007). Recently hMSCs cultured on electrospun and oriented polycaprolactone scaffolds were able to maintain cell alignment on the nano and microfibrinous scaffolds, but chondrogenic differentiation was greater on nanofibrous scaffolds, suggesting that cell orientation is controlled by the physical cues and minimally influenced by soluble factors (Wise *et al.*, 2009).

As surrounding components directly influence cell behavior, one of the main goals for the clinical use of engineered tissue is to develop synthetic materials which mimic the general architecture, structure and functions of extracellular matrix (ECM). Many attempts have been made to create constructs that simply mimic native ECM by acting as a scaffold for initiating tissue regeneration upon cell seeding (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2008). It is well known that the surface of the biomaterial plays an important role in cell activity and metabolism and is of fundamental relevance to tissue formation. Attachment and adhesion are the first processes involved in cell establishment upon a material surface followed by cell spreading and migration. Many molecules are involved in these processes, such as integrin receptors, actin cytoskeleton and intracellular cytoskeletally associated proteins like vinculin and talin (Daley *et al.*, 2008). Integrin receptors are found as heterodimers consisting of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits; these receptors respond to different ligand specificities (Hynes, 2002). Integrin-mediated cell adhesion is of relevant importance once they link ECM with cytoskeleton and signal transduction cascade to regulate cell shape, differentiation, adhesion, migration and proliferation (Schwartz e Assoian, 2001; Lathia *et al.*, 2009). There is evidence that integrin- $\beta$ 1 receptor is a marker that restricts stem cells from the skin epithelium to the epidermal stem cell niche (Alonso e Fuchs, 2003) and, in neuronal stem cells, regulates proliferation, survival and migration out of the niche (Leone *et al.*, 2005).

In the present study we used PLGA scaffolds, produced by electrospinning, to provide temporary support for cell growth and differentiation. In addition, this investigation aimed to identify PLGA nanofiber ability to trigger integrin receptor-mediated cell adhesion.

## **2 – Materials and Methods**

### **2.1 – PLGA nanofibers production**

Detailed electrospinning processing conditions have been published elsewhere (Zong *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2005). In this study, typical electrospinning parameters were as follows. Polymer solution was prepared by dissolving PLGA (75:25, Sigma - P1941) (molecular weight:  $6.6 \times 10^4$  -  $1.0 \times 10^5$  g/mol) in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) at a concentration of 12% w/v. Solution was fed at a rate of 0.34 mL/h through a syringe placed 15 cm from the collector plate and the applied voltage used was 21 kV. Room temperature was 24°C and 41% of relative humidity. Nanofibers were collected on round glass coverslips placed on the ground collector.

### **2.2 – Characterization of nanofibers**

Morphology and diameter of the electrospun nanofibers were studied using a scanning electron microscopy (SEM) (JEOL - JSM 6060 - JEOL Ltd.). Samples collected on glass coverslips were mounted on aluminum stub and sputter-coated with 10 nm of gold for analysis. Three SEM micrographs of distinct areas from every sample were used for analysis. Diameter analysis was performed by measuring the diameter of 30 fibers in every micrograph. The software used for the measurements and statistical analysis was ImageJ 1.38x.

### **2.3 – MSC isolation and culture**

Adult mice (8-9 weeks old) from the C57Bl/6 strain were used. Stem cells were isolated from the kidneys and cultivated as previously described (Meirelles *et al.*, 2006). Briefly, following cervical dislocation, part of the kidneys were washed with Hanks balanced salt solution (HBSS), cut in small pieces and transferred to a 15 mL flask for digestion with collagenase type I (1.0 mg/ml in DMEM/15 mM HEPES) for 1 h. Cells were transferred to polystyrene plastic 6 well tissue culture plates with medium consisting of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 15 mM HEPES, 1%

streptomycin/penicillin and 1.12  $\mu\text{L}/\text{mL}$  gentamycin. After 72 h, nonadherent cells were removed and the medium was changed every 3–4 days. Adherent cells were cultured to 80–90% confluence and reseeded at a split ratio of 1:2, empirically determined. Cells were maintained at 37°C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator; experiments were performed in triplicate.

#### **2.4 – Differentiation assays**

Mesenchymal differentiation capacity was performed as previously described (Blondheim *et al.*, 2006; Meirelles *et al.*, 2006) using cultures at 5th to 7th passage and 90% of confluence. The basic differentiation medium (BDM) consisted of DMEM supplemented with 15 mM HEPES, 1% streptomycin/penicillin and 1.12  $\mu\text{L}/\text{mL}$  gentamycin.

Osteogenic differentiation: osteogenic medium consisted of BDM supplemented with 10% (v/v) SFB, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich Ltd.),  $1 \times 10^{-8}$  M dexamethasone (Sigma-Aldrich Ltd.), and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich Ltd.). The medium was changed every three days. To evaluate the potential of osteogenic differentiation, cultures were washed with PBS and calcium deposition was assessed by alizarin red S staining.

Adipogenic differentiation: MSCs were cultivated in BDM supplemented with 10% (v/v) SFB,  $1 \times 10^{-8}$  M dexamethasone, 100  $\mu\text{M}$  indomethacin, 5  $\mu\text{M}$  rosiglitazone and 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin (Sigma-Aldrich Ltd.). Medium changes were carried out every 3 days. Adipogenic potential was determined by the formation of intracellular lipid droplets evidenced by oil red O staining solution (Sigma-Aldrich Ltd.).

Chondrogenic differentiation: Medium consisted of BDM supplemented with 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 10  $\text{ng}/\text{mL}$  TGF- $\beta$ 1 and 50nM L-ascorbic acid 2-phosphate solution. Chondrogenesis was evidenced by depositing a matrix rich in glycosaminoglycan sulfate stained by Alcian blue.

#### **2.5 – Antibodies and flow cytometry analysis**

MSCs at 7th to 8th passages were characterized by flow cytometry analysis. The cells in culture were trypsinized, centrifuged, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and

stained with primary antibodies against Sca-1, CD44, CD45, CD49d and CD49e (Becton Dickinson, San Jose, CA). Samples were incubated for 30 minutes at 4°C, in the dark. The cells were analyzed using a FACScalibur cytometer equipped with 488 nm argon laser (Becton Dickinson, San Diego, CA) with the CellQuest software. At least 10,000 events were collected.

## **2.6 – Chondrocytic differentiation on electrospun scaffold**

To verify the ability of MSCs to give rise to chondrogenic lineage when cultured in PLGA nanofiber cells at 7th passage, they were trypsinized, washed, resuspended and seeded on scaffolds. Initially only a droplet of 300 µL of cells was seeded on the scaffold in order to avoid cells adhering on the bottom of the well and after 1 h the medium was added to complete 1 mL. After 24 h the medium was changed by chondrogenic inductive medium as described above. The medium was changed every three days. Cells were cultured during for 16 days at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator.

## **2.7 – Integrin- β1 dependent adhesion**

To characterize the influence of integrin-β1 receptor over the adherence of MSCs to PLGA nanofibers,  $1.8 \times 10^6$  cells were cultured in six samples of scaffolds. Two independent experiments were performed in triplicate for each group. Initially, cells were harvested from 75 cm<sup>2</sup> flasks, centrifuged and resuspended in 1.5 mL of DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 15 mM HEPES, 1% streptomycin/penicillin and 1.12 µL/mL gentamycin. Cells were previously incubated with or without integrin-β1 antibody (Santa Cruz Biothechnology) prior to seeding. Cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. After 24 h of cultivation, scaffolds were rinsed with PBS to remove non-adherent cells and fixed for 30 min with 4% (w/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Ltd.) in PBS at room temperature. Cells were stained with 2.5 U/mL rodamin-phalloidin (Molecular Probe) and cell nuclei were stained with DAPI 0.2 µg/mL for 30 min. Images were obtained by confocal laser scanning microscopy.

### 3 – Results and discussion

In the present work MSCs were induced to chondrogenic differentiation on PLGA scaffolds. In addition, PLGA nanofibers were able to interact with integrin- $\beta$ 1 receptors, an important component of a family of molecules mediating ECM-cytoskeleton signalling. MSCs used in the experiment were obtained from the kidneys of C57BL/6 mouse and were isolated by adherence. To characterize the cells, cultures at 7th passage were subjected to chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation and immunophenotyping. After about 15 days, cells in chondrogenic medium were positively stained for the presence of glycosaminoglycans sulfate by Alcian blue. Osteogenic differentiation was evidenced at 18 days by the production of a calcium-rich mineralized matrix stained by alizarin red S. Cultures under adipogenic medium demonstrated cellular phenotype changes at about 20 days by showing intracellular lipid droplets, evidenced by oil red O (Fig. 1). Immunophenotyping displayed expression of Sca-1 (stem cell antigen-1), CD44 (hyaluronan receptor), CD49d (integrin  $\alpha$ 4), CD49e (integrin  $\alpha$ 5 chain) and was negative to CD45 (hematopoietic marker) (Fig. 2). No expression of CD45 was observed in these populations, indicating the absence of hematopoietic contamination sometimes observed during the initial passages in cultures derived from bone marrow and spleen (Meirelles *et al.*, 2006).

The scaffolds used were made of PLGA nanofibers produced by electrospinning. Samples were formed by non-woven randomly arranged fibers with an average diameter of  $413 \pm 141$  nm and spindle-like defects (Fig. 3).

In order to evaluate the ability of the scaffold to support MSCs growth and differentiation, chondrogenic differentiation of cells on the nanofibers was induced. As expected, the accumulation of a new and thick ECM, as verified by electronic microscopy analysis and the secretion of glycosaminoglycans sulfate evidenced by Alcian blue staining, was observed after two weeks of differentiation (Fig. 4). The replacement of the synthetic matrix by a new ECM produced by cells was expected and allows cells to organize a new environment that gives support to complete cellular development. These results showed that PLGA electrospun nanofibers were able to give support to cell differentiation while the degradation of

the scaffold was followed by natural matrix replacement. Present data are in accordance with those of Li and colleagues (2006), where chondrocytes were seeded in two types of poly(L-lactide) scaffolds, micro- and nanofibers. They have demonstrated that cell morphology can be regulated by fiber size and that nanofibers were more effective in the maintenance of chondrocytic phenotype and induction of cartilage-like activities (Li *et al.*, 2006). Chondrocytic differentiation of stem cells on fibrous scaffolds is relevant as cartilage, due to its structure and cell distribution, has a limited self-healing capacity and recovery still represents a great clinical challenge (Chung e Burdick, 2007; Pelttari *et al.*, 2009; Zeidan-Chulia e Noda, 2009). In our study, MSCs initially showed a well-spread phenotype 24 h after seeding on PLGA scaffolds, followed by changes in morphology and activity, over a period of time, with increase of ECM secretion when the medium was replaced by chondrogenic medium containing TGF- $\beta$ 1. This behavior is desirable because: 1) this system gives enough mechanical support to cellular adherence and spreading, providing adequate material to support differentiation to chondrocyte and ECM production; 2) this system can be used as carrier material in transplantation procedures, allowing MSCs to be firmly adhered to the material during the transport to the injured area.

Considering that adhesion is vital for cell survival in contact with new substrates and that integrin-mediated adhesion is involved in important cellular processes, the possible influence of integrin- $\beta$ 1 on adhesion of MSCs on PLGA electrospun scaffolds was investigated. After seeding, MSCs were highly responsive to the PLGA scaffold and become flattened among the fibers within 24 h. Analysis using a confocal microscope showed cells with fibroblast-like morphology and a good spreading on the scaffolds, with the presence of actin stress fibers distributed along the cytoplasm. Stress fibers are contractile cytoskeletal structures, tensile actomyosin bundles which allow sensing and production of force and provide cells with adjustable rigidity in cell adhesion processes (Howe *et al.*, 1998). Engagement of integrin receptors with extracellular ligands gives rise to the formation of complex multiprotein structures that link the ECM to the cytoplasmic actin cytoskeleton. Tension produced by cytoskeletal components, *in vivo*, interferes in the dynamic of ECM remodeling and is believed

to be influenced in part through its binding to integrin  $\alpha 5\beta 1$  during fibril formation (Daley *et al.*, 2008). The association between the tail of integrin- $\beta 1$  and actin cytoskeleton is made by association with proteins such as talin,  $\alpha$ -actinin and vinculin (Brakebusch e Fassler, 2003). These adhesive complexes are dynamic, often heterogeneous structures, varying in size and organization. In motile cells, sites of adhesion within filopodia and lamellipodia are also present and are referred to as “focal complexes”, whereas adhesions underlying the body of the cell and localized at the ends of actin stress fibers are referred to as “focal adhesions”. Signal transduction through focal complexes and focal adhesions has been implicated in the regulation of a number of key cellular processes, including growth factor induced mitogenic signals, cell survival and cell locomotion (Parsons, 2003; Delon e Brown, 2007). On the other hand, when MSCs were seeded after subunit  $\beta 1$  blockage, a high prevalence of diffuse actin filaments at the cortex of the cells was observed. In addition, cells were less responsive and a reduction of about 20% in adhesive ability to PLGA nanofibers was also observed. When studied under confocal microscopy, variations in cellular shape with diffuse organization of the actin filaments and loss of stress fibres was noted (Fig. 5).

As external stimuli can activate MSCs to leave the niche and contribute to tissue regeneration and wound repair, many studies has been focused on the environment that helps sustain the stem cell pool within each tissue/organ and the mechanisms controlling these processes (Spradling *et al.*, 2001; Blanpain *et al.*, 2004) . Stem cell niche consists basically of ECM, growth factors and proteins and is essential for controlling cell proliferation, differentiation and apoptosis. Thus, the study of the receptors involved in cell adherence is very important to understand the interactions between MSCs and the environment, mainly when synthetic materials, such as electrospun nanofibers, are used as scaffolds. Our results showed the ability of PLGA nanofibers to supply sites for integrin-B1 receptor binding. Integrin-mediated cell adhesion is of substantial importance as they link ECM with cytoskeleton and signal transduction cascade to regulate cell shape, differentiation, adhesion, migration and proliferation in many systems (Schwartz e Assoian, 2001; Lathia *et al.*, 2009). It is described that hematopoietic stem cells can interact with their microenvironment via integrins  $\alpha 9\beta 1$

(Schreiber *et al.*, 2009) and that integrin- $\beta$ 1 is of marked importance for the integrity of embryonic neocortical stem cell niche (Loulier *et al.*, 2009). Recent studies have shown that integrin- $\beta$ 1 is involved in limiting neuronal damage and functional impairment following ischemic stroke (Lathia *et al.*, 2009). In neuronal stem cells, integrin- $\beta$ 1 regulates proliferation, survival, and migration out of the niche (Leone *et al.*, 2005).

The characterization of the signaling network involving MSCs and synthetic material is of significant relevance for the understanding of cell destiny in tissue engineering procedures. To our knowledge, this is the first demonstration of the participation of integrin- $\beta$ 1 in MSC adherence on PLGA nanofiber scaffolds produced by electrospinning. Within this context, further studies are needed in order to understand the implications of such interaction in the activation of cell signaling cascades as well as the possibilities involving the modulation of this interaction when the use of PLGA nanofiber scaffolds and MSCs is desirable.

## **5 – Conclusion**

The present study shows that MSC adhesion in PLGA nanofibers is mediated by integrin- $\beta$ 1 receptors, which allows for actin filament polymerization and cell spreading. Additionally, the ability of MSCs to undergo chondrogenic differentiation followed by the production of self-ECM when cultivated on PLGA nanofiber scaffolds has also been shown. These results add to the understanding of MSC behavior on biodegradable and biocompatible PLGA nanofibers scaffolds, which can be used as carriers in treatments involving tissue transplantation thereby contributing to the progress of new approaches for human cartilage replacement therapies.

## **6 – Acknowledgments**

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES/Probral (Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior/Programa Brasil-Alemanha).



## 7 – References

1. Vasita R., Katti D.S., *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. Int J Nanomedicine, 2006. **1**(1): p. 15-30.
2. Liao S., et al., *Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration*. Biomedical Materials, 2006. **1**: p. 45-53.
3. Chung C., Burdick J.A., *Engineering cartilage tissue*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **60**: p. 243-262.
4. Mano J.F., et al., *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends*. Journal of The Royal Society Interface, 2007. **4**(17): p. 999-1030.
5. Greiner A., Wendorff J.H., *Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(30): p. 5670-5703.
6. Pham W., Sharma U., and Mikos A.G., *Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review*. Tissue Engineering, 2006. **12**(5): p. 1197-1211.
7. Kim T.G., Park T.G., *Biomimicking Extracellular Matrix: Cell Adhesive RGD Peptide Modified Electrospun Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Nanofiber Mesh*. Tissue Engineering, 2006. **12**(2): p. 221-233.
8. Boudriot U., et al., *Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering - A Brief Overview*. Artificial Organs, 2006. **30**(10): p. 785-792.
9. Meirelles L.d.S., Chagastelles P.C., and Nardi N.B., *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(11): p. 2204-2213.
10. Zeidan-Chulia F., Noda M., *Opening" the mesenchymal stem cell tool box*. European Journal of Dentistry, 2009. **3**(3): p. 240-249.

11. Uematsu K., et al., *Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold*. *Biomaterials*, 2005. **26**(20): p. 4273-4279.
12. Wen F., et al., *Development of poly (lactic-co-glycolic acid)-collagen scaffolds for tissue engineering*. *Materials Science and Engineering: C*, 2007. **27**(2): p. 285-292.
13. Xin X., Hussain M., and Mao J.J., *Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold*. *Biomaterials*, 2007. **28**(2): p. 316-325.
14. Wise J.K., et al., *Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Oriented Nanofibrous Scaffolds: Engineering the Superficial Zone of Articular Cartilage*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **15**(4): p. 913-921.
15. Heydarkhan-Hagvall S., et al., *Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering*. *Biomaterials*, 2008. **29**: p. 2907-2914.
16. Daley W.P., Peters S.B., and Larsen M., *Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine*. *Journal of Cell Science*, 2008. **121**: p. 255-264.
17. Hynes R.O., *Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines*. 2002. **110**(6): p. 673-687.
18. Schwartz M.A., Assoian R.K., *Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(14): p. 2553-2560.
19. Lathia J.D., et al., *Pivotal role for beta-1 integrin in neurovascular remodelling after ischemic stroke*. *Experimental Neurology*, 2009. **In Press, Corrected Proof**.
20. Alonso L., Fuchs E., *Stem cells of the skin epithelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(Suppl 1): p. 11830-11835.
21. Leone D.P., et al., *Regulation of neural progenitor proliferation and survival by {beta}1 integrins*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(12): p. 2589-2599.

22. Zeng J., et al., *Poly(vinyl alcohol) Nanofibers by Electrospinning as a Protein Delivery System and the Retardation of Enzyme Release by Additional Polymer Coatings*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**: p. 1484-1488.
23. Xinhua Zong S.R., Kwang-Sok Kim, Dufei Fang, Benjamin S. Hsiao and Benjamin Chu, *Structure and Morphology Changes during in Vitro Degradation of Electrospun Poly(flycolide-co-lactide) Nanofiber Membrane*. *Biomacromolecules*, 2003. **4**(2): p. 416-423.
24. Blondheim NR, et al., *Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition*. *Stem Cells Dev*, 2006. **15**: p. 141–164.
25. Li W.-J., Jiang Y.J., and Tuan R.S., *Chondrocyte Phenotype in Engineered Fibrous Matrix Is Regulated by Fiber Size*. *Tissue Engineering*, 2006. **12**(7): p. 1775-1785.
26. Pelttari K., Wixmerten A., and Martin I., *Do we really need cartilage tissue engineering?* *Swiss Med Wkly*, 2009. **139**(41-42): p. 602-609.
27. Howe A., et al., *Integrin signaling and cell growth control*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998. **10**: p. 220-231.
28. Brakebusch C., Fassler R., *The integrin-actin connection, an eternal love affair*. *EMBO J*, 2003. **22**(10): p. 2324-2333.
29. Delon I., Brown N.H., *Integrins and the actin cytoskeleton*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007. **19**(1): p. 43-50.
30. Parsons J.T., *Focal adhesion kinase: the first ten years*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(8): p. 1409-1416.
31. Blanpain C., et al., *Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche*. *Cell*, 2004. **118**(5): p. 635-648.
32. Spradling A., Drummond-Barbosa D., and Kai T., *Stem cells find their niche*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 98-104.
33. Schreiber T.D., et al., *The integrin  $\alpha 9\beta 1$  on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation*. *Haematologica*, 2009: p. haematol.006072.

34. Loulier K., et al., *Î²1 Integrin Maintains Integrity of the Embryonic Neocortical Stem Cell Niche*. PLoS Biol, 2009. 7(8): p. e1000176.

## FIGURE CAPTIONS

**Fig. 1** Differentiation of MSCs at 7th passage. MSCs were cultured in adipogenic, chondrogenic or osteogenic medium for up to 15, 20 and 18 days respectively. Lipid vacuoles were stained red by oil red O (**b** and **e**). Secreted glycosaminoglycan was stained green by Alcian blue (**c** and **f**). Calcium deposited in the extracellular matrix was stained red by alizarin red S (**d** and **g**). Scale bar: 100  $\mu$ m

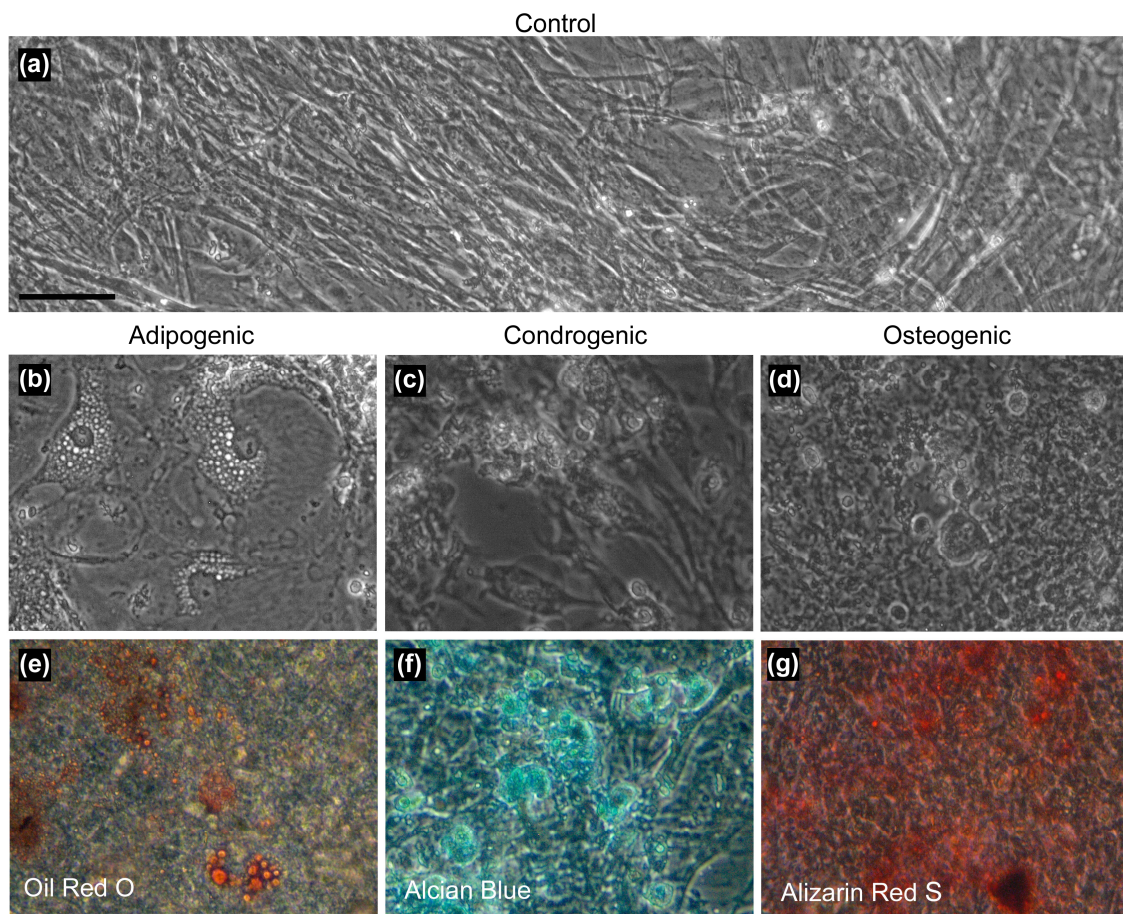
**Fig. 2** Expression of surface markers by MSCs at 8th passage. Cell expression of Sca-1, CD44, CD49d and CD49e. Negative expression of CD45, a hematopoietic marker

**Fig. 3** SEM micrographs of nanofibers produced by electrospinning using PLGA solution at a concentration of 12 wt% (w/v) (**a**). Frequency of diameter distribution. Mean diameter 413  $\pm$ 141 nm (**b**)

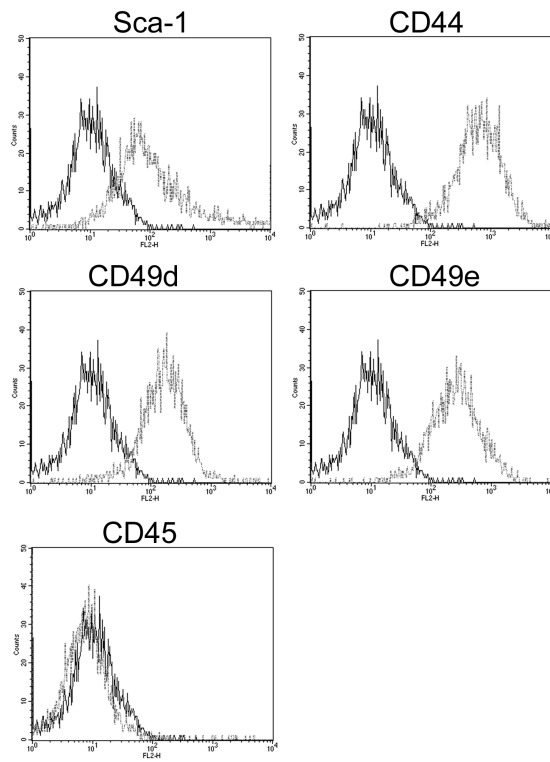
**Fig. 4** Chondrogenic differentiation of MSCs at 7th passage on electrospun nanofiber scaffold. (**a**) Representative light microscope image of glycosaminoglycans evidenced by Alcian blue-staining. (**b**) Representative SEM micrograph showing differentiated cells within the fibers

**Fig. 5** Representative confocal microscopy image of MSCs at 7th passage cultured on electrospun nanofiber scaffold. Immunofluorescent staining reveals morphological changes in cells after 24 h of cultivation on scaffolds with blocked integrin- $\beta$ 1 receptor. (**a**) Cells in the control group were widespread on the scaffold and showed an organized pattern of polymerized actin filaments. (**b**) Cells in the presence of integrin- $\beta$ 1 antibody showed morphological changes and diffuse distribution of actin, concentrated on the periphery. Arrows indicate stress fibers. “\*” indicate fiber bundles. Head arrows indicate no stress fiber actin organization. Cell nuclei were labeled with DAPI and actin cytoskeleton with rhodamine-phalloidin. Scale bar: 50  $\mu$ m

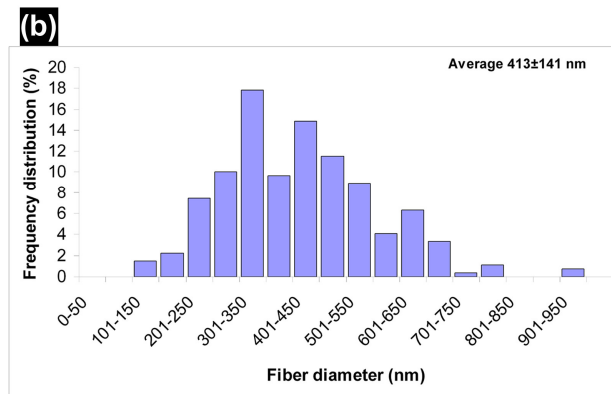
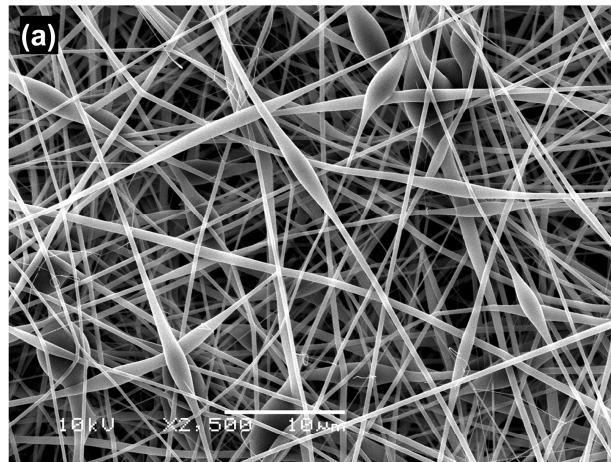
**FIGURES**



**Fig. 1**

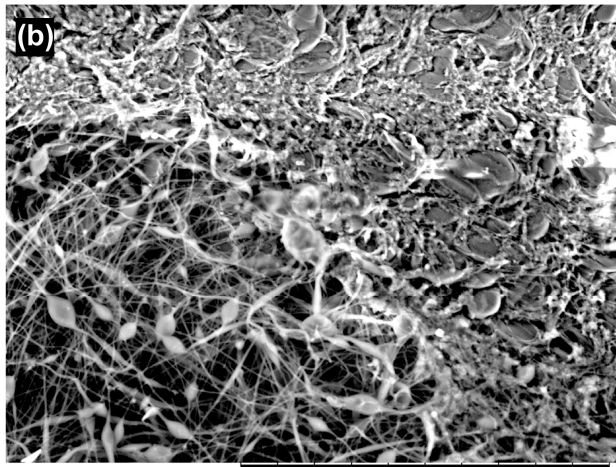
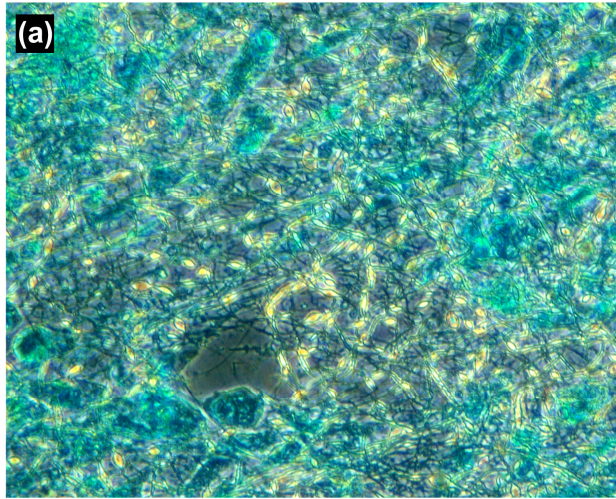


**Fig. 2**



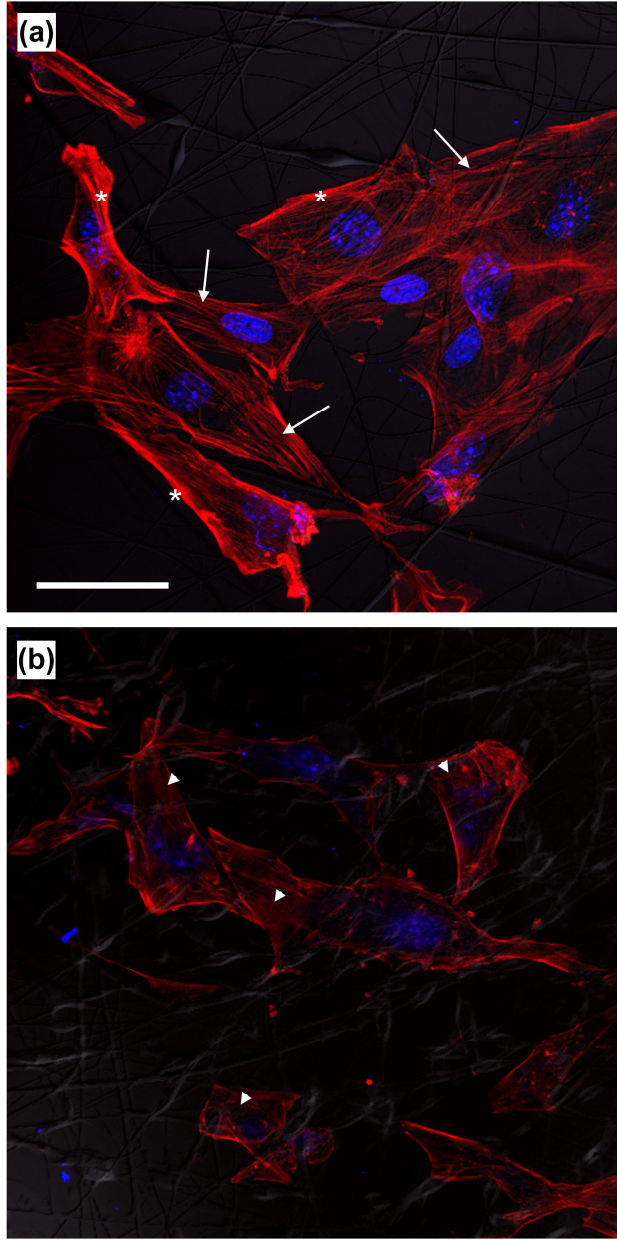
**Fig. 3**





TM-1000\_1776 2009/06/18 21:07 L D2,0 x1,0k 100 um

**Fig. 4**



**Fig. 5**

### **3.2 – Capítulo II**

Os resultados apresentados a seguir, sob forma de artigo científico fazem parte dos objetivos listados anteriormente. O artigo será submetido um periódico especializado internacional, provavelmente a revista *Biotechnology Progress*.

*To be submitted to Biotechnology Progress*

**Viability of mesenchymal stem cells during *electrospinning***

**Zanatta G <sup>a,b,1</sup>, Steffens D <sup>a,1</sup>; Baghirolli D I <sup>a</sup>; Fernandes R <sup>c</sup>; Netto C A <sup>b</sup>,  
and Pranke P <sup>a\*</sup>**

**Running Head:**

**Electrospinning and stem cell viability**

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

<sup>b</sup> Cerebral Ischemia Laboratory, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

<sup>c</sup> Nossa Senhora da Conceição Hospital, Grupo Hospitalar Conceição.

<sup>1</sup> Zanatta G and Steffens D have contributed equally to the manuscript

**CORRESPONDING AUTHOR**

\*Autor correspondente: Pranke P

E-mail: [patriciapranke@ufrgs.br](mailto:patriciapranke@ufrgs.br)

Faculdade de Farmácia

Laboratório de Hematologia e Células-tronco

Av. Ipiranga, 2752, 304

90610-000 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brasil

Phone: +55 51 3308-5275 / 3308-5257

## **Abstract**

Tissue engineering is a technique by which a live tissue can be re-constructed and one of its main goals is to associate cells with biomaterials. Electrospinning is a technique that allows the production of nanofibers and is commonly used to develop fibrous scaffolds to be used in tissue engineering. In this study we tested a different approach for cellular incorporation into fibrous scaffolds. Mesenchymal stem cells (MSCs) were extracted from the wall of the umbilical cord, and mononuclear cells (MNCs) from the umbilical cord blood. Cells were resuspended in a solution of poly(vinyl alcohol) (PVA) 10% and subjected to electrospinning during 30 minutes under a voltage of 21kV. Cell viability was assessed before and after the procedure by exclusion of dead cells by Trypan Blue staining. Fiber diameter was observed by scanning electronic microscopy and the presence of cells within the scaffolds were analyzed by confocal laser scanning microscopy. After electrospinning the MSCs viability reduced to 19.6%, and the MNCs viability to 8.38%. The loss of viability can be due to the high viscosity of the polymeric solution which reduced the access to nutrients associated to the electric and mechanical stress during electrospinning. These results suggest that the incorporation of cells during fiber formation by electrospinning is a viable process that needs more investigation in order to find ways to protect cell from damage.

**Keywords:** nanotechnology, tissue engineering, electrospinning, stem cells

## 1 – Introduction

Tissue engineering is a growing field with potential to regenerate damaged tissue.<sup>1-3</sup> One of the biggest goals in this area is to associate cells with biomaterials to provide a scaffold on which they can anchor, migrate and proliferate three-dimensionally. This approach has a great potential for many tissues including: vasculature,<sup>4,5</sup> bone,<sup>6,7</sup> neural,<sup>8,9</sup> cartilage,<sup>10,11</sup> and tendon/ligament.<sup>12,13</sup>

Among the various types of materials used in tissue engineering, scaffolds based on nanofibers produced by electrospinning are widely studied. This technique is used to produce nanofiber by the use of electrostatic forces with fiber diameter in a range of nano to micrometers. Many parameters are involved in the failures of the final fiber, such as the applied voltage, tip-target distance, feed rate, concentration and viscosity of the polymeric solution and temperature, among others.<sup>14,16</sup>

Scaffolds produced by this method are porous and have a large surface-to-volume ratio. The mechanical properties of the scaffolds provide enough space for the cell accommodation and an easy passage for the nutrient intake and metabolic waste exchange.<sup>14</sup> It is believed that fibers formed by electrospinning have the ability to mimic, in a limited way, the natural extracellular matrix (ECM) structure, as regards variability of fiber diameters, topology and texture, and mechanical properties.<sup>15</sup>

MNCs, including lymphocytes, monocytes and progenitor cells can be obtained from umbilical cord blood (UCB), as well as a limited number of stem cells, such as hematopoietic stem cells and, in lower quantity, MSCs.<sup>17-19</sup> Another source of MSCs is the umbilical cord itself, which provides more cells than umbilical cord blood.<sup>20</sup> Due to MSCs ability to self-renew and high proliferative capacity they are candidates to

cellular therapies to regenerate tissues and organs affected by several diseases, such as neurologic, rheumatic, cardiac and autoimmune diseases, among others.

Although electrospun fibers of various polymers and different cell types have been brought into contact numerous times, the fibers are typically electrospun first and cells are seeded onto the material in a further step.<sup>21-23</sup> Due to the limitations in cell mobility or scaffolds properties, as low porosity, sometimes the three-dimensional structure can be not completely fulfilled by biological material, compromising the structure and function of tissue formation.

In the present study, taking in consideration the process of co-electrospinning, the attention was focused in the cell incorporation into scaffolds during nanofiber formation. The polymer of choice was poly(vinyl alcohol) (PVA), due to its low toxicity and high solubility in aqueous medium. The viability of MSCs e MNCs after the electrospinning was analyzed.

## **2 – Materials and methods**

### *2.1. MSCs and MNCs isolation and characterization*

Three samples of UCB and three samples of UC were obtained from the Obstetric Center of Hospital Moinhos de Vento after the signature of informed consent by the mothers in accordance with the ethical committee of the hospital (by CEP/IEP-AH MV 2006/42).

UCB samples were obtained by puncture of the umbilical vein of umbilical cords of neonates in normal or cesarean delivery and collected into bags containing CDPA-1 as anticoagulant.

UC samples were collected by cutting a fraction of umbilical cord near the placenta according to procedure described by Secco and colleagues (2008)<sup>25</sup> and kept in growth medium (DMEM-low glucose, 10% fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin and 1.12 $\mu$ L/mL gentamycin).

Both samples, UCB and UC, were transported to the laboratory and processed within 24 hours post-delivery.

#### *2.1.1. Separation of mononuclear cell fraction from UCB*

UCB samples were diluted in a ratio of 1:1 with PBS and MNCs were isolated by density gradient centrifugation at 1200 g for 20 minutes at room temperature using Ficoll-Paque (Sigma). Following, MNCs were washed twice with PBS and counted in Neubauer chamber using 4% Trypan blue solution for cell death exclusion.

#### *2.1.2. CTMs separation from UC*

UC samples were incubated in 0.1% of collagenase type I (Sigma) at 37°C for 15-20 minutes. Following, detached cells were harvested after massage of the UC with the aid of tweezers and centrifuged at 300g for 10 minutes. Samples were resuspended in medium, seeded in 25-cm<sup>2</sup> flasks and kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Non adherent cells were removed after 24 hours of incubation; culture medium was replaced every 3-4 days.

#### *2.1.3. MSCs culture and characterization*

Cultivation of adherent cells was performed according to the standard procedure of our laboratory. Passages were performed when cell reached 80-90% of confluence in a split rate of 1:3. Cells used in the experiments were cultured until the forth passage.



Flow cytometry was performed by a FACScalibur instrument (Becton Dickinson) equipped with an argon-ion laser tuned at 488 nm and data were analyzed using the software CELLQuest (Becton Dickinson). Cells were incubated with antibodies during 30 minutes at 4°C, and then were washed with PBS. 7-Aminoactinomycin D (7AAD) (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA) at a final concentration of 1 µg/mL was used to identify dead cells. Specific antibodies for the human antigens were bought from PharMingen/Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) as follow: CD29/PE, CD34/PE, CD44/FITC, CD45/FITC, CD90/FITC, CD117/PE, CD133/PE, CD146/FITC, CD184/PE, HLA-DR/FITC and Stro-1/FITC, as well as isotype control antibodies: mouse IgG1,k/FITC and IgG1,k/PE. The gating strategy was used with the aim of acquiring 10.000 events corresponding to a live mononuclear cell cluster. In this gate the analysis was performed with a view to observing double marking among this population using a combination of the other antibodies.

Mesenchymal differentiation capacity was performed as previously described by Meirelles and Nardi,<sup>26</sup> with some modifications.

Adipogenic differentiation: MSCs were cultured in ISCOVE'S medium supplemented with 20% human plasma, 10<sup>-7</sup> mol/L dexamethasone, 2.5 µg/mL insulin, 5 µM indomethacin, 5 µM rosiglitazone and 10 µM/mL sodium heparin. Medium changes were carried out every 3 days. Adipogenic potential was determined, after 21 days, by the formation of intracellular lipid droplets evidenced by oil red O staining solution (Sigma-Aldrich Ltd.).

Osteogenic differentiation: Cells were cultured in medium supplemented with 15 mM Hepes, 10% SFB, 10 mmol/L β-glycerophosphate, 1x10<sup>-8</sup> mol/L dexamethasone, and 5 µg/mL ascorbic acid 2-phosphate. The medium was changed every three days. To

evaluate the potential of osteogenic differentiation, cultures were washed with PBS and calcium deposition was assessed by alizarin red S staining.

Chondrogenic differentiation: Medium consisted of BDM supplemented with 15 mM Hepes, 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 10 ng/mL TGF-B1 and 50 nM ascorbic acid-2 phosphate (AsAP) solution. The medium was changed every 3-4 days, and cells were fixed on day 21 with 4% paraformaldehyde. Chondrogenesis was evidenced by depositing a matrix rich in glycosaminoglycan sulfate stained by Alcian blue.

## *2.2 Preparation of PVA solution*

Aqueous solution at a concentration of 10% (w/w) was prepared by mixing PVA of high molecular weight (HMW) in Milli-Q water and stirred at room temperature for 16 hours to obtain a homogeneous solution.

## *2.3. Preparation of PVA-cells suspension*

MSCs were trypsinized, washed and quantified using Neubauer chamber. Both, MSCs and MNCs were resuspended in culture medium and an aliquot of 30  $\mu\text{L}$  containing  $1 \times 10^6$  cells was mixed with the PVA solution at a volume ratio of 1:12. Cells from the control group were resuspended in growth medium at the same rate.

## *2.4. Electrospinning*

Electrospinning were performed as described previously.<sup>3</sup> The PVA-cells suspension was stored in a 1 mL syringe with a hypodermic needle with an inner diameter of 0.45 mm. Suspension was fed at a rate of 0.34 mL/h through a syringe

placed 15 cm from the collector plate and the applied voltage used was 21 kV. Room temperature was 25°C and 35-50% of relative humidity. Nanofibers were collected on round glass coverslips placed on the ground collector.

Fiber production was performed during 30 minutes and all experiments made in triplicate.

### *2.5. Characterization of nanofibers*

Morphology and diameter of the electrospun nanofibers were studied using a scanning electron microscopy (SEM) (JEOL - JSM 6060 - JEOL Ltd.). Samples collected on glass coverslips were mounted on aluminum stub and sputter-coated with 15 nm of carbon for analysis. Three SEM micrographs of distinct areas from every sample were used for analysis. Diameter analysis was performed by measuring the diameter of 30 fibers in every micrograph. The software used for the measurements and statistical analysis was ImageJ 1.38x.

### *2.6. Cell viability analysis*

The experiments for assessing cellular viability were carried out in triplicate and consisted of three groups: (1) control: cells in growth medium at room temperature; (2) PVA: cells in a PVA solution at room temperature, and; (3) electrospinning: cells electrospun with PVA solution. Cell viability from all groups was evaluated at the beginning of the experiments and also after electrospinning procedure.

Scaffolds produced from *electrospinning* group were transferred to a flask containing culture medium in order to dissolve the fibers. Medium was added to flasks of the control groups (cells in growth medium and cells in PVA solution) at the same proportion.

All samples were centrifuged at 300 g for 5 minutes at room temperature and the supernatant removed. Cells were re suspended in a medium and counted for viability analysis using Trypan Blue 4% (Gibco), at a rate of 1:1 (v:v) for dead cell exclusion.

### *2.7. Cellular incorporation into scaffolds during electrospinning*

The ability of electrospinning to deliver cell among the fibers was accessed by cell nuclei staining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0.2 µg/mL for 20 min. Following, suspension was washed with PBS and centrifuged at 300g during 10 minutes. Fibers were collected in glass coverslips during 30 minutes and images were obtained by confocal laser scanning microscopy (Olympus FV-1000).

### *2.8. Statistical analysis*

Cell viability among the groups was analyzed using analysis of variance (ANOVA). Statistical analyses among groups from different cell types were performed using two-way ANOVA. All analyses were followed by post-hoc Tukey's test for multiple comparisons, when necessary. Data were expressed as mean ± standard deviation (SD) and the level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . All statistical analysis was performed using the Statistica® software package running on a compatible personal computer.

## **3 – Results and discussion**

### *3.1. Electrospinning of poly(vinyl alcohol)*

Many parameters are involved in electrospinning procedure and influence the final fiber formation. In this work, the first step was to establish the cells-PVA

suspension at a rate of 1:12 (v:v) (cells:PVA) and then adjust the others parameters to obtain spindle-like free fibers. This proportion was based on Aalst and colleagues (2008) that used electrospinning to produce cellular incorporation into nanofibers.<sup>2</sup> During this step, different polymer concentration and voltage were accessed (data non shown). Fiber production were stabilized by the use of PVA 10% solution and applied voltage of 21 kV. When the cells-PVA proportion was reduced, fibers were not formed and only drops were observed in the collector plate. This phenomena probably is due to the reduction of viscosity that promotes the reduction in polymer chains interaction. When higher proportion was used, fibers were continuously produced, but as the concentration of cells decreased, making the analyses of viability hard to implement.

Electrospun scaffolds produced were smooth in appearance and free of bead fibers, with an average diameter of  $244 \pm 49$  nm (figure 1).

(figure 1)

### *3.2. MSCs characterization*

The flow cytometry analysis showed that 91.97% of mononuclear cell clusters were alive. Among those, only 0.24% were positive to CD45 antigen; 99.92% were positive to CD29; 99.13% were positive to CD44; 99.97% were positive to CD90; 6.79% were positive to CD146; 2.03% were positive to CD117; 0.38% were positive to CD133; 0.14% were positive to HLA-DR and also to Stro-1. Cells were negative to CD34 and CXCR-4 antigens. These results are in accordance with mesenchymal stem cells phenotype, mainly because of the presence of the classical markers of MSCs, such as CD29, CD44 and CD90 and absence of hematopoietic antigens, such as CD34 (main

hematopoietic stem cell marker), CD45 (main leukocyte marker), CD117, CD133, CD184 (or CXCR-4) and HLA-DR (all hematopoietic markers). The antigens CD146 (or Mel CAM) and Stro-1 are generally present in a small subset of MSCs.<sup>27</sup> Only a small part of MSCs were positive for CD146 and these cells were negative for Stro-1. Results are shown in figure 2.

(figure 2)

The differentiation assays demonstrate the ability of these populations to undergo adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation, a marker of CTMs (figure 3).

(figure 3)

In the present work, the influence of the electrospinning process over MSCs and MNCs viability were analyzed. Cells from cord blood were used because they are easy to obtain and don't need long term process of cultivation or purification. These advantages make them interesting for clinic procedures as MSC provoke less rejection in transplants. On the other hand, it is known that there are a small number of stem cells among the fraction of MNCs (CD34+CD38- frequency: 0.05-0.08 %),<sup>28</sup> which are the cells responsible for the regeneration of damaged areas in tissue engineering. For this reason, although they demand long periods for isolation and cultivation, the use of a homogeneous population of MSCs seems to be more appropriated to the success of tissue engineering procedures. For the experiments, MSCs were collected form the wall

of the UC instead of the UCB as the number of these cells in UC is greater than in UCB.

20,29

### *3.3. Effects of PVA and electrospinning over cell viability*

In order to separate the toxic effect of PVA from the cellular damage caused by the electrospinning process, cell viability was analyzed in three different groups: (1) control: cells in growth medium; (2) PVA: cells in a PVA solution, and; (3) electrospinning: cells electrospun with PVA solution. All groups were analyzed after 30 minutes, as this was the period necessary to produce fibers using the total volume of the solution.

Cells were mixed with PVA 10% at a density of  $1 \times 10^6 / 360 \mu\text{L}$  and this exposure resulted in significant effects on viability of both types of cells. MNCs viability was reduced to 99% in the control group in growth medium while cells in PVA solution showed 80% of viability. The experiments with MSCs showed viability of 88% for cell in growth medium and a reduction to 64% of viability for cells from the PVA group (figure 4).

Beside the statistic difference between the group of cells in culture medium and the group of cells in PVA solution, analyzes showed no differences related to the type of cell used. This finds suggest that PVA solution had deleterious effect upon cells and the decrease in cell viability could be caused by the lack of nutrients, since the cells were not in contact with the proliferative medium, due to the viscosity of the solution.

When cells that underwent electrospinning were analyzed, results showed a significant reduction of viability in both type of cells (MSCs and MNCs). Experiments using MSCs showed 19.6% of viability for MSCs and 8.38% for MNCs after electrospinning (figure 4).

(figure 4)

In a recent study, Aalst and colleagues (2008) assessed the viability of fibroblasts (30-65%) and stem cells (22%) after electrospinning process and showed that surviving cells maintained their viability and proliferation. They suggested that the low viability after electrospinning could be explained by the high viscosity of the PVA solution that changes the shearing effect on cells as they pass through the equipment.<sup>2</sup> Another study involving bacteria and viruses (bacteriophages) performed by Salalha and colleagues (2007) showed individual changes in the viability after the electrospinning process, according to the microorganisms: Escherichia coli, 19%; Staphylococcus albus, 100%; T4 bacteriophage, 1%; T7 bacteriophage, 2%; and  $\lambda$  bacteriophage, 6%.<sup>30</sup>

Analyzes of the data suggest that changes in the viscosity of the polymeric solutions could improve the access of the cells to the nutrients. The lack of nutrients associated with the shearing stress during the electrospinning is responsible for the decrease in cell viability.

#### *3.4. Cellular incorporation into scaffolds during electrospinning*

Analyzes of MSCs and MNCs distribution on the nanofiber scaffolds were performed by confocal laser scanning microscopy. Images suggest that cells were not encapsulated by the fibers, probably because of the small fiber diameter, but they were placed among the fibers, suggesting that they were three-dimensionally distributed in the scaffolds (figure 5).



#### **4 – Conclusions**

In the present study the viability of MSCs and MNCs mixed in a solution of PVA10% and used to produce fibers by electrospinning was assessed. Besides the reduction in cell viability, this study demonstrated the potential use of this approach to deliver cells during the fiber formation, allowing a better cell distribution within the three-dimensional structure of the scaffolds. PVA is a candidate to polymer vehicle during co-electrospinning procedures because it is easily soluble in culture medium, promoting the fast releasing of the cells. Nevertheless, in this study, PVA was not efficient to protect cells against the damages caused by the electrospinning. These results suggest that the cellular incorporation into scaffolds during fiber formation by electrospinning is a viable process but needs more investigations in order to find ways to protect cell from damages.

## References

- 1- Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009;17:561-577.
- 2- van Aalst JA, Reed CR, Han L, et al. Cellular incorporation into electrospun nanofibers: retained viability, proliferation, and function in fibroblasts. *Ann Plast Surg.* 2008;60:577-583.
- 3- Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte. Chem. Int. Ed.* 2007;46:5670-5703.
- 4- Stitzel J, Liu J, Lee SJ, et al. Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials.* 2006;27(7):1088-1094.
- 5- Teebken OE, Puschmann C, Rohde B, et al. Human iliac vein replacement with a tissue-engineered graft. *Vasa.* 2009;38:60-65.
- 6- Thomas V, Jose MV, Chowdhury S, Sullivan JF, Dean DR, Vohra YK. Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17:969-984.
- 7- Sui G, Yang X, Mei F, et al. Poly-L-lactic acid / hidroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res Part A.* 2007;82:445-454.
- 8- Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, et al. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and collagen/poly-epsilon-caprolactone blend. *Biomaterials.* 2007;28:3012-3025.
- 9- Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/microscale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potencial in neural tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26:2603-2610.

- 10- Zheng L, Sun J, Chen X, et al. In vivo cartilage with collagen hydrogel and allogeneous chondrocytes after diffusion chamber implantation in immunocompetent host. *Tissue Engineering Part A*. March 26, 2009. *In press*
- 11- Zhao G, Yin S, Liu G, et al. *In vitro* engineering of fibrocartilage using CDMP1 induced dermal fibroblasts and polyglycolide. *Biomaterials*. 2009;30:3241-3250.
- 12- Sahoo S, Ouyang H, Goh JC, Tay TE, Toh SL. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Engineering*. 2006;12:91-99.
- 13- Lee CH, Shin JH, Cho IH, et al. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affected the ECM production of ACL fibroblast. *Biomaterials*. 2005;26:1261-1270.
- 14- Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, Parameswaran S, Ramkumar SS. Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004;96:557-569.
- 15- Hohmann MM, Shin M, Rutledge G, Brenner MP. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids*, 2001;13: 2201-2220.
- 16- Hromadka M, Collins JB, Reed C, et al. Nanofiber applications for burn care. *Journal of Burn Care Research*. 2008;29:695-703.
- 17- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from HLA identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321:1174-1189.
- 18- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103:1669-1675.
- 19- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004;22:625-34.

- 20- Secco M, Zucconi E, Vieira NM, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Neuromuscul Disord*. 2008; 18:17–18.
- 21- Li X, Xie J, Yuan X, Xia Y. Coating electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *Langmuir*. 2008;24:14145-14150.
- 22- Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, et al. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24:278-287.
- 23- Boudriot U, Goetz B, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH. Role of electrospun nanofibers in stem cells technologies and tissue engineering. *Macromolecular Symposia*. 2005;225:9-16
- 24- Xie J, Wang CH. Electrospray in the dripping mode for cell microencapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007;312:247-255.
- 25- Secco M, Zucconi E, Vieira NM, et al. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells*. 2008;26:146-150.
- 26- Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Brit J Haematol*. 2003; 123:702–711.
- 27- Yang X, Zhang W, van den Dolder J, et al. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells *in vitro*. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1:128–135.
- 28- Pranke P, Failace RR, Allebrandt WF, Steibel G, Schimidt F, Nardi NB. Hematologic and Immunophenotypic Characterization of Human Umbilical Cord Blood. *Acta Haematol*. 2001;105:71-76.

- 29- Panepucci RA, Siufi JLC, Silva Jr WA, et al. Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2004; 22:1263–1278
- 30- Salalha W, Kuhn J, Dror Y, Zussman E. Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibers. *Nanotechnology*. 2007;17:4675-4681.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** (A) SEM micrographs of nanofibers produced by electrospinning using PVA solution at a concentration of 10 wt% (w/v). (B) Frequency of diameter distribution. Mean diameter  $244 \pm 49$  nm.

**Figure 2.** Expression of surface markers by MSCs. Gating strategy: (A) identification of mononuclear cells (R1). (B) Identification of mononuclear cells alive by exclusion of 7AAD positive cells (R2). (C) Identification of negative CD45 cells. Identification of populations by double marking strategy: (D) CD44/FITC and CD29/PE; (E) CD90/FITC and CD29/PE; (F) CD146/FITC and CD34/PE; (G) Stro-1/FITC and CD117/PE; (H) HLA-DR/FITC and CD133/PE; (I) CD44/FITC and CD184/PE.

**Figure 3.** Differentiation of MSCs at 4th passage. (A) Negative control group. (B) Adipogenic differentiation evidenced by lipid vacuoles stained red by oil red O. (C) Osteogenic differentiation evidenced by calcium deposition stained red by alizarin red S. (D) Chondrogenic differentiation evidenced by the presence of glycosaminoglycans stained green by Alcian blue. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Figure 4.** Cell viability after 30 minutes of procedure. Control: cells in culture medium; PVA: cells in PVA 10% solution; and electrospinning: cells mixed with PVA 10% solution subject to electrospinning process. The experiments were performed in triplicate and reported as mean cellular viability  $\pm$  SD (standard deviation). \* Statistical difference from control group; # statistical difference from PVA group. ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ .

**Figure 5.** Images of confocal laser scanning microscopy showing cell among the fibers.  
(A) Mononuclear cells; (B) Mesenquimal stem cells. Arrows indicate cell nuclei. Nuclei stained with DAPI solution.

## FIGURES

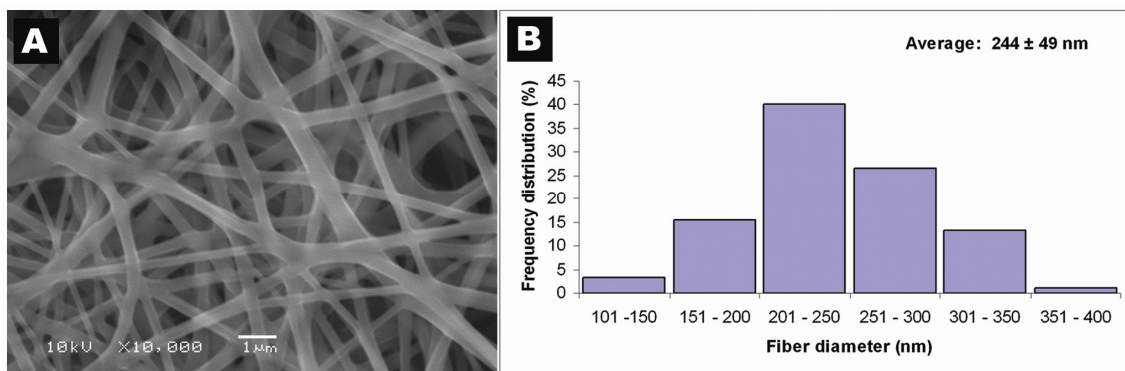


Figure 1



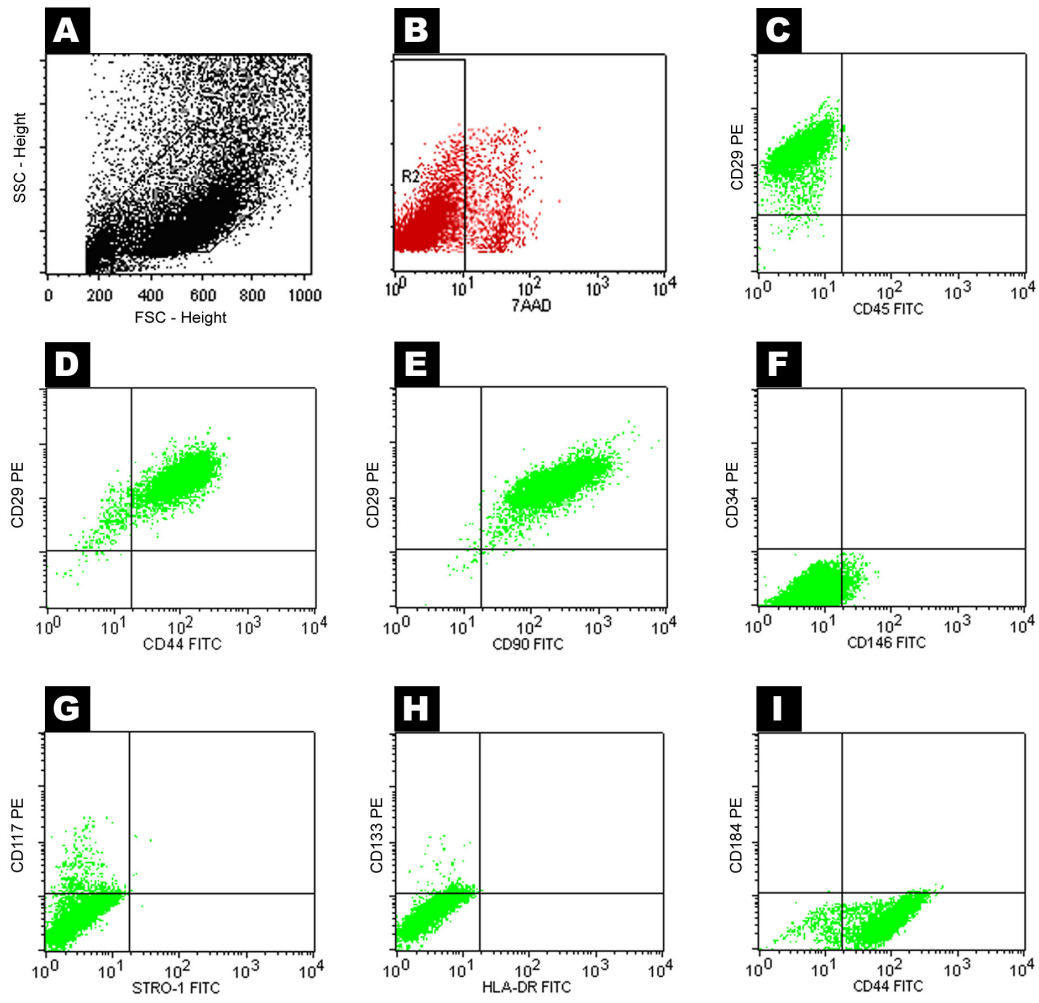


Figure 2

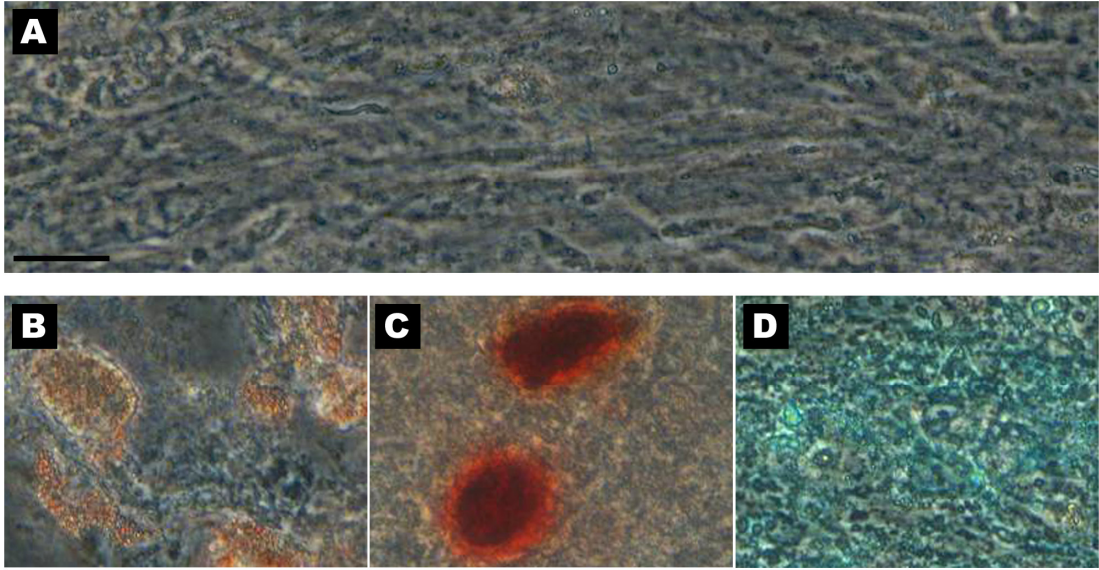


Figure 3

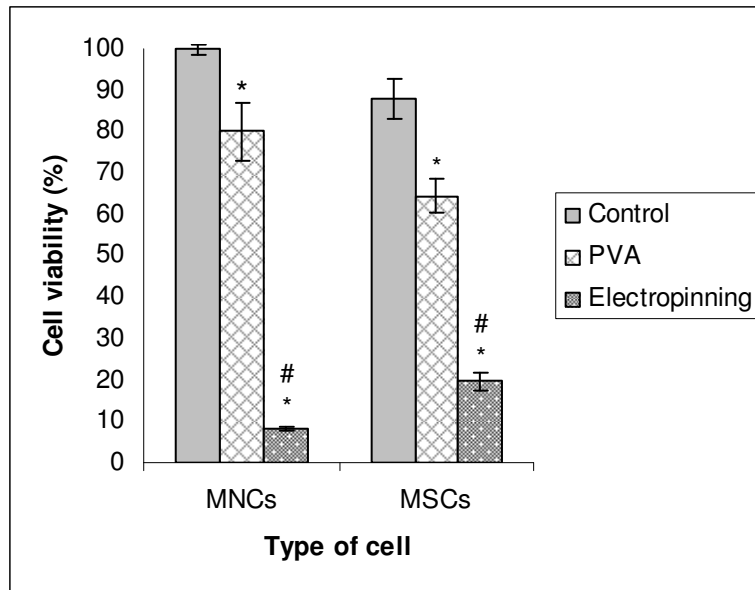


Figure 4

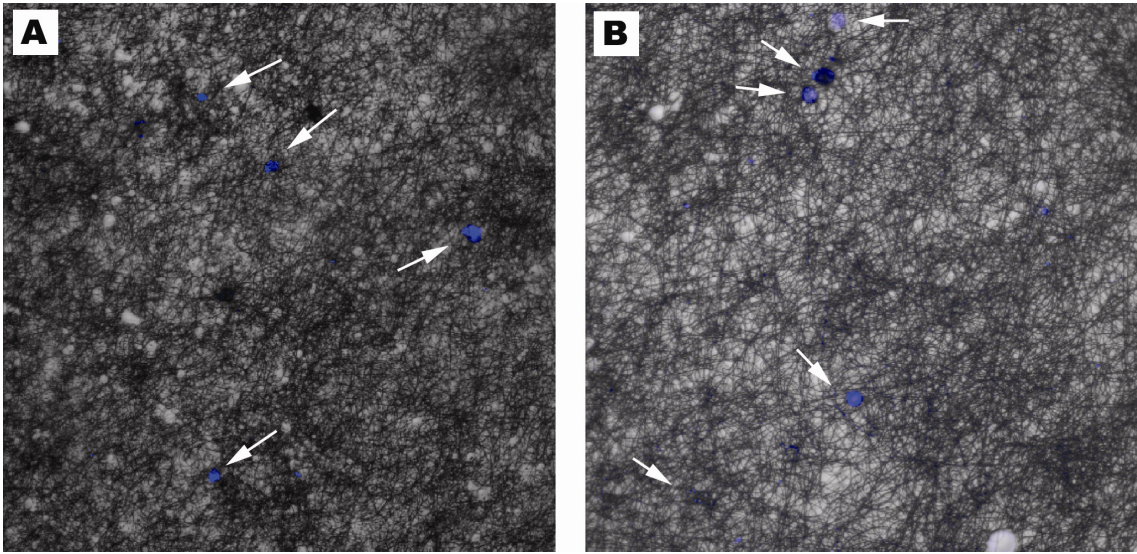


Figure 5

## **Parte III**

## 4 - Discussão

Um dos grandes objetivos das pesquisas na área de engenharia de tecidos tem sido a busca de substitutos sintéticos adequados para o crescimento, proliferação e diferenciação celular. No presente trabalho exploramos algumas potencialidades da aplicação da técnica de *electrospinning* para a construção de matrizes sintéticas cuja finalidade é a utilização em procedimentos de regeneração tecidual.

### 4.1 – Obtenção e caracterização de matrizes de nanofibras produzidas por *electrospinning*

Através da técnica de *electrospinning* é possível a construção de matrizes compostas por fibras de tamanho nanométrico a milimétrico e, dispostas de forma alinhada ou enovelada. Devido ao reduzido diâmetro médio das fibras bem como a possibilidade de controlar algumas características do produto final, tal como a resistência mecânica da matriz entre outros, acredita-se ser possível a produção de matrizes sintéticas que mimetizem, pelo menos parcialmente, a MEC natural de um determinado tecido.

O PLGA é um copolímero biodegradável e biocompatível cuja utilização já é bem estabelecida no meio biomédico. Com a hidrólise do PLGA ocorre a liberação de seus componentes, PLA e PGA, os quais podem ser absorvidos pelas células e metabolizados, como esquematizado na figura 2. Um aspecto importante na utilização de PLGA é que a alteração nas proporções PLA-PGA leva a variação no tempo de degradação (Zong *et al.*, 2003), uma característica desejável na engenharia de tecidos, pois o ajuste da velocidade de hidrólise desta matriz sintética é fundamental para a adequada estruturação do tecido a ser regenerado ou substituído.

Inicialmente foi utilizado uma solução de PLGA (75:25) na concentração 20% (m/v) para a produção de matrizes para o cultivo de CTM murinas. A solução foi

alimentada no sistema a uma velocidade de 0,34 mL/h e foi necessária a aplicação de uma voltagem de 28 kV para a formação de fibras uniformes e contínuas de diâmetro aproximado de 1,0  $\mu\text{m}$ . Uma vez que ajustes posteriores na voltagem e distância entre a placa coletora e o capilar não foram capazes de reduzir significativamente o diâmetro das fibras, o experimento foi repetido utilizando uma solução na concentração final de 12% (m/v) o que permitiu utilizar uma voltagem menor, 21 kV. Como resultado, foram obtidas nanofibras com diâmetro médio de  $413 \pm 141$  nm e contendo algumas deformações conhecidas como *beads* (página 40, figura 3).

O segundo tipo de nanofibra utilizado neste trabalho teve por objetivo o servir com veículo para o transporte de células e foi produzido com uma solução de PVA 10% (m/m). A esta solução polimérica foi adicionado uma fração contendo células e o resultado foi uma suspensão utilizada para a produção de nanofibras durante 30 minutos. Inicialmente, uma suspensão foi feita na proporção de 1:12 (v:v) (células em suspensão:solução de PVA 10%) (Van Aalst *et al.*, 2008), enquanto que os demais parâmetros da técnica foram ajustados a partir desta escolha. Desta forma, as fibras produzidas apresentaram um diâmetro médio de  $244 \pm 49$  nm, com superfície uniforme e sem a presença de alterações em sua morfologia (página 64, figura 1).

#### **4.2 – Obtenção e caracterização de CTM**

Outro elemento fundamental ao estudo realizado foi a obtenção e caracterização das células-tronco utilizadas. As CTM são células adultas que apresentam grande plasticidade e, além de seu uso não apresentar questões éticas quando comparadas a células-tronco embrionárias. Outra importante propriedade destas células é a baixa imunogenicidade, com conseqüente redução nas chances de ocorrência de problemas

imunológicos relacionados à rejeição em transplantes (Zeidan-Chulia e Noda, 2009), o que as tornam ferramentas potenciais para as terapias de regeneração tecidual.

Na primeira etapa deste trabalho, as CTM isoladas de rim de camundongo C57BL/6 foram analisadas quanto a sua capacidade de diferenciação condrogênica quando cultivadas em matrizes de nanofibras. Também, foi caracterizada a dependência de receptores integrina- $\beta$ 1 no processo de adesão em matrizes sintéticas de PLGA produzidas por *electrospinning*.

O isolamento e a caracterização das CTMs murinas foi realizado conforme protocolos disponíveis na literatura (Meirelles *et al.*, 2006). Após a digestão do tecido renal estas células foram isoladas, por aderência, e atingiram confluência a cada intervalo de três dias após a passagem com taxa de repique de 1:3, permitindo assim sua fácil expansão. Ao atingirem a sétima passagem as células foram avaliadas imunofenotipicamente e submetidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo demonstrou a expressão de Sca-1 (antígeno-1 de célula-tronco), CD44 (receptor hialurônico), CD49d (integrina  $\alpha$ 4), CD49e (integrina  $\alpha$ 5) e ausência de CD45 (marcador hematopoético) (página 39, figura 2). A não expressão de CD45 por esta população indicou a ausência de contaminação hematopoética, a qual já foi descrita em passagens iniciais de culturas de CTMs isoladas de medula óssea e baço (Meirelles *et al.*, 2006).

A diferenciação condrogênica durou aproximadamente 15 dias e foi evidenciada pela coloração de glicosaminoglicanos secretados utilizando-se *Alcian blue*. A diferenciação osteogênica foi evidenciada após 18 dias pela produção de matriz mineralizada rica em cálcio, visualizada com coloração por *alizarin red S*. As culturas submetidas a diferenciação adipogênica demonstraram, após 20 dias, mudanças



fenotípicas com o aparecimento de gotículas de lipídios intracelularmente, evidenciadas por oil red O (página 38, figura 1).

Na segunda etapa deste trabalho, CTM humanas foram isoladas de parede de cordão umbilical e tiveram sua viabilidade comparada a CMNs isoladas de sangue de cordão umbilical quando submetidas ao processo de *electrospinning* misturadas a uma solução de PVA 10%. A vantagem da utilização de CMN é o fato de serem facilmente obtidas após a coleta do sangue e rapidamente preparadas, simplificando seu uso clínico. Contudo, o número de células-tronco presentes na fração de CMN é pequeno, da ordem de  $0.54 \pm 0.24\%$  (Pranke *et al.*, 2001). A obtenção de CTM de cordão umbilical representa uma fonte de fácil acesso e de obtenção não invasiva, além de ser de utilização vantajosa para a clínica por apresentar menor rejeição em transplantes. Por sua vez, o uso de uma população homogênea de CTM é interessante, porém não pode ser prontamente disponibilizada após a coleta, necessitando um período de cultivo para sua purificação e expansão.

A análise por citometria de fluxo demonstrou que 91,97% das células mononucleares estavam vivas. Entre estas, somente 0,24% foram positivas para o antígeno CD45; 99,92% positivas para CD29; 99,13% positivas para CD44; 99,97% positivas para CD90; 6,79 % positivas para CD146; 2.03% positivas para CD117; 0,38% positivas para CD133; 0.14% positivas para HLA-DR e também para Stro-1. Não foram observados resultados positivos para a presença de antígenos CD34 e CXCR-4 (página 65, figura 2). Esses resultados demonstraram claramente que as culturas correspondiam a CTM pela presença de marcadores clássicos, tais como, CD29, CD44 e CD90 e ausência dos marcadores hematopoéticos CD34 (marcador de célula-tronco hematopoética), CD45 (marcador leucocitário), CD117, CD133, CD184 (ou CXCR-4) e HLA-DR (todos marcadores hematopoéticos). Os antígenos CD146 (ou

Mel CAM) e Stro-1 estão geralmente presentes em uma pequena proporção na população de CTM (Xuechao *et al.*, 2007). Somente uma pequena fração das CTM foram positivas para CD146 e estas células foram negativas para Stro-1. Os ensaios de plasticidade foram positivos para a diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, confirmando assim a identidade destas células (página 66, figura 3).

#### **4.3 - Diferenciação condrogênica em matrizes de nanofibras de PLGA**

Devido a sua complexa estrutura e distribuição celular, as lesões de cartilagem possuem uma limitada capacidade de regeneração espontânea, representando um grande desafio para a clínica. Neste contexto, protocolos de indução condrogênica de células-tronco em matrizes fibrosas podem apresentar potencial para ultrapassar tal dificuldade (Chung e Burdick, 2007; Pelttari *et al.*, 2009; Zeidan-Chulia e Noda, 2009).

Buscando-se avaliar a capacidade das matrizes de nanofibras de PLGA de suportar o crescimento e a diferenciação de CTM murinas, as células foram cultivadas sobre estas matrizes e submetidas a diferenciação condrogênica. Como esperado, após duas semanas de indução, as culturas foram coradas com *Alcian blue*, o qual evidencia a diferenciação pela presença de glicosaminoglicanos. Em seguida, as amostras foram observadas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV), o qual possibilitou a visualização das células espalhadas sobre a matriz (página 41, figura 4). Esses resultados demonstram que estas células reconheceram nas matrizes de nanofibras de PLGA um ambiente propício para a sua diferenciação e produção de sua própria MEC em reposição ao material polimérico em degradação, garantindo a estruturação do tecido em formação. Resultados semelhantes foram obtidos por Li e colaboradores (2006), ao cultivarem condrócitos em dois tipos de matrizes de poli(L-lactato), uma composta por microfibras e outra por nanofibras. Em seu trabalho, eles demonstraram que a morfologia celular pode ser regulada pelo diâmetro da fibra e que as nanofibras

foram mais eficientes na manutenção do fenótipo dos condrócitos, bem como na indução da produção de colágeno (Li *et al.*, 2006).

No presente estudo, as CTM semeadas em matrizes de PLGA mostraram um bom espalhamento sobre a superfície nas primeiras 24 h. Após a substituição do meio de cultivo por meio de indução contendo TGF- $\beta$ 1, foram observadas mudanças morfológicas, seguidas pelo aumento da secreção de MEC, conforme comprovado pela coloração com *Alcian blue*. Este comportamento é desejável e demonstrou que: 1) o sistema fornece suporte mecânico para aderência celular e espalhamento, além de prover as condições necessárias para a diferenciação condrogênica e produção de MEC natural; 2) este sistema tem potencial para ser utilizado como material carreador em procedimentos de transplante, garantindo a firmeza da adesão das CTM na matriz durante o transporte e implante na área danificada.

#### **4.4 - A adesão de CTM em matrizes de nanofibras de PLGA é dependente de receptores integrina - $\beta$ 1**

Tendo em vista que o processo de adesão é vital para a sobrevivência celular e consiste na primeira etapa a ser vencida ao utilizar-se substratos sintéticos como suporte mecânico, a possível influência das integrinas- $\beta$ 1 na adesão de CTM em matrizes de nanofibras de PLGA produzidas por *electrospinning* foi investigada. Após a semeadura, CTM foram responsivas à matriz e exibiram uma morfologia achatada dentro das primeiras 24 h. Análises de microscopia confocal mostraram que as células apresentavam morfologia semelhante a de fibroblastos, com a presença de fibras de estresse de actina distribuídas ao longo do citoplasma. As fibras de estresse são estruturas contráteis do citoesqueleto, feixes de tensão de actomiosina que permitem a percepção e a produção de força e permitem a células a regulação da rigidez durante o

processo de adesão (Howe *et al.*, 1998). A ligação dos receptores integrinas em sítios extracelulares leva a formação de estruturas complexas formadas por várias proteínas que promovem a ligação da MEC com a actina citoplasmática. Dessa forma, a tensão produzida pelos componentes do citoesqueleto, *in vivo*, interfere na dinâmica do remodelamento da MEC (Daley *et al.*, 2008), sendo que a associação entre a cauda da integrin- $\beta$ 1 e o citoesqueleto de actina ocorre pela associação de proteínas tais como talina,  $\alpha$ -actinina e vinculina (Brakebusch e Fassler, 2003). Esses complexos de adesão são dinâmicos e, normalmente formados por estruturas heterogêneas, variando em tamanho e organização.

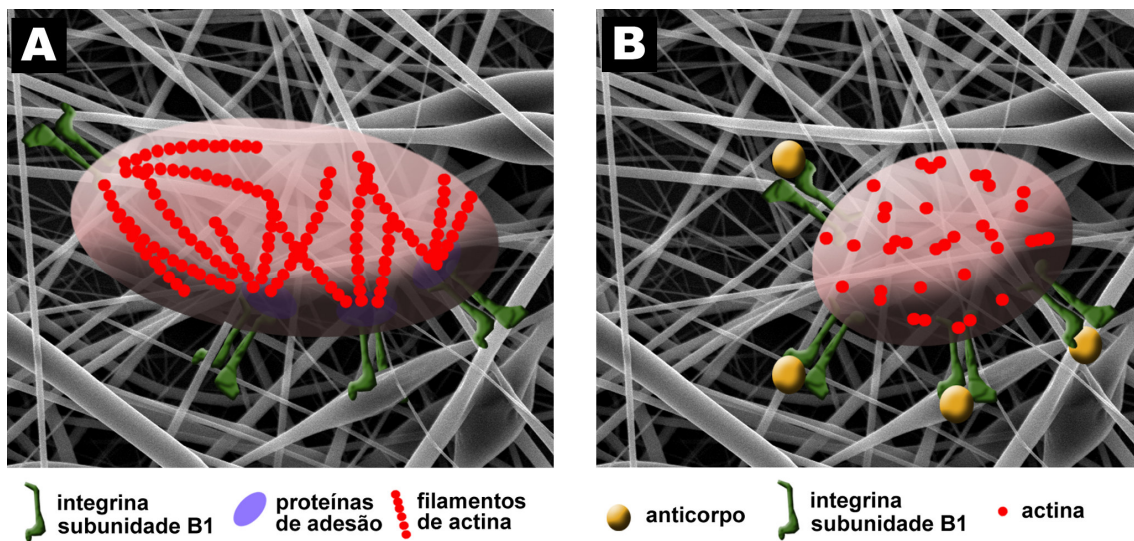
Em células em movimento, observa-se a presença de sítios de adesão nos processos conhecidos como filopódios e lamelipódios e são conhecidos como “complexos focais”, enquanto que os processos de adesão que circundam o corpo celular e estão localizados nas porções terminais das fibras de estresse de actina são conhecidas como “adesão focal”. A transdução de sinal através dos complexos focais e adesão focal têm sido relacionadas a uma gama de processos celulares importantes, incluindo sinais induzidos por fatores mitogênicos, sobrevivência celular e locomoção (Parsons, 2003; Delon e Brown, 2007).

Por outro lado, quando as CTM que tiveram as subunidades  $\beta$ 1 da integrinas bloqueadas com anticorpos específicos foram semeadas em matrizes de nanofibras de PLGA, observou-se alta prevalência de filamentos difusos de actina no córtex destas células. Além do mais, as células mostraram-se menos responsivas e foi observada uma redução de aproximadamente 20% na habilidade de adesão nestas matrizes. As análises realizadas em microscópio confocal mostraram alteração na morfologia, com organização difusa dos filamentos de actina e perda das fibras de estresse (página 42, figura 5).

Compreender os mecanismos envolvidos na adesão celular é de alta relevância para o entendimento das interações entre as CTM e o microambiente, principalmente quando materiais sintéticos são utilizados como substitutos da MEC. É sabido que estímulos externos ativam as CTM fazendo com que saiam de seu nicho e se desloquem para áreas lesadas contribuindo em processos regenerativos. Por isto, a compreensão do microambiente que envolve as CTM tem sido alvo de muitos estudos que buscam compreender seus mecanismos reguladores (Spradling *et al.*, 2001; Blanpain *et al.*, 2004). O nicho de células-tronco consiste basicamente de MEC, fatores de crescimento e proteínas e é essencial no controle da proliferação, diferenciação e apoptose, além de ser responsável por reter a célula localmente ou permitir que ela migre para outra região. As células-tronco hematopoéticas interagem com o microambiente via receptores integrina  $\alpha9\beta1$  (Schreiber *et al.*, 2009) e a integrina- $\beta1$  exerce um papel fundamental na manutenção da integridade do nicho de células-tronco embrionárias neocorticais (Loulier *et al.*, 2009). Estudos de outros autores demonstram que, em células neuronais, a integrina- $\beta1$  regula a proliferação, a sobrevivência, e a migração para fora do nicho (Leone *et al.*, 2005), além de estarem envolvidos na redução dos danos neuronais após a lesão isquêmica (Lathia *et al.*, 2009).

Desta forma, a qualidade e a segurança no uso de materiais, tais como nanofibras de PLGA, em processos de engenharia tecidual depende do entendimento dos mecanismos envolvidos na relação célula-biomaterial, tal como a interação com receptores e moléculas de adesão. Os dados apresentados neste trabalho demonstraram a habilidade das nanofibras de PLGA em suprir sítios de ligação para a os receptores integrina- $\beta1$ , sugerindo a capacidade deste biomaterial em mimetizar, pelo menos parcialmente, a estrutura natural e função da ECM responsável pela ativação dos mecanismos de resposta a este receptor (figura 5). A adesão mediada por integrina foi

capaz de promover a interligação entre a MEC sintética e o citoesqueleto, evidenciado pela formação de fibras de estresse de actina. Tal interação tem sido descrita como relevante não somente na modulação do citoesqueleto, mas também na ativação de cascatas de transdução de sinais que regulam importantes processos celulares (Schwartz e Assoian, 2001; Lathia *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Desenho esquemático da adesão mediada por receptores de integrinas em matrizes de nanofibras de PLGA. (A) Formação de fibras de estresse de actina resultantes do processo de adesão. (B) Células tratadas com anticorpo para os receptores de integrina apresentaram actina difusa no citoplasma, redução na taxa de adesão e alterações morfológicas em relação ao grupo controle. Proteínas de adesão focal corresponde ao grupo de proteínas envolvidas na ligação de microfilamentos de actina e receptor integrina, como vinculina, paxilina,  $\alpha$ -actinina e talina.

#### **4.5 – Viabilidade celular após a incorporação em fibras de PVA através do processo de *electrospinning***

No presente trabalho, foi avaliada a viabilidade de células submetidas ao processo de *electrospinning* visando o seu uso em associação com o *co-electrospinning*, na tentativa de garantir a distribuição tridimensional das células em matrizes fibrosas. O polímero utilizado foi PVA 10%, o qual é rapidamente solubilizado em meio aquoso, agindo como um veículo de transporte celular e permitindo a rápida liberação das células quando posto em contato com o meio de cultura.

Buscando separar o possível efeito tóxico do PVA dos danos celulares causados pela técnica de *electrospinning*, foram formados três grupos experimentais: 1) controle: células em meio de cultura; 2) PVA: células em solução de PVA, e; 3) *Electrospinning*: células processadas com o PVA para a formação de fibras. Todas as amostras foram mantidas a temperatura ambiente e foram analisadas após 30 minutos, uma vez que este era o tempo necessário para o processamento do volume total da solução durante o *electrospinning*.

Tanto as CTM, quanto as CMNs foram misturadas a solução de PVA 10% na densidade de  $1,0 \times 10^6 / 360 \mu\text{L}$ . As CMN apresentaram viabilidade de 99% no grupo controle em meio de cultura enquanto as células em contato com o PVA tiveram sua viabilidade reduzida para 80%. Os experimentos com CTM demonstraram viabilidade de 88% no grupo controle em meio de cultura enquanto as células em contato com o PVA tiveram sua viabilidade reduzida para 64% (página 67, figura 4).

A redução na viabilidade demonstra que a exposição ao PVA resultou em efeitos deletérios sobre ambos tipos celulares. Esse efeito pode estar relacionado à alta viscosidade da solução de PVA, a qual reduziu o acesso das células aos nutrientes do meio.

A análise, por microscopia confocal, da disposição das CMNs e CTM nas matrizes de nanofibras não permitiu averiguar se as células estavam encapsuladas pelas fibras ou somente dispostas independentes no meio do emaranhado de nanofibras que compunham a matriz. Acredita-se que o reduzido diâmetro das fibras não permitiu o encapsulamento. Contudo, observou-se a distribuição tridimensional das células, confirmando a incorporação na matriz de nanofibras (página 68, figura 5).

Em um estudo realizado por Aalst e colaboradores (2008) a viabilidade de fibroblastos (25%) e células-tronco derivadas de tecido adiposo (22%) foi avaliada após terem sido processadas por *electrospinning* e observou-se que as células sobreviventes mantiveram sua capacidade de proliferação e funcionalidades (Van Aalst *et al.*, 2008). No estudo, os autores sugerem que a redução na viabilidade deveu-se a mudanças no efeito de cisalhamento induzida pela alta viscosidade da solução de PVA, enquanto as células passavam pelo aparelho de *electrospinning*. Em um trabalho envolvendo bactérias e vírus (bacteriófagos), Salalha e colaboradores (2006) também encontraram variações individuais na viabilidade de cada microorganismo após o *electrospinning*, sendo: *Escherichia coli*, 19%; *Staphylococcus albus*, 100%; *T4 bacteriophage*, 1%; *T7 bacteriophage*, 2%, e;  $\lambda$  *bacteriophage*, 6% (Salalha *et al.*, 2006). Esses dados deixam claro que além da influência direta da solução de PVA, fatores biológicos inerentes a cada tipo celular produzem diferentes respostas quando submetidos a um processo envolvendo atrito mecânico e alta voltagem como o *electrospinning*.

#### **4.5 - Considerações finais**

As nanofibras produzidas através de *electrospinning* podem ter seu diâmetro e morfologia, entre outras características, controlados durante a técnica, o que permite a produção de matrizes com a capacidade de mimetizarem, ao menos parcialmente, a



MEC natural. Outra possibilidade dessa técnica é a funcionalização das fibras pela adição de componentes moleculares a sua superfície, o que resulta em alterações na interação com as células. Além de organismos, fatores solúveis também podem ser encapsulados no interior das fibras, permitindo a sua liberação ao longo do tempo, desta forma garantindo a estimulação contínua das células que estão envolvendo tais fibras e os tecidos adjacentes.

Na primeira etapa deste trabalho caracterizamos a relevância de receptores integrina- $\beta$ 1 na adesão de CTMs em matrizes de nanofibras de PLGA. Nossos resultados sugerem que estas matrizes além de fornecerem um suporte adequado para a adesão celular, são capazes de fornecer sítios de ligação para receptores integrinas, os quais são responsáveis pela ativação de inúmeras vias metabólicas fundamentais ao desenvolvimento celular.

Na segunda etapa dessa dissertação, exploramos um importante aspecto, muitas vezes limitante na engenharia tecidual, que é a distribuição celular em estruturas tridimensionais. Uma potencial estratégia para melhorar a distribuição de células entre as matrizes de nanofibras é o seu carregamento em nanofibras de PVA que são depositadas na placa coletora juntamente a outro tipo de fibra, produzido simultaneamente durante a formação da matriz, através do processo de *co-electrospinning*. Focamos nosso estudo na viabilidade celular quando estas foram submetidas ao processo de *electrospinning*, e demonstramos que apesar de ter sido possível a produção de nanofibras a partir de uma suspensão células-PVA a viabilidade celular caiu drasticamente, comprometendo o processo. A redução da viabilidade se deu provavelmente pela redução do acesso ao meio nutritivo e pelas mudanças na propriedade de cisalhamento provocados pela viscosidade da solução polimérica e pelos efeitos combinados do estresse mecânico e elétrico provocados pelo *electrospinning*. Os resultados aqui apresentados colaboram

com o aperfeiçoamento da técnica para aplicação na engenharia de tecidos, visto a sua importância para a medicina regenerativa.

## 5 - Conclusões

No presente trabalho foram analisados aspectos do uso de matrizes de nanofibras produzidas por *electrospinning* no cultivo de CTM.

Inicialmente, a capacidade das matrizes de PLGA de dar suporte a diferenciação condrogênica de CTM foi observada pela presença de glicosaminoglicanos secretados após duas semanas de indução em meio contendo TGF- $\beta$ 1.

Quando o processo de adesão foi analisado, constatou-se a relevância dos receptores de integrina-  $\beta$ 1 na interconexão entre a matriz de nanofibras de PLGA e o citoesqueleto, sugerindo a habilidade deste material em fornecer sítios de adesão e/ou grupamentos químicos capazes de interagir com as integrinas e ativar uma resposta celular.

Também, na busca de metodologias para melhorar a distribuição celular em matrizes tridimensionais, observou-se a influência do processo de *electrospinning* sobre a viabilidade de CTM e CMNs quando as mesmas foram misturadas a uma solução de PVA e nanofibras foram produzidas.

Estes dados corroboram com a literatura demonstrando que a aplicação de biomateriais produzidos por *electrospinning* juntamente com células-tronco apresentam grande potencial na engenharia de tecidos.

## 6 - Bibliografia

Alonso, L. e E. Fuchs. Stem cells of the skin epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.Suppl 1, September 30, 2003, p.11830-11835. 2003.

Barbanti, S. H., C. A. C. Zavaglia e E. A. R. Duek. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, v.15, p.13-21. 2005.

Blanpain, C., W. E. Lowry, A. Geoghegan, L. Polak e E. Fuchs. Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell*, v.118, n.5, p.635-648. 2004.

Blondheim Nr, Ys Levy, T Ben-Zur, A Burshtein, T Cherlow, I Kan, R Barzilai, M Bahat-Stromza, Y Barhum, S Bulvik, E. M. And e D. Offen. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev*, v.15, 2006, p.141-164. 2006.

Boudriot, U., R. Dersch, A. Greiner e J. H. Wendorff. Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering - A Brief Overview. *Artificial Organs*, v.30, n.10, p.785-792. 2006.

Brakebusch, C. e R. Fassler. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J*, v.22, n.10, p.2324-2333. 2003.

Chung, C. e J. A. Burdick. Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.60, 5 October 2007, p.243-262. 2007.

Dalby, M. J., S. Childs, M. O. Riehle, H. J. H. Johnstone, S. Affrossman e A. S. G. Curtis. Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials*, v.24, n.6, p.927-935. 2003.

Dalby, M. J., S. J. Yarwood, M. O. Riehle, H. J. H. Johnstone, S. Affrossman e A. S. G. Curtis. Increasing Fibroblast Response to Materials Using Nanotopography: Morphological and Genetic Measurements of Cell Response to 13-nm-High Polymer Demixed Islands. *Experimental Cell Research*, v.276, n.1, p.1-9. 2002.

Daley, W. P., S. B. Peters e M. Larsen. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science*, v.121, 21 November 2007, p.255-264. 2008.

Delon, I. e N. H. Brown. Integrins and the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, v.19, n.1, p.43-50. 2007.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop e E. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, v.8, n.4, p.315-317. 2006.

- Donald, G. P. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.85, n.S38, p.7-12. 2002.
- Dror, Y., J. Kuhn, R. Avrahami e E. Zussman. Encapsulation of Enzymes in Biodegradable Tubular Structures. *Macromolecules*, v.41, n.12, p.4187-4192. 2008.
- Frenot, A. e I. S. Chronakis. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr. Opin. Colloid.*, v.8, p.64-75. 2003.
- Greiner, A. e J. H. Wendorff. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*, v.46, n.30, p.5670-5703. 2007.
- Heydarkhan-Hagvall, S., K. Schenke-Layland, A. P. Dhanasopon, F. Rofail, H. Smith, B. M. Wu, R. Shemin, R. E. Beygui e W. R. Maclellan. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials*, v.29, 9 April 2008, p.2907-2914. 2008.
- Howe, A., A. E. Aplin, S. K. Alahari e R. Juliano. Integrin signaling and cell growth control. *Current Opinion in Cell Biology*, v.10, p.220-231. 1998.
- Huang, Z. M., Y. Z. Zhang, M. Kotaky e R. S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their application in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.*, v.63, p.2223. 2003.
- Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. v.110, n.6, p.673-687. 2002.
- Kim, T. G. e T. G. Park. Biomimicking Extracellular Matrix: Cell Adhesive RGD Paptide Modified Electrospun Poly(D,L-lactic-co-clycolic acid) Nanofiber Mesh. *Tissue Engineering*, v.12, n.2, p.221-233. 2006.
- Langer, R. e J. P. Vacanti. Tissue engineering. *Science*, v.260, n.5110, May 14, 1993, p.920-926. 1993.
- Lathia, J. D., S. Chigurupati, J. Thundyil, P. K. Selvaraj, M. R. Mughal, T. M. Woodruff, S. L. Chan, V. T. Karamyan, M. P. Mattson e T. V. Arumugam. Pivotal role for beta-1 integrin in neurovascular remodelling after ischemic stroke. *Experimental Neurology*, v.In Press, Corrected Proof. 2009.
- Lee, J. S., K. H. Choi, H. D. Ghim, S. S. Kim, D. H. Chun, H. Y. Kim e W. S. Lyoo. Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, v.93, n.4, p.1638-1646. 2004.
- Leone, D. P., J. B. Relvas, L. S. Campos, S. Hemmi, C. Brakebusch, R. Fassler, C. Ffrench-Constant e U. Suter. Regulation of neural progenitor proliferation and survival by {beta}1 integrins. *J Cell Sci*, v.118, n.12, June 15, 2005, p.2589-2599. 2005.

- Li, W.-J., Y. J. Jiang e R. S. Tuan. Chondrocyte Phenotype in Engineered Fibrous Matrix Is Regulated by Fiber Size. *Tissue Engineering*, v.12, n.7, p.1775-1785. 2006.
- Liao, S., B. Li, Z. Ma, H. Wei, C. Chan e S. Ramakrishna. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomedical Materials*, v.1, 28 July 2006, p.45-53. 2006.
- Loulier, K., J. D. Lathia, V. Marthiens, J. Relucio, M. R. Mughal, S.-C. Tang, T. Coksaygan, P. E. Hall, S. Chigurupati, B. Patton, H. Colognato, M. S. Rao, M. P. Mattson, T. F. Haydar e C. Ffrench-Constant.  $\beta$ 1 Integrin Maintains Integrity of the Embryonic Neocortical Stem Cell Niche. *PLoS Biol*, v.7, n.8, p.e1000176. 2009.
- Mano, J. F., G. A. Silva, H. S. Azevedo, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, S. S. Silva, L. F. Boesel, J. M. Oliveira, T. C. Santos, A. P. Marques, N. M. Neves e R. L. Reis. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of The Royal Society Interface*, v.4, n.17, December 22, 2007, p.999-1030. 2007.
- Meirelles, L. D. S., P. C. Chagastelles e N. B. Nardi. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, v.119, n.11, June 1, 2006, p.2204-2213. 2006.
- Meirelles, L. D. S. e N. B. Nardi. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *British Journal of Haematology*, v.123, n.4, p.702-711. 2003.
- Modino, S. A. e P. T. Sharpe. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol*, v.50, n.2, Feb, p.255-8. 2005.
- Parsons, J. T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, v.116, n.8, April 15, 2003, p.1409-1416. 2003.
- Pelttari, K., A. Wixmerten e I. Martin. Do we really need cartilage tissue engineering? *Suiss Med Wkly*, v.139, n.41-42, p.602-609. 2009.
- Pham, W., U. Sharma e A. G. Mikos. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Enginnering Applications: A Review. *Tissue Engineering*, v.12, n.5, p.1197-1211. 2006.
- Pranke, P., R. R. Failace, W. F. Allebrandt, G. Steibel, F. Schmidt e N. Nardi. Hematologic and Immunophenotypic Characterization of Human Umbilical Cord Blood. *Acta Haematologica*, v.105, n.2, p.71-76. 2001.
- Preston, S. L., M. R. Alison, S. J. Forbes, N. C. Direkze, R. Poulson e N. A. Wright. The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular Pathology*, v.56, n.2, April 2003, p.86-96. 2003.
- Salalha, W., J. Kuhn, Y. Dror e E. Zussman. Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, v.17, n.18, p.4675. 2006.

Schreiber, T. D., C. Steinl, M. Essl, H. Abele, K. Geiger, C. A. Muller, W. K. Aicher e G. Klein. The integrin  $\alpha_9\beta_1$  on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation. *Haematologica*, October 1, 2009, p.haematol.006072. 2009.

Schwartz, M. A. e R. K. Assoian. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci*, v.114, n.14, July 15, 2001, p.2553-2560. 2001.

Spradling, A., D. Drummond-Barbosa e T. Kai. Stem cells find their niche. *Nature*, v.414, n.6859, p.98-104. 2001.

Subbiah, T. B., T. G.S., R.W., S. Pararneswaran e S. Ramkumar, S. Electrospinning of nanofibers. *J. App. Polym. Sci*, v.96. 2005.

Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, v.280, n.1382, July 28, 1964, p.383-397. 1964.

Uematsu, K., K. Hattori, Y. Ishimoto, J. Yamauchi, T. Habata, Y. Takakura, H. Ohgushi, T. Fukuchi e M. Sato. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*, v.26, n.20, p.4273-4279. 2005.

Van Aalst, J. A., C. R. Reed, L. Han, T. Andrady, M. Hromadka, S. Bernacki, K. Kolappa, J. B. Collins e E. G. Lobo. Cellular Incorporation Into Electrospun Nanofibers: Retained Viability, Proliferation, and Function in Fibroblasts. *Annals of Plastic Surgery*, v.60, n.5, p.577-583 10.1097/SAP.0b013e318168db3e. 2008.

Vasita, R. e D. S. Katti. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, v.1, n.1, p.15-30. 2006.

Walker, M. R., K. K. Patel e T. S. Stappenbeck. The stem cell niche. *The Journal of Pathology*, v.217, n.2, p.169-180. 2009.

Wen, F., S. Chang, Y. C. Toh, S. H. Teoh e H. Yu. Development of poly (lactic-co-glycolic acid)-collagen scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, v.27, n.2, p.285-292. 2007.

Wise, J. K., A. L. Yarin, C. M. Megaridis e M. Cho. Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Oriented Nanofibrous Scaffolds: Engineering the Superficial Zone of Articular Cartilage. *Tissue Engineering Part A*, v.15, n.4, p.913-921. 2009.

Xin, X., M. Hussain e J. J. Mao. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials*, v.28, n.2, January 2007, p.316-325. 2007.

Xuechao, Y., Z. Weibo, D. Juliette Van Den, X. F. Walboomers, B. Zhuan, F. Mingwen e A. J. John. Multilineage potential of STRO-1<sup>+</sup> rat dental pulp cells *in vitro*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v.1, n.2, p.128-135. 2007.

Yim, E. K. F. e K. W. Leong. Significance of synthetic nanostructures in dictating cellular response. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v.1, n.1, p.10-21. 2005.

Zeidan-Chulia, F. e M. Noda. Opening" the mesenchymal stem cell tool box. European Journal of Dentistry, v.3, n.3, p.240-249. 2009.

Zeng, J., A. Aigner, F. Czubyko, T. Kissel, J. H. Wendorff e A. Greiner. Poly(vinyl alcohol) Nanofibers by Electrospinning as a Protein Delivery System and the Retardation of Enzyme Release by Additional Polymer Coatings. Biomacromolecules, v.6, n.3, p.1484-1488. 2005.

Zong, X., S. Ran, K.-S. Kim, D. Fang, B. S. Hsiao e B. Chu. Structure and Morphology Changes during in Vitro Degradation of Electrospun Poly(glycolide-co-lactide) Nanofiber Membrane. Biomacromolecules, v.4, n.2, p.416-423. 2003.