

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ODONTOPEDIATRIA**

**TESE**

**Estudo mecânico e biológico de matrizes poliméricas acrescidas de dexametasona.**

**GERSON ARISOLY XAVIER ACASIGUA**

**Porto Alegre, 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ODONTOPEDIATRIA**

**Linha de Pesquisa**

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

**TESE**

**Estudo mecânico e biológico de matrizes poliméricas acrescidas de dexametasona.**

**GERSON ARISOLY XAVIER ACASIGUA**

**Orientação:**

**Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati**

**Co-orientação:**

**Profa. Dra. Patricia Pranke**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré requisito final para a obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica – Odontopediatria

**Porto Alegre, 2016.**

**CIP - Catalogação na Publicação**

Acasigua, Gerson Arisoly Xavier

Estudo mecânico e biológico de matrizes poliméricas  
acrescidas de dexametasona. / Gerson Arisoly Xavier  
Acasigua. -- 2016.

58 f.

Orientadora: Anna Christina Medeiros Fossati.

Coorientadora: Patricia Helena Lucas Franke.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2016.

1. bioengenharia. 2. células-tronco. 3.  
nanotecnologia. 4. dentes decíduos. I. Fossati, Anna  
Christina Medeiros, orient. II. Franke, Patricia  
Helena Lucas, coorient. III. Título.

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

## **Dedicatória**

À toda minha família pelo apoio e incentivo para a realização do mestrado e doutorado, pelo companheirismo, por todo o amor e por todo o tempo investido em minha educação.

À Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati,

Agradeço pelo tempo dedicado em minha orientação durante a elaboração desta tese, pelo modelo singular de orientadora e por todo crescimento científico e maturidade que me fez adquirir durante as fases de graduação e pós-graduação.

À Profa. Dra. Patricia Pranke,

Pelo crédito dado a mim, pela dedicação e incentivo durante todo o mestrado e doutorado, abrindo muitas portas para meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Jacques Nör,

Pela orientação e ensinamentos que foram fundamentais para meu crescimento científico e pessoal durante o estágio realizado no exterior.

A todos os integrantes do Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia/ UFGRS,

Muito obrigado pela ajuda na elaboração desta tese. Obrigado pelos momentos de descontração e lazer que passamos juntos.

A CAPES,

Por fomentar a minha formação acadêmica.

## Sumário

Lista de Abreviaturas .....	6
Resumo .....	9
Abstract .....	10
1 Antecedentes e Justificativas .....	11
2 Objetivos .....	20
3 Metodologia .....	21
4 Resultados .....	28
5 Discussão .....	31
6 Perspectivas e Considerações Finais .....	37
7 Agradecimentos .....	38
Referências Bibliográficas .....	39
Anexo .....	51
Tabelas .....	53
Figuras .....	54

## Lista de Abreviaturas

PLGA	ácido poli (lático-co-glicólico)
DEX	dexametasona
MSCs	células-tronco mesenquimais
%	por cento
UV	ultra-violeta
$\lambda$	comprimento de onda
MEV	microscopia eletrônica de varredura
DMA	análise mecânica dinâmica
WST-8	Cell Proliferation Assay Kit
LDH	lactato desidrogenase
RT-PCR	Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction
SEM	scanning electron microscope
MEC	matriz extracelular
GCs	glicocorticóides
RG	receptor de glicocorticóides
HSP	proteína de choque térmico
ERGs	elemento responsivo aos glicocorticóides
RNA	ácido ribonucléico
AP-1	proteína ativadora-1
Cbfa1	core-binding factor subunit alpha-1
OPN	osteopontina
OCN	osteocalcina
SCDT	stem cells from deciduous teeth
FO	Faculdade de Odontologia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
SCDT-A	stem cell from deciduous teeth – culture A

SCDT-B	stem cell from decíduos teeth – culture B
UI/mL	unidades internacionais por mililitro
µg/mL	micrograma por mililitro
°C	graus Celsius
mM	milimolar
pH	potencial de hidrogênio
G	constante gravitaciona
mg/L	miligrama por litro
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
kV	quilo volts
mL h <sup>-1</sup>	mililitros por hora
mm	milímetros
cm	centímetros
UR	umidade relativa
x	vezes
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
RPM	rotações por minutos
±	mais menos
DMA	análise dinâmico-mecânica
µL	microlitro
M	molar
PBS	tampão fosfato salina
µg/mL	micrograma por mililitro
µM	micromolar
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar

CSF	fator de célula-tronco
DP	desvio padrão
CTM	célula-tronco mesenquimal
p	valor de p
Fig	figura
°	graus
MEC	matriz extracelular
MW	peso molecular (do inglês <i>molecular weight</i> )
N	número de amostra
ng	nanograma
nM	nanomolar
OPG	osteoprotegerina
SHED	célula-tronco humana de polpa de dente decíduo exfoliado
TGFb1	fator de crescimento transformador beta 1
BMSC	bone marrow stem cells
CTA	células-tronco adultas

## Resumo

Uma variedade de biomateriais são estudados para aplicação na engenharia de tecidos, entre os quais os *scaffolds* de ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), produzidos pela técnica de *electrospinning*. Por meio dessa técnica é possível adicionar diferentes moléculas bioativas durante o processo de produção do biomaterial, tais como a dexametasona (DEX). A DEX é caracterizada por o seu potencial anti-inflamatório e imunossupressor e pela sua capacidade de promover a diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSCs) em linhagem osteogênica. Este estudo teve o objetivo de produzir e caracterizar *scaffolds* de PLGA com diferentes quantidades de DEX (100% puro) e verificar suas propriedades mecânicas, bem como a sua influência sobre MSCs de polpa de dentes decíduos. Sete grupos de *scaffolds* foram produzidos nas seguintes proporções: 1 parte de DEX para 20 partes de PLGA, identificado como 1:20. Seguindo este, 1:10, 1: 4, 1: 2, 3: 4 e 1: 1, partes de DEX:PLGA foram usadas. Assim, os seguintes grupos foram estudados: A: *scaffolds* de PLGA sem DEX (grupo controle); B: 1:20; C: 1:10; D: 1:4; E: 1:2; F: 3:4 e G: 1:1. A presença de DEX nos *scaffolds* e a sua taxa de liberação foi avaliada no decorrer de 21 dias por análise de luz UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). Todos os *scaffolds* foram avaliados quanto às suas características físico-químicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por análise mecânica dinâmica (DMA). A interação dos *scaffolds* com as MSCs foi avaliada durante 21 dias por meio do ensaio de WST-8 e lactato desidrogenase (LDH). O potencial osteogênico dos *scaffolds* com DEX foi avaliada pela expressão de fosfatase alcalina, coloração com Alizarin Red e análise por RT-PCR. A análise por luz UV mostrou que após 21 dias de cultura, todos os grupos liberaram entre 73 a 79 % da DEX total presente nos *scaffolds* presente no início do experimento. As fotomicrografias de MEV mostraram fibras distribuídas de maneira aleatória em todos os grupos, com um grande número de poros interconectados. A análise de DMA mostrou que com o aumento da incorporação de DEX, o diâmetro das fibras e a espessura dos *scaffolds* também aumentou, enquanto o módulo de elasticidade não se alterou. O ensaio de WST-8 e LDH mostraram que ao longo de 21 dias a viabilidade celular aumentou nos grupos A, B, C e D, enquanto que diminuiu nos grupos E, F e G. Com base nos ensaios de avaliação osteogênica, pode-se observar que *scaffolds* com DEX não apresentaram tal potencial. A partir dos dados do presente estudo, pode ser concluído que os *scaffolds* com DEX surgem como uma ferramenta promissora para aplicação em engenharia de tecidos, no entanto, esta associação não apresentou potencial de promover a diferenciação osteogênica de MSCs.

Palavras-chave: bioengenharia, células-tronco, nanotecnologia, dentes decíduos.

## Abstract

A variety of biomaterials are undergoing studies for application in tissue engineering, among which are poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) scaffolds, produced by the *electrospinning* technique. Through this technique, it is possible to add different bioactive molecules during the biomaterial production process, such as dexamethasone (DEX). DEX is characterized by its anti-inflammatory and immunosuppressive potential and by its ability to promote the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to osteogenic lineages. This study has aimed to produce and characterize PLGA scaffolds with different quantities of DEX (100% pure) and verifies the mechanical properties of the scaffolds, as well as the role of the scaffolds on the outcome of the MSCs from deciduous teeth. Seven groups of scaffolds were produced in the following proportions: 1 part DEX to 20 parts PLGA, identified as 1:20. Following this, 1:10, 1:4, 1:2, 3:4 and 1:1, DEX:PLGA parts were used. The following groups were studied: A: PLGA scaffold without DEX (control group); B: 1:20; C: 1:10; D: 1:4; E: 1:2; F: 3:4 and G: 1:1. The DEX presence in the scaffolds and its release rate from the scaffolds over 21 days were determined by UV light analysis ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). All the scaffolds were evaluated for their physicochemical characteristics by scanning electron microscope (SEM) and by dynamic mechanical analysis (DMA). The interaction of the scaffolds with MSCs was assessed over 21 days by WST-8 and lactate dehydrogenase (LDH) assay. The osteogenic potential of the scaffold with DEX was assessed by alkaline phosphatase assay, Alizarin red staining and RT-PCR analysis. The UV light analysis showed that after 21 days of culture all the groups released between 73 to 79% of the total DEX present in the scaffolds at the beginning of the experiment. The SEM micrographs showed fibers distributed in a random manner in all groups, with a large number of interconnected pores. DMA analysis showed that with the increase of DEX incorporation, the fiber diameter and scaffolds thickness also increased while their elastic modulus did not change. The WST-8 and LDH assay showed that, over 21 days of culture, the cell viability increased in groups A, B, C and D, while decreased in groups E, F and G. Based on the osteogenic assays, it could be observed that the scaffolds with DEX did not have the osteogenic potential. From the data of this study, it can be concluded that the scaffolds with DEX appear to be a promising tool for application in tissue engineering, however, this association did not show the potential for promote the osteogenic differentiation.

Keywords: bioengineering, stem cells, nanotechnology, deciduous teeth.

## 1 Antecedentes e Justificativas

### Enxertos Ósseos

As perdas ósseas causadas por malformações congênitas, ressecção de tumores, infecções ou traumas representam um desafio na cirurgia reparadora da face (COSTA *et al.*, 2008; MEIJER *et al.*, 2008; REICHERT *et al.*, 2008; HENG *et al.*, 2004; SHANG *et al.*, 2001; TAKAGI e URIST, 1982). Nesses procedimentos, a utilização de enxertos ósseos é frequente (SHANG, *et al.*, 2001), sendo que o enxerto selecionado deve possuir características adequadas para seu emprego. Os requisitos para um material de substituição óssea ideal são: estimular a regeneração e consolidação óssea, proporcionar resistência fisiológica, permanecer observável (ter contraste radiográfico), ser obtido prontamente, ser fácil de usar, não causar reação inflamatória intensa em tecidos adjacentes, não estimular a encapsulação pelo tecido conjuntivo, não desencadear transformação maligna, não produzir subprodutos tóxicos, não ter propriedades galvânicas ou eletrolíticas e não proporcionar mecanismos facilitadores de infecções (SAILER *et al.*, 2008). Dessa maneira, ao utilizar-se um enxerto ósseo, busca-se a aproximação à morfologia e fisiologia do tecido ósseo original. Na busca por fontes de tecido ósseo, pode-se recorrer a áreas doadoras como regiões da maxila e mandíbula, costelas ou crista ilíaca (SWAN e GOODARCE, 2006; SILVA *et al.*, 2000; LEMPERLE *et al.*, 1998; FERREIRA, 1997). No entanto, a disponibilidade de áreas doadoras de osso pode se tornar restrita em alguns pacientes (BRODIE *et al.*, 2005; LUCARELLI *et al.*, 2004). Existe como alternativa à busca de regeneração óssea, a utilização dos bancos de ossos, que por sua vez são tecidos provenientes de pacientes com morbidade inerente (ZHANG *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2008; LEONG *et al.*, 2006). Além disso, há os xenoenxertos bovinos que apesar de corretamente comercializados como materiais inertes e livres de antígenos apresentam respostas insatisfatórias (FUKUTA *et al.*, 1992). Os biomateriais de hidroxiapatita são biocompatíveis, no entanto apresentam um desempenho biofísico inadequado em termos de remodelação, podendo haver migração, deiscência, ulceração e extrusão. A ossificação com esses materiais costuma ocorrer nos limites das zonas receptoras, sem ocorrência nas áreas mais internas dos enxertos (FERREIRA, 1997). O osso homólogo não é um tecido privilegiado imunologicamente, como já foi pensado. Ao contrário, tem se demonstrado a ocorrência de resposta imunológica mediada por células e reação antígeno-anticorpo ao enxerto (COSTA *et al.*, 2008; HARDIN, 1994). A técnica de liofilização para o tecido ósseo é utilizada há

mais de 50 anos, tornando-se um dos métodos mais satisfatórios na preservação óssea (ANGERMANN e JEPSEN, 1991). Essa técnica parece não alterar de forma adversa a capacidade osteoindutiva do transplante, porém altera significativamente a biomecânica desses enxertos, quando utilizados como implantes estruturais (MACEDO *et al.*, 1999; PERRY, 1999; CONRAD *et al.*, 1993).

Diferentes estudos têm sido realizados no intuito de procurar materiais de substituição óssea adequados. No entanto, além de limitações de técnica, as limitações físicas, químicas e biológicas podem ser fatores limitantes para o emprego do enxerto. Assim, o crescente interesse no estudo da engenharia de tecidos é justificado, sendo esta uma ciência que estuda uma nova alternativa para a criação e reposição de tecidos (LIPPENS *et al.*, 2010; NIEMEYER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2009; KERKIS *et al.*, 2008; PIERDOMENICO *et al.*, 2005; GROGER *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2003; SCHANTZ *et al.*, 2003; SHANG *et al.*, 2001;; BRUDER *et al.*, 1998).

### **Engenharia de Tecidos**

Atualmente, uma área de pesquisa biomédica denominada engenharia de tecidos ou bioengenharia estuda novas formas de reconstrução ou mesmo produção de tecidos, inclusive para uso em cirurgias reparadoras (ZHANG *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2003). A engenharia de tecidos é multidisciplinar e compreende todos os métodos e esforços para projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos em locais específicos (GOESSLER, 2005; YIN, 2016). Essa área de estudo compila conhecimentos de duas áreas distintas, engenharia e ciências biológicas, onde por meio da associação de biomateriais, células e biomoléculas, tem o objetivo de propor novas alternativas aos tratamentos clínicos para reparação tecidual. O uso de métodos da engenharia de tecidos pode ser um caminho apropriado na geração ou regeneração tecidual *in vitro* e *in vivo* para tratamentos de lesões.

### **Matrizes Biodegradáveis – Scaffolds**

Diversas técnicas e diferentes tipos de biomateriais vêm sendo estudados e utilizados na prática da engenharia de tecidos (ACASIGUA *et al.*, 2014<sup>A</sup>; ACASIGUA *et al.*, 2014<sup>B</sup>; OLYVEIRA *et al.*, 2013; LIPPENS *et al.*, 2010; NIEMEYER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*,

2008; YOON *et al.*, 2007; PIERDOMENICO *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2003; SCHLIEPHAKE *et al.*, 2001; SHANG *et al.*, 2001). Entre as técnicas, destaca-se a utilização de estruturas, ou moldes, que simulam uma matriz extracelular (MEC) em sua morfologia e, quando associadas a células, funcionam como arcabouço para a adesão e proliferação celular (AGARWAL *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2002; MIKOS e TEMENOFF, 2000). Uma das formas de produzir esses moldes é por meio da nanotecnologia, sendo essas matrizes chamadas *scaffolds*. Esse biomaterial pode ser produzido a partir de diferentes compostos naturais ou sintéticos, sendo estruturas biocompatíveis que se degradam quando introduzidos no organismo animal. Os *scaffolds* auxiliam o processo de regeneração e/ou construção de tecidos, guiando as células, propiciando sua adesão e proliferação. Ao mesmo tempo que auxiliam na reorganização celular, essas estruturas se degradam dando lugar aos tecidos que são formados (BARBANTI *et al.*, 2005; BOUDRIOT *et al.*, 2005).

Os *scaffolds* podem ser obtidos pela técnica de *electrospinning*, a qual apresenta diversas vantagens. Por esse método, as nanofibras formadas mimetizam a estrutura da MEC, em termos de variabilidade de topologia, textura e diâmetro das fibras, e, de modo limitado, também em termos de propriedades mecânicas (SHIN *et al.*, 2001). O método de *electrospinning* funciona pelo princípio eletrostático, onde são processados polímeros derretidos ou, mais comumente, soluções de polímeros, produzidas com vários solventes. As soluções poliméricas são posicionadas entre eletrodos que durante o processo passam a ter uma alta tensão. A solução forma uma gota que, devido ao campo de alta tensão, colapsa e forma um jato acelerado em direção ao eletrodo oposto. Durante o aceleração o solvente irá evaporar e o que restará serão fibras de dimensões pequenas, até nanométricas, que durante um processo contínuo constituirá uma matriz de nanofibras. Essa técnica permite que sejam adicionadas biomoléculas (e.g., fatores de crescimento e fármacos) à solução a ser submetida ao processo de *electrospinning*, o que propicia a formação de fibras com tais biomoléculas já incorporadas em sua estrutura. Dentre os polímeros estudados para produção de matrizes pela técnica de *electrospinning*, os poliésteres alifáticos têm sido amplamente utilizados por serem biodegradáveis, apresentarem adequada biocompatibilidade e ainda permitirem o controle do perfil de degradação (NAIR *et al.*, 2007). Como exemplo, existe o ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), que possui uma cinética versátil de degradação, não toxicidade e biocompatibilidade (YOON *et al.*, 2007).

Na engenharia de tecidos, o uso de matrizes de nanofibras associado a células-tronco e a biomoléculas é uma ferramenta promissora que pode ser utilizada

como suporte para o desenvolvimento de diferentes tecidos (ACASIGUA *et al.*, 2014<sup>A</sup>; DUALIBI *et al.*, 2004; BOUDRIOT *et al.*, 2001).

### **Células-tronco**

As células-tronco são um tipo celular indiferenciado, com capacidade de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares especializados (CONRAD e HUSS, 2005). As células-tronco tecido específicas, ou células-tronco adultas, têm sido consideradas uma alternativa ao uso das células-tronco embrionárias, devido a sua disponibilidade, facilidade de obtenção e cultivo. Assim, o estudo de populações de células-tronco adultas, com plasticidade similar às células-tronco embrionárias, tem sido alvo de inúmeros grupos de pesquisa (BERNARDI *et al.*, 2011; SECCO *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2006; KERKIS *et al.*, 2006; PRANKE *et al.*, 2006; MORSCZECK *et al.*, 2005; SEO *et al.*, 2004; HOU *et al.*, 2003; MIURA *et al.*, 2003; ROMANOV *et al.*, 2003; YAMAGUCHI *et al.*, 2003; CATERSON *et al.*, 2001; GRONTHOS *et al.*, 2000). Nos últimos anos, resultados positivos em relação ao uso potencial das células-tronco adultas, introduziu novas perspectivas na terapia celular para o reparo e regeneração de tecidos e órgãos (ACASIGUA *et al.*, 2014<sup>A</sup>; JONES e TRAINOR, 2004; SYLVESTER e LONGAKER, 2004).

### **Nichos de Células-tronco Adultas**

As células-tronco adultas residem em todos os tecidos do organismo, onde mantêm a homeostase e respondem aos estímulos nocivos (WALKER *et al.*, 2009; FORBES *et al.*, 2002; HALL e WATT, 1999). O microambiente específico em que as células-tronco adultas residem, controlando a sua auto-renovação e produção de progenitores celulares, é definido como nicho (WALKER *et al.*, 2009; SPRADLING *et al.*, 2001). O ser humano possui diferentes nichos de células-tronco adultas, cuja plasticidade e capacidade regenerativa têm sido avaliadas. Entre as populações de células-tronco adultas estudadas há as células-tronco mesenquimais, as quais foram encontradas em diversos tecidos humanos. As principais fontes de células-tronco mesenquimais usadas na clínica e em pesquisa são as de medula óssea (HOU *et al.*, 2003; MIURA *et al.*, 2003; ROMANOV *et al.*, 2003; CATERSON *et al.*, 2001), as de sangue de cordão umbilical (PRANKE *et al.*, 2006; YAMAUCHI *et al.*, 2001) e as do próprio cordão umbilical (SECCO *et al.*, 2008). No entanto, outras fontes celulares têm sido investigadas, como populações de células-tronco mesenquimais identificadas na

polpa de dentes permanentes (GRONTHOS *et al.*, 2000) e decíduos (BERNARDI *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2007; KERKIS *et al.*, 2006; MUIRA *et al.*, 2003) no ligamento periodontal (SEO *et al.*, 2004) e no folículo dentário de terceiros molares (MORSCZECK *et al.*, 2005).

### **Células-tronco de Polpa de Dentes Decíduos**

De particular interesse, citamos as células-tronco provenientes de dentes decíduos em processo de rizólise. Em estudo de Bernardi e colaboradores (2011), os pesquisadores isolaram uma população de células-tronco a partir do tecido pulpar de dentes decíduos humanos em diferentes graus de exfoliação, e procederam a sua cultura *in vitro*. Miura e colaboradores (2003) atribuíram a estas células maior potencialidade significativa de proliferação e clonogenicidade, quando comparadas às células-tronco de polpa de dentes permanentes e às células-tronco da medula óssea. Como essas células podem ser facilmente colhidas e potencialmente cultivadas *ex vivo*, esse novo conceito abre amplas possibilidades de seu uso em medicina regenerativa, nos sistemas autólogos e, portanto, não apresentando problemas de rejeição imunológica (ACASIGUA *et al.*, 2014<sup>A</sup>; MONTEIRO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2008; KERKIS *et al.*, 2008; PIERDOMENICO *et al.*, 2005).

### **Moléculas Bioativas**

Moléculas bioativas, ou biomoléculas, são os constituintes dos seres vivos. São formadas principalmente por carbono e hidrogênio, ainda que também possam estar presentes na sua constituição o oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre. Podem ainda conter outros elementos, mas em menor proporção. Dividimos as biomoléculas em moléculas orgânicas e moléculas inorgânicas. Moléculas orgânicas são compostos sintetizados por seres vivos e que participam da estrutura e do funcionamento da matéria viva, por exemplo, glícidos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos. As moléculas inorgânicas são compostos não sintetizados pelos seres vivos, mas que são muito importantes para eles, como a água, a biomolécula mais abundante, os gases oxigênio e dióxido de carbono e os sais inorgânicos.

Dentro da engenharia de tecidos uma grande quantidade de células vem sendo testada sobre as matrizes de nanofibras, tais como as células-tronco mesenquimais, demonstrando o potencial de regenerar tecidos de diferentes origens (ACASIGUA *et*

*al.*, 2014<sup>A</sup>; DERSCH *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2004). Esses moldes também podem permitir, utilizando diferentes tecnologias, associar a liberação controlada de biomoléculas que agem promovendo a proliferação e a diferenciação celular (BOUDRIOT *et al.*, 2005). As moléculas bioativas desempenham um papel importante no sistema de comunicação entre as células e o microambiente, e os mecanismos de liberação sustentada dessas moléculas, por meio de *scaffolds* aplicados à regeneração, vêm sendo estudados recentemente (XIAOQIANG *et al.*, 2010). Nesse contexto, diferentes metodologias tem sido exploradas para a obtenção de biomateriais contendo proteínas, enzimas, fármacos, entre outras substâncias em seu interior. *Scaffolds* produzidos por meio da técnica de *electrospinning*, além de mimetizar a escala de tamanho das fibras colágenas da MEC, permitem o encapsulamento de moléculas bioativas nas nanofibras produzidas. Com isso, a medida em que as fibras degradam, existe a liberação de biomoléculas para o meio, o que pode guiar e auxiliar o processo de regeneração tecidual (ACASIGUA<sup>A</sup>, 2014).

### **Glicocorticóides**

Entre as biomoléculas aplicáveis dentro da bioengenharia existem os glicocorticóides (GCs), uma classe de hormônios esteróides caracterizados pela habilidade de se ligar com o receptor de glicocorticóides (RG) e desencadear uma série de eventos que irão agir no metabolismo celular. A ação dos GCs é mediada por um receptor proteico intracelular que pertence à superfamília dos receptores nucleares e age como um fator de transcrição ativado pelo hormônio, regulando a expressão dos genes responsivos aos GCs (YUJT e CIDLOWSKI, 2002; BAMBERGER *et al.*, 1996; HOLLENBERG *et al.*, 1985).

O receptor inativo, não-ligado ao hormônio, encontra-se no citoplasma associado a um complexo multiproteico que consiste de uma molécula do receptor, duas moléculas da proteína de choque térmico (HSP) 90, uma molécula de HSP 70, uma de HSP 56, HSP 40, p23 e p60 (PRATT, 1993). A principal função do complexo formado pelas HSP é manter o receptor no citoplasma, estabilizando-o em sua forma inativa, e facilitar a ligação do hormônio ao RG. Após a ligação ao hormônio, o RG é dissociado do complexo e ocorrem alterações na conformação da molécula do receptor ocorrendo a sua dimerização. O mecanismo de transativação gênica é a forma clássica de ação dos GCs e caracteriza-se pela interação direta de dímeros do RG com uma sequência específica no DNA, chamada elemento responsivo aos glicocorticóides (ERGs), presente geralmente na região promotora dos genes. A

ligação do dímero diretamente aos ERGCs estimula a transcrição dos genes responsivos aos GCs, com envolvimento de componentes básicos da maquinaria de transcrição gênica, como a RNA polimerase II e fatores gerais da transcrição, além de fatores coativadores e correpressores da transativação. De uma maneira simples, os GCs combinam-se com proteínas receptoras citosólicas e, a seguir, esse complexo liga-se à cromatina nuclear. As RNA polimerases são ativadas, e ocorre transcrição de RNA mensageiros específicos, resultando na síntese proteica nos ribossomos. Os GCs atuam de maneira importante na síntese de proteínas, e deve-se pressupor que essas proteínas sejam elas enzimas ou fatores reguladores, e irão atuar no controle das funções celulares apropriadas à homeostase do organismo (GLASS e ROSENFELD, 2000; BEATO e SANCHEZ-PACHECO, 1996).

Além da propriedade de ativar a transcrição gênica, o RG pode, também, reprimi-la. A repressão pode ocorrer pela ligação do RG aos elementos responsivos negativos aos GCs, localizados na região promotora de genes específicos, como o promotor do gene da pró-opiomelanocortina. Um segundo mecanismo de regulação da transrepressão gênica mediada pelos GCs não envolve processos dependentes do ERGs, porém interações do RG com outros fatores de transcrição, por meio de um antagonismo inibitório dependente de interação proteína-proteína (GLASS e ROSENFELD, 2000). Os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos GCs envolvem esta regulação negativa da transcrição gênica. A proteína ativadora-1 (AP-1) e o NFkB são os fatores mais extensivamente estudados, que interferem negativamente com a transativação mediada pelo RG (SCHEINMAN *et al.*, 1995). Mais recentemente, tem sido descrita uma inibição por ação dos GCs da via de sinalização utilizada pelos *toll-like receptors*, os quais têm um papel crucial na indução da resposta imunológica inata, por reconhecer patógenos e promover a expressão de moléculas co-estimuladoras, comuns na transdução dos sinais e na expressão de genes pró-inflamatórios (MOYNAGH, 2003).

Os efeitos dos GCs sintéticos são mediados pelo mesmo RG endógeno. Nos últimos 50 anos, os GCs têm sido a droga com efeito anti-inflamatório e imunossupressor mais comumente utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas. Seus excelentes efeitos terapêuticos como anti-inflamatório e imunossupressor são, frequentemente, acompanhados por graves e, algumas vezes, irreversíveis efeitos colaterais, como *diabetes mellitus*, úlcera péptica, síndrome de Cushing com supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, osteoporose, atrofia cutânea, psicose, glaucoma, entre outras (SCHACKE *et al.*, 2002), limitando assim o uso dos GCs.

GCs também induzem inibição da proliferação de várias células, existindo evidências sugestivas de que os seus efeitos antiproliferativos ocorrem acompanhados pela indução de apoptose. Um exemplo seria o uso de GCs no tratamento das leucemias, onde esta droga induziria apoptose nos linfócitos (HAMMER *et al.*, 2004).

Os GCs são drogas valiosas para o tratamento de muitas doenças, mas também podem exercer efeitos deletérios sobre o tecido ósseo. Altas doses de GCs frequentemente resultam em perda de massa óssea e aumento do risco de fraturas, comumente referido como fragilidade óssea e osteoporose induzida por GCs (KIM, 2010; LANE e YAO, 2010). Apesar de inibição clara de formação óssea por GCs na terapia clínica, baixas doses de GCs são reguladoras positivas da formação óssea *in vitro* e/ou *in vivo* (AZUMA, 2010; KALAK, 2009). Tem sido demonstrado que a diferenciação de osteoblastos humanos *in vitro* ocorre com aproximadamente  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  M de GCs em um período específico de tempo nas fases iniciais do seu desenvolvimento. A exposição à GCs no início do desenvolvimento de osteoblastos induz um aumento dose-dependente da atividade da fosfatase alcalina e mineralização da matriz (EIJKEN *et al.*, 2006).

### **Dexametasona**

Dentro da bioengenharia, a dexametasona (DEX), fármaco glicocorticoide, vem sendo investigada com o intuito da promoção da diferenciação de células-tronco mesenquimais para linhagem osteogênica quando cultivadas *in vitro* (HOLTORF *et al.*, 2005; JAGER *et al.*, 2005). A utilização de DEX pode facilitar a formação de tecido ósseo, mas a exposição prolongada *in vivo* pode levar à osteoporose. A diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos funcionais *in vitro* exige fatores indutivos em concentrações e períodos de tempo adequados (MAUNEY *et al.*, 2005; BERESFORD *et al.*, 1993). O protocolo básico de diferenciação osteogênica com fosfato orgânico e ácido ascórbico está bem estabelecido (HATTORI *et al.*, 2006). Por outro lado, um outro suplemento frequentemente utilizado é a dexametasona sintética, que é conhecido por regular a osteogênese de células-tronco mesenquimais e mineralização *in vitro* (HARDY e COOPER, 2011; WALSH *et al.*, 2001; D'IPPOLITO *et al.*, 1999; AUBIN, 1998; JAISWAL *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1994), porém os mecanismos exatos de sua ação ainda pouco definidos. Alguns autores sugerem que a DEX seria essencial para a diferenciação completa de células-tronco mesenquimais em osteoblastos produtores de matriz extracelular óssea (HARDY e COOPER, 2011; MOSTAFA *et al.*, 2011; WALSH *et al.*, 2001; D'IPPOLITO *et al.*, 1999; AUBIN, 1998;

JAISWAL *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1994). Este fármaco medeia efeitos sobre as células não só pela sua influência específica sobre a transcrição gênica (HAMIDOUCHE *et al.*, 2008; HONG *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 1999; FROMIGUE *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1996; BERESFORD *et al.*, 1994), mas também por meio da atuação em outras vias de sinalização que indiretamente afetam a transcrição gênica (HARDY e COOPER, 2011). Além disso, DEX também é um estimulador de migração e preservação das características das células-tronco mesenquimais durante suas passagens (YUN *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2005) e apresenta como desvantagem a ação inibitória sobre a proliferação e viabilidade celular, conforme já descrito (WALSH *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 1999; AUBIN, 1998; CHENG *et al.*, 1994). Sabe-se que a DEX reduz a proliferação das células-tronco mesenquimais, enquanto estimula sua diferenciação osteogênica (TAIRA *et al.*, 2003). Lu e colaboradores (2012), ao estimular células de roedores *in vitro* com DEX, verificaram que diferentes concentrações de DEX provocaram diferentes alterações na expressão de genes que controlam a diferenciação de osteoblastos e mineralização. Nesse estudo, baixas concentrações de DEX ( $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M) aumentaram a expressão dos genes osteogênicos *Cbfa1* (*core-binding factor subunit alpha-1*), *OPN* (osteopontina), e *OCN* (osteocalcina), enquanto que uma concentração mais elevada ( $10^{-4}$  M) não provocou nenhuma alteração ou alterou ligeiramente provocando a inibição desses genes. Outros estudos demonstram o potencial que a dexametasona possui em promover a estimulação da diferenciação em linhagem osteogênica (LU *et al.*, 2012).

As ações da DEX parecem complexas, e as respostas celulares dependem da dose e duração da suplementação e estágio de diferenciação da célula submetida a sua ação (CHANG *et al.*, 2006; SHUR *et al.*, 2005; FROMIGUE *et al.*, 1997; BERESFORD *et al.*, 1993). A investigação dos efeitos da DEX sobre as células-tronco mesenquimais são de extrema importância, uma vez que os seus mecanismos de ação ainda não estão bem elucidados.

Assim, o presente estudo busca avaliar as propriedades mecânicas de *scaffolds* de PLGA produzidos por meio da técnica de *electrospinning*, acrescidos de dexametasona, e avaliar as repercussões de tal associação, quando em contato com células-tronco de polpa de dentes decíduos em processo de rizólise.

## **2 Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Avaliar as propriedades mecânicas de *scaffolds* de PLGA acrescidos de dexametasona e suas propriedades biológicas quando em contato com células-tronco de polpa de dentes decíduos.

### **Objetivos Específicos**

- 1 – Produzir *scaffolds* de PLGA, com diferentes concentrações de dexametasona em sua composição;
- 2 – Caracterizar física e quimicamente as diferentes composições dos *scaffolds* produzidos;
- 3 – Gerar informações acerca da interação entre os *scaffolds* e células-tronco;
- 4 – Verificar o potencial osteogênico dos *scaffolds* acrescidos de dexametasona e células-tronco *in vitro*.

### **3 Metodologia**

#### **Tipo de Estudo**

Estudo laboratorial, *in vitro*, com análise descritiva dos dados coletados.

#### **Células-tronco pulpaes de dentes decíduos**

As células-tronco utilizadas no estudo foram obtidas a partir do tecido pulpar de dois dentes decíduos (SCDT – *stem cells from deciduous teeth*). Dois pacientes, em atendimento no Ambulatório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO-UFRGS), tiveram as extrações indicadas pelo cirurgiões-dentistas responsáveis pelos seus tratamentos. Os dois dentes incluídos no estudo eram hígidos, com metade de sua raiz reabsorvida pelo processo fisiológico de rizólise e os doadores possuíam estado geral de saúde normal, sem doenças agudas ou crônicas, sendo chamadas as duas culturas celulares obtidas SCDT-A e SCDT-B. Os pais ou responsáveis assinaram um Termo de Doação de Material Biológico doando os dentes extraídos para a realização dos experimentos. Os pacientes também assinaram o termo de doação – anexo 1.

As células que não foram utilizadas nos experimentos foram colocadas em sacos brancos identificados como material biológico para seu descarte, sendo posteriormente recolhidos por empresa especializada – ABORGAMA.

#### **Cultura de células**

Após a extração, a manipulação de cada um dos dentes e dos seus fragmentos de tecido pulpar foi realizada segundo o processamento descrito por Bernardi (2011), para cultura de células pulpaes de dentes decíduos em processo de rizólise (BERNARDI *et al.*, 2011). Seguindo essa metodologia, após coletado, o dente foi colocado em um frasco contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco/NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 UI/mL de penicilina (Gibco), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 2,5µg/mL de anfotericina B (fungizona, Gibco) para transporte até uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis.

Na capela de fluxo laminar, todo o tecido pulpar remanescente (polpa coronária) foi separado do elemento dentário. Como a câmara pulpar estava aberta, a remoção do tecido pulpar foi realizada com uma colher de dentina. O tecido obtido foi incubado a 37°C, por 1 hora, em tampão contendo 0,2 % de colagenase tipo I (Gibco), 25 mM HEPES (N-2 Hidroxietil piperazine – N'-2 ácido sulfônico etano pH 7,4 (Gibco)), 10 mM de fosfato de sódio mono-básico (Nuclear/SP), 100 mM de cloreto de sódio (Dinâmica/São Paulo), 3 mM de fosfato de potássio, 1 mM de cloreto de cálcio (Synth/SP), 24 mM de cloreto de potássio (Synth), 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich/St Louis), 12 mM de manitol (Synth), 0,2% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich), 45 µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough). A suspensão de células foi centrifugada a 800 x G durante 10 minutos a 4°C. O material resultante foi ressuspenso em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco), 0,45 µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough) e 3,7 mg/L de HEPES (Gibco). A ressuspenso foi realizada em garrafas de cultura plástica de 75 cm<sup>2</sup> e estas foram incubadas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 95 % de ar a 37°C.

As células de cada poço foram mantidas em culturas monocamada. O meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias. Quando as células mostraram-se confluentes foi realizado a passagem destas células para novas garrafas de cultivo, sendo que para isso as células em cultura foram colhidas com solução de tripsina-EDTA 0,5 % (Sigma-Aldrich) e transferidas para subculturas na razão de 1:3, no respectivo meio de cultivo. Após nova confluência, as células foram novamente repicadas, ou seja, alocadas em novas garrafas na mesma razão de 1:3.

### **Caracterização das células**

Esse trabalho faz parte da linha de pesquisa do Laboratório de Biologia Bucal da FO-UFRGS em conjunto com o Instituto de Pesquisas com Células-tronco, sendo um seguimento do trabalho realizado por Bernardi e colaboradores (2011), os quais estabeleceram um protocolo para obtenção e cultivo das células-tronco provenientes de polpa de dentes decíduos, bem como sua caracterização como células-tronco mesenquimais. Portanto, para obtenção das células que foram semeadas nos *scaffolds*, foi utilizado o protocolo já estabelecido por Bernardi e colaboradores (2011) para a obtenção de células-tronco.

### **Confecção dos *scaffolds* pela técnica de *electrospinning***

As matrizes, ou *scaffolds*, foram preparadas utilizando poli (D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) (75:25) (PLGA) (P1941–Sigma Aldrich). O polímero foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro-2-propanol (Sigma Aldrich) de modo que a concentração final da solução foi de 12% (m/v). A seguir, a solução foi mantida em agitador magnético durante 24 horas para completa homogeneização (solução mãe). Então, a solução de PLGA 12% (m/v) foi colocada em uma seringa de 1 mL equipada com agulha de diâmetro interno de 0,8 mm e submetida ao processo de *electrospinning*. Para tal, foi utilizada uma diferença de voltagem de 12 kV e vazão de 0,24 mL h<sup>-1</sup>. As matrizes foram formadas sobre lamínulas de vidro de 15 mm de diâmetro, dispostas em placa coletora de alumínio, fixada a uma distância de 15 cm da agulha. Para confecção das matrizes, cada solução passou pelo processo de *electrospinning* por 3 horas e antes de sua utilização com células, os *scaffolds* obtidos foram esterilizados com luz ultravioleta por 30 minutos em capela de fluxo laminar. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (~25°C) e com umidade relativa (UR) do ar em torno de 35%.

#### ***Scaffolds* de PLGA – grupo A**

Após a obtenção da solução mãe foram confeccionados os *scaffolds* de PLGA pela técnica de *electrospinning* (item 3).

#### ***Scaffolds* de PLGA com dexametasona – grupos B, C, D, E, F e G**

Após a obtenção da solução mãe, foi adicionado DEX (Dexametasona Base Micro, lote 11093322B, granulometria 99%<30µm, Pharmanostra, Brasil) necessária para que uma segunda solução fosse formada à 20 partes da massa do polímero (fração de massa do polímero) e 1 parte de dexametasona (20:1). Seguindo, as proporções 10:1, 4:1, 2:1, 4:3 e 1:1 foram também utilizadas para a produção de *scaffolds* (Tabela 1). Para isso, DEX foi adicionada e o sistema mantido em agitação magnética por 20 minutos, para que então fossem confeccionados os *scaffolds* de PLGA / DEX.

#### **Avaliação físico-químicas dos *scaffolds***

### **Avaliação da morfologia, diâmetro de fibras e dimensões dos *scaffolds***

A morfologia dos *scaffolds* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV modelo JEOL - JSM 6060). Após etapa de metalização das amostras com uma fina camada de ouro, fotomicrografias em 4.000x de magnificação foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 kV. Para a determinação do diâmetro médio das fibras, três amostras de cada grupo, produzidas em dias diferentes, foram avaliadas por meio do software ImageJ. Assim, trinta fibras de cada amostra, selecionadas aleatoriamente, foram utilizadas para aferição do diâmetro. A média obtida foi definida como o diâmetro médio característico de cada amostra. A espessura dos *scaffolds* foi medida com Digimatic Micrometer MDC-25MY (Mitutoyo).

### **Avaliação da presença e do perfil de liberação da dexametasona**

*Scaffolds* (4 cm<sup>2</sup>) contendo as diferentes proporções PLGA/dexametasona foram pesados e incubados a 37 °C em 40 mL de solução de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 e mantidos sob agitação a 60 rpm. Alíquotas de 4 mL foram colhidas nos períodos de 0, 6, 9 e 12 horas e 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias. Sempre que uma alíquota era retirada, o mesmo volume de PBS fresco era adicionado ao sistema. As amostras foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis (Agilent 8453) a 242 nm (MARTINS *et al.*, 2010). A linearidade do método foi verificada por meio da realização de curva padrão (0,002 - 0,028 mg/mL) e a mesma foi utilizada para o cálculo da concentração de DEX de cada amostra. Os resultados apresentados representam a média de três medições  $\pm$  desvio padrão. *Scaffolds* sem dexametasona foram utilizados como controle (grupo A).

### **Propriedades mecânicas dos *scaffolds***

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram avaliadas por meio das curvas de tensão e deformação obtidas pela análise dinâmico-mecânica (DMA). Os ensaios foram realizados no modo de flexão, com frequência de 1Hz, a 2°C / min na faixa de temperatura de – 60 a 100°C, utilizando-se para isso do equipamento DMA Q800, da TA Instruments.

## **Ângulo de contato**

Para a análise do ângulo de contato foi realizada a avaliação de 3 amostras de cada grupo, sendo a média obtida definida como o ângulo de contato médio característico de cada amostra. Para isso, uma gota de água (10 µL) foi instilada sobre a superfície do *scaffold*, previamente afixado em lamínulas de vidro, com o auxílio de uma seringa e, em seguida, uma foto foi obtida para a verificação.

## **Ensaio de interação entre *scaffolds* e células**

Os ensaios para avaliação da viabilidade celular, citotoxicidade, expressão de fosfatase alcalina, quantidade de cálcio e expressão gênica foram realizados/repetidos com duas culturas de células-tronco de dentes decíduos (SCDT). Assim, para cada uma das análises, com cada uma das culturas celulares, as células foram semeadas nos *scaffolds* a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células viáveis concentradas em 1,5 mL de meio de cultura para cada poço de placas de cultura celular de 24 poços. Após, as amostras foram incubadas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% CO<sub>2</sub>. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados foram a média de três medições.

## **Ensaio de adesão e viabilidade celular**

Decorrido os períodos experimentais de 3, 7, 10, 14, 17 e 21 dias, foi realizada a análise da viabilidade utilizando-se o reagente WST-8 (Sigma-Aldrich). O reagente WST-8 foi adicionado no momento da análise e deixado em contato com as células durante 1 hora, de acordo com as instruções do fabricante. Após isso, a leitura por espectrofotometria foi realizada com a solução analisada, em 450 nm, em leitor de placas (Spectramax). Um grupo controle, que consistiu de células cultivadas sobre *scaffolds* de PLGA, também foi avaliado pelo ensaio de WST-8.

## **Ensaio de citotoxicidade**

A citotoxicidade celular foi avaliada por meio da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH), através do NADH formado pela ação enzimática, pelo método colorimétrico. Nesse ensaio, o extravasamento da enzima citoplasmática LDH é

medido e a sua presença no meio de cultura onde as células são cultivadas é indicativo de dano à membrana celular (Saad *et al.*, 2003). O aumento da dosagem dessa enzima é proporcional ao aumento da morte celular. Para realização do teste, alíquotas do meio de cultura das amostras em cultivo foram dosadas após 3, 7, 10, 14, 17 e 21 dias de cultivo. Como grupo controle positivo da reação (grupo H), células foram semeadas diretamente em *scaffolds* de PLGA sem dexametasona e, no momento do teste, Triton X-100 1% (Sigma-Aldrich®) foi adicionado a esses poços a fim de se verificar a liberação máxima de LDH. A leitura da absorbância foi realizada no Wallac EnVision (Perkin Elmer).

### **Avaliação de fosfatase alcalina**

Após 21 dias de cultivo das células sobre os diferentes grupos de *scaffolds*, a expressão de fosfatase alcalina foi avaliada. Para isso, as cultura celular foi lavada com PBS para remover o meio de cultura. A seguir, 500 µL de PBS com glicina 0,1 M, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e triton X-100 à 0.5 % (pH 10.5) foi adicionado em cada amostra para o rompimento da membrana celular e liberação das moléculas de fosfatase alcalina. Após incubar as amostras por 1 hora, 100 µL de sobrenadante foram removidos e transferidos para poços de placas de 96 poços. Então 200 µL de de solução de p-nitrofenil fosfato (Sigma, USA) foi adicionado em cada amostra e as mesmas foram mantidas a 37 °C por 30 minutos e, então, colocadas a 0°C por 10 minutos para diminuir a reação. A seguir 50 µL de solução de NaOH foi adicionado a cada amostra para parar a reação. As amostras foram mensuradas quanto aos níveis de fosfatase alcalina por meio de leitor de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Multiskan™ FC, Thermo Scientific™, USA) em 405 nm.

### **Avaliação da quantidade de cálcio**

Após 21 dias de cultivo das células sobre os diferentes *scaffolds*, as amostras foram coradas com Alizarin Red para verificação da quantidade de depósitos de cálcio formados decorrente de uma possível diferenciação celular. Brevemente, as amostras foram lavadas com PBS e em seguida foi adicionado paraformaldeído 4% por 5 minutos para fixação das células. A seguir foi adicionada solução de 1 % de Alizarin Red por 10 minutos e as mesmas foram lavadas 3 vezes com água destilada para que a análise das amostras fosse realizada em microscópio de luz.

### ***Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)***

As análises da expressão dos genes Runx2, osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN) nos diferentes grupos experimentais foi realizado por qPCR. A sequência dos *primers* utilizados está na Tabela 2. Após 21 dias de cultivo das células sobre os diferentes *scaffolds*, o RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Ambion®, Life Technologies™, USA). A verificação da quantidade e pureza dos RNAs extraídos foi analisada por espectrometria (Nanodrop, ND-2000). O cDNA foi sintetizado usando Super Script® III Reverse Transcriptase kit (Life Technologies, USA). As reações de qPCR foram feitas utilizando o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, USA) de acordo com protocolo determinado pelo fabricante. Foi utilizado o gene da Beta actina como normalizador.

### **Análise Estatística**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP (desvio padrão) e referidos para significância estatística por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste para múltiplas comparações (teste de Tukey). Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $p < 0,001$ .

## 4 Resultados

### **Avaliação da morfologia, diâmetro de fibras e dimensões dos *scaffolds***

Por meio das imagens obtidas por MEV pôde-se observar que, independente do grupo, as fibras formadas apresentaram superfície lisa e distribuíram-se de maneira aleatória por toda a estrutura do *scaffold*, o qual apresentou um grande número de poros interconectados (Figura 1). As fibras apresentaram um diâmetro médio de  $554 \pm 44$ ,  $608 \pm 48$ ,  $752 \pm 37$ ,  $978 \pm 64$ ,  $1125 \pm 13$ ,  $1211 \pm 38$  e  $1230 \pm 94$  nanômetros para os grupos A, B, C, D, E, F e G, respectivamente (Figura 2 – A). Por meio da análise da espessura dos *scaffolds*, verificou-se que os mesmos possuíam espessura de  $105 \pm 18$ ,  $109 \pm 15$ ,  $115 \pm 10$ ,  $120 \pm 11$ ,  $125 \pm 12$ ,  $134 \pm 16$  e  $142 \pm 13$  micrometros para os grupos A, B, C, D, E, F e G, respectivamente (Figura 2 – B).

### **Avaliação da presença e da cinética de liberação da dexametasona**

Por meio das absorvâncias obtidas pela espectrofotometria UV-Vis, foi verificada a concentração de DEX em cada amostra em diferentes tempos. Todas as amostras apresentaram uma liberação constante de DEX em PBS ao longo de 21 dias de análise, sendo a quantidade de  $0.0000 \pm 0.0000$ ,  $0.0091 \pm 0.0005$ ,  $0.0173 \pm 0.0010$ ,  $0.0381 \pm 0.0020$ ,  $0.0616 \pm 0.0030$ ,  $0.0851 \pm 0.0050$  e  $0.0968 \pm 0.0040$  mg/mL verificada para os grupos A, B, C, D, E, F e G, respectivamente (Figura 3 – A). A quantidade total de DEX liberada em 21 dias correspondeu a  $73.07 \pm 4.00$ ,  $76.96 \pm 4.44$ ,  $76.26 \pm 4.00$ ,  $74.70 \pm 3.64$ ,  $79.15 \pm 4.65$  e  $77.46 \pm 3.20$  % da quantidade de dexametasona presente ao início do experimento nos grupos B, C, D, E, F e G, respectivamente (Figura 3 – B).

### **Propriedades mecânicas**

A partir das curvas de tensão e deformação, obtidas pela DMA, verificou-se que o módulo de elasticidade não diminuiu de maneira significativa ( $p=5972$ ) à medida que a concentração de dexametasona aumentou nas amostras, sendo verificados os valores de  $53.76 \pm 16.56$ ,  $50.56 \pm 13.37$ ,  $38.04 \pm 7.89$ ,  $34.22 \pm 9.34$ ,  $31.05 \pm 3.94$ ,  $21.54 \pm 5.21$  e  $19.04 \pm 2.19$  Mpa para os grupos A, B, C, D, E, F e G, respectivamente (Figura 4 – A). A tensão máxima também não sofreu diminuição significativa ( $p=0.1536$ ) com o aumento da dexametasona, sendo verificados os valores de  $2000 \pm$

0.225,  $1.884 \pm 0.252$ ,  $1.775 \pm 0.204$ ,  $1.756 \pm 0.077$ ,  $1.704 \pm 0.261$ ,  $1.684 \pm 0.107$  e  $1.540 \pm 0.032$  Mpa para os grupos A, B, C, D, E, F e G, respectivamente (Figura 4 – B).

### **Medida do ângulo de contato**

A hidrofiliabilidade e/ou hidrofobicidade não sofreu alteração a medida em que a DEX foi alterada nas amostras (Figura 5), permanecendo entre  $127^\circ$  e  $132^\circ$ , sem diferença estatística entre os grupos ( $p=0.0782$ ).

### **Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade**

Por meio dos ensaios de interação entre os scaffolds e as células, pode-se notar que para as amostras A, B, C e D, ocorreu o aumento da viabilidade celular e manutenção de baixos níveis de LDH ao longo dos 21 dias de experimento. Para o grupo E, em uma das culturas celulares utilizadas, ocorreu um leve aumento da viabilidade celular, enquanto que para a outra cultura, a viabilidade após o  $14^\circ$  dia manteve-se constante. Enquanto os níveis de LDH para esse grupo mantiveram-se dentro da normalidade. Em relação aos grupos F e G, uma diminuição da viabilidade celular foi notada já aos três dias de acompanhamento em ambas culturas celulares. Ainda, para os grupos F e G, uma diminuição dos níveis de LDH também foi verificada, sendo encontrado valores abaixo dos observados no controle (Figura 6).

### **Avaliação de fosfatase alcalina**

Após 21 dias de cultura, verificou-se que a expressão de fosfatase alcalina não apresentou variação entre os grupos estudados. Essa situação se repetiu para as duas culturas celulares utilizadas no estudo. Os valores encontrados para a cultura celular SCDT-A foram  $12.32 \pm 1.30$ ,  $11.21 \pm 1.92$ ,  $11.80 \pm 1.72$ ,  $12.87 \pm 0.76$  e  $12.40 \pm 0.57$  (números arbitrários) para os grupos A, B, C, D e E, respectivamente. Para a cultura celular SCDT-B, os valores encontrados foram  $10.35 \pm 1.20$ ,  $11.43 \pm 0.89$ ,  $10.87 \pm 0.91$ ,  $11.21 \pm 1.21$  e  $10.47 \pm 0.89$  para os grupos A, B, C, D e E, respectivamente (Fig. 7). Os grupos F e G foram excluídos dos experimentos devido a sua toxicidade aferida em experimentos anteriormente expostos.

### **Avaliação da quantidade de cálcio**

Após a adição da solução de Alizarin Red, verificou-se que não ocorreu a marcação característica dos depósitos de cálcio em nenhum dos grupos do estudo com nenhuma das duas culturas utilizadas no estudo, indicando que não ocorreu a deposição da matriz extracelular compatível com a diferenciação osteogênica (Fig. 8).

### ***Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)***

A partir da avaliação da expressão gênica, verificou-se que, após 21 dias de cultura das células-tronco sobre os diferentes *scaffolds*, não ocorreu a expressão dos marcadores de diferenciação osteogênica para nenhum dos grupos estudados com nenhuma das duas culturas utilizadas no estudo (dados não apresentados).

## 5 Discussão

A utilização de matrizes de nanofibras associadas à terapia celular é alvo de interesse por parte dos pesquisadores que se dedicam a essa área (ACASIGUA *et al.*, 2014<sup>A</sup>; AGARWAL *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2002; MIKOS e TEMENOFF, 2000). Assim, a caracterização dos *scaffolds* é necessária para verificar a sua estrutura e determinar se o mesmo preenche os requisitos necessários para sua aplicação dentro da engenharia de tecidos. Como descrito por Pham, em 2006, a morfologia das nanofibras é resultado da combinação de diferentes fatores. Nesse estudo, confeccionaram-se fibras com dimensões micrométricas até nanométricas, com poros interconectados e elevada área superficial, como estabelecido pela literatura como requisitos básicos para sua utilização (AGARWAL *et al.*, 2009; MURUGAN e RAMAKRISHNA 2006; HE *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2004). Tais características permitem a migração e comunicação celular, bem como a entrada e saída de substâncias e metabólitos. Supõe-se que o sucesso na fabricação dos *scaffolds*, foi devido ao adequado estabelecimento dos diferentes parâmetros envolvidos em sua produção. Não observou-se a presença de *beads* nas fibras, fato que está fortemente relacionado à concentração da solução ou instabilidade no processo de *electrospinning* no momento da formação das fibras. Essas estruturas são frequentemente observadas em nanofibras produzidas a partir de soluções poliméricas de mais baixas concentrações (ZHAO *et al.*, 2008), além de também demonstrar que ocorreu a adequada evaporação do solvente durante o processo de *electrospinning* (LANNUTTI *et al.*, 2007). A incorporação de dexametasona nas fibras pela técnica de *electrospinning* foi bem sucedida, conforme verificado pela avaliação de espectroscopia UV-Vis. Observou-se que, ao final dos 21 dias de incubação das diferentes composições de *scaffolds* em PBS, aproximadamente 73% à 80% da DEX presente no início do experimento, havia sido liberado dos *scaffolds*, independente da quantidade bruta inicial (variável entre os diferentes grupos). No presente estudo, o perfil de liberação da dexametasona incorporada nos *scaffolds* foi visto de maneira positiva, uma vez que a liberação ocorreu de maneira lenta e contínua, sem um *burst* logo nas primeiras horas de experimento. Assim, pode-se concluir que a utilização deste sistema *scaffold* / DEX, irá propiciar a constante liberação de DEX no sistema em que for empregado *in vitro* ou *in vivo*.

Por meio das análises em microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que a medida em que a quantidade de massa de dexametasona aumentou, em relação a massa de polímero, o diâmetro médio das fibras dos *scaffolds* também aumentou, passando de 554 até 1230 nm. Tal fato sugere ter sido ocasionado pelo aumento da

viscosidade da solução, parâmetro que influencia diretamente no diâmetro das fibras formadas pela técnica de *electrospinning* (ZHAO *et al.*, 2008). Os *scaffolds* tiveram um aumento de  $\pm 100 \mu\text{m}$  a  $\pm 140 \mu\text{m}$  a medida em que a concentração de dexametasona aumentou nos grupos. Uma vez que as fibras recém formadas são depositadas sobre as fibras já produzidas, sobre a placa coletora, é esperado que a espessura dos *scaffolds* aumente a medida em que o diâmetro médio das fibras aumenta.

Uma vez que o propósito da elaboração de novos biomateriais é a sua aplicação clínica, um ponto importante a ser verificado é a caracterização mecânica dos *scaffolds* produzidos. Por meio da DMA foi possível observar que a medida em que a DEX aumentou em concentração, o módulo de elasticidade dos *scaffolds* diminuiu de maneira não significativa, sendo os *scaffolds* produzidos a partir da solução com maior concentração de dexametasona ainda manipuláveis e adequados para os experimentos. Ainda, verificou-se que os *scaffolds* não sofreram alteração quanto a sua hidrofiliicidade e/ou hidrofobicidade, mantendo-se entre  $\pm 128^\circ$  e  $132^\circ$ , o que não representa alteração para os experimentos realizados. Do ponto de vista de aplicação clínica dos *scaffolds* com DEX, pode-se inferir que tais biomateriais apresentam características adequadas a sua utilização, uma vez que apresentam boas características mecânicas.

Para a verificação da interação entre os *scaffolds* e células, foram selecionadas células de polpa de dentes decíduos humanos, em processo de rizólise. Comumente, os dentes decíduos passarão pelo processo de reabsorção de suas raízes ainda durante a infância, sendo assim, uma fonte de células com pouca ou nenhuma morbidade ao paciente (SEO *et al.* 2008). Entre as populações de células-tronco adultas (CTA), as células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea recebem uma atenção especial, representando uma fonte rica células-tronco (LIPPENS *et al.*, 2010; GOESSLER *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2003). Essas CTA apresentam um grande potencial regenerativo, sendo muito bem caracterizadas para aplicação clínica. No entanto, elas só podem ser obtidas por meio de biópsia de medula óssea, que é um procedimento invasivo e potencialmente doloroso. As células-tronco de tecido adiposo também recebem atenção especial (BARBANTI *et al.*, 2005; BOUDRIOT *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2005), assim como as células-tronco de medula óssea, possuem propriedades adequadas para seu emprego clínico. Porém, de maneira semelhante às de medula óssea, para que essas células sejam coletadas existe a necessidade de submeter os pacientes a procedimentos cirúrgicos. Tais procedimentos exigem uma estrutura física complexa, bem como um acompanhamento/monitoramento do paciente antes, durante e após a cirurgia, o qual permanece temporariamente privado

de suas atividades (NAIR e LAURENCIN, 2007). Uma fonte potencial de CTA, são os dentes decíduos, que vêm sendo amplamente estudados (BERNARDI *et al.*, 2011; KERKIS *et al.*, 2008; SCHLIEPHAKE *et al.*, 2001; MIKOS e TEMENOFF, 2000; HE *et al.*, 2005; DUAILIBI *et al.*, 2004; CONRAD *et al.*, 2005). Em estudo de Miura e colaboradores (2003), ao isolar células-tronco a partir de dentes decíduos, as quais nomeou SHEDs (*Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*), os autores verificaram uma maior capacidade proliferativa e clonogênica dessas células quando comparadas as células-tronco da medula óssea (BMSC – *Bone Marrow Stem Cells*) e células-tronco da polpa dental (DPSC – *dental pulp stem cells*). Em 2011, Bernardi e colaboradores, ao comparar o isolamento de células-tronco de dentes decíduos que estavam e não estavam em processo avançado de rizólise, verificaram que a possibilidade de obtenção de células-tronco a partir destes dentes, somente era possível quando o mesmo encontrava-se em processo avançado desse fenômeno. No presente trabalho, foram utilizadas células de dentes decíduos em processo de rizólise. A rizólise é um evento pelo qual os dentes decíduos têm a reabsorção de sua raiz levando posteriormente a sua exfoliação. Por se tratar de um processo fisiológico e geneticamente programado, não apresenta morbidade ao doador, sendo um evento indolor e com baixos custos (CATERSON *et al.*, 2001; GRONTHOS *et al.*, 2000). Apesar de apresentar uma alta taxa proliferativa, o uso clínico dessa fonte celular é pouco provável, tratando-se, no entanto, de uma excelente fonte de CTA para pesquisa.

Para o sucesso da aplicação dos *scaffolds* na engenharia de tecidos, uma característica crucial é que as matrizes permitam o acomodamento e colonização celular, sendo o comportamento celular bastante afetado pela morfologia e composição do substrato. Em estudo prévio, o grupo de pesquisa verificou que *scaffolds* de PLGA, produzidos pela técnica de *electrospinning*, apresentavam características favoráveis à colonização celular (ACASIGUA *et al.*, 2014). Nesse estudo, os autores observaram que as células-tronco mesenquimais aderiram-se aos *scaffolds* da mesma maneira em que aderiram as placas de cultura celular. Com o objetivo de determinar se os *scaffolds* apresentavam uma boa estrutura para a interação com as células, no presente estudo, a viabilidade celular foi avaliada pelo método WST-8 e a citotoxicidade pela avaliação do LDH. Por meio de ambos ensaios, verificou-se que para as amostras A, B, C e D, ocorreu o aumento da viabilidade celular e manutenção de baixos níveis de LDH ao longo dos 21 dias de experimento. Para o grupo E, na cultura SCDT-A, ocorreu um leve aumento da viabilidade celular. Para a cultura SCDT-B, a viabilidade após o 14<sup>o</sup> dia manteve-se constante. Os níveis

de LDH para os grupos A, B, C, D e E mantiveram-se dentro da normalidade. Em relação aos grupos F e G, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular aos três dias, em ambas culturas celulares. Ainda, para os grupos F e G, uma diminuição dos níveis de LDH também foi verificada, sendo encontrado valores abaixo dos encontrados no controle. Tal fato indica uma diminuição no número celular, levando a morte de toda população celular semeada logo no início do experimento. A associação dos resultados de ambos experimentos indicam que os grupos com maior concentração de dexametasona (F e G) apresentaram uma toxicidade, não sendo adequados para sua utilização *in vitro*. Além da toxicidade ocasionada por altas concentrações no momento da confecção das fibras, uma diminuição da viabilidade no grupo E é sugestivo de um potencial efeito de inibição da proliferação celular, ou, de maneira semelhante aos grupos F e G, devido a uma toxicidade promovida pela concentração de DEX, fato não notado nos grupos com menores concentrações (B, C e D).

A dexametasona é um glicocorticoide sintético que suporta e estimula a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais *in vitro* (SALGADO *et al.*, 2006; JAISWAL *et al.*, 1997). Sua associação com  $\beta$ -glicero fosfato e ácido ascórbico é utilizada no meio de diferenciação. Em estudo de Martins e colaboradores (2010), a associação de fibras de policaprolactona (PCL) produzidas por meio da técnica de *electrospinning* com dexametasona foi capaz de promover a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana (hBMSCs). Ainda nesse estudo, os autores utilizaram algumas concentrações semelhantes as utilizadas no presente estudo – 20 partes de polímero e uma parte de dexametasona (20:1), 10:1 e 4:1. Os scaffolds com a dexametasona foram capazes de estimular a diferenciação das hBMSCs em 7 dias de cultivo, ocorrendo uma maior expressão de genes osteogênicos após 21 dias. Por outro lado, em estudo de Su e colaboradores (2016), a associação de scaffolds produzidos pela técnica de *electrospinning* com dexametasona, somente foi capaz de promover a diferenciação de SHEDs (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) quando associado a um meio de cultura celular constituído pelos demais reagentes usualmente utilizados em meios de diferenciação osteogênico,  $\beta$ -glicero fosfato e ácido ascórbico. Em estudo de Su e colaboradores (2012), ao utilizar scaffolds de PCL produzidos por *electrospinning* e acrescidos de dexametasona, o autor observou a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas com a utilização de meio de cultura celular normal. No entanto, nesse estudo o autor também utilizou a proteína osteoindutora BMP-2 (*bone morphogenetic protein 2*) na produção das fibras, a qual teve papel importante para a diferenciação celular. O presente estudo foi idealizado com diferentes concentrações

de dexametasona nas fibras com a intuito de determinar qual seria a concentração ideal para promoção da diferenciação osteogênica em fibras de PLGA produzidas por meio de *electrospinning*. Conforme foi verificado pela associação dos dados coletados, chegou-se ao resultado de que os *scaffolds* de PLGA, independente da concentração de dexametasona presente, não foram capazes de promover a diferenciação de células-tronco de dentes decíduos. A incapacidade dos *scaffolds* com dexametasona em promover a diferenciação foi confirmada pelos experimentos de avaliação dos níveis de fosfatase alcalina, coloração dos depósitos de cálcio com *Alizarin red* e avaliação da expressão genica por meio de RT-PCR. Tal fato contraria achados de outros autores, os quais obtiveram resultados satisfatórios em relação a indução osteogênica promovido pela ação da DEX associada a diferentes biomateriais (DAWES *et al.*, 2012; HONG *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2010). Sabe-se que a concentração de dexametasona pode interferir em sua ação. Conforme abordado anteriormente, Lu e colaboradores (2012), observaram que diferentes concentrações provocaram diferentes alterações na expressão de genes que controlam a diferenciação de osteoblastos e mineralização.

Uma vez que a liberação de dexametasona a partir dos *scaffolds* depende diretamente de parâmetros importantes como solubilidade do polímero, diâmetro das fibras, quantidade de meio no sistema de cultivo, entre outros, e ainda, levando em conta que o meio de cultura é trocado a cada 3 dias, uma determinação precisa da composição da solução que será utilizada na fabricação dos *scaffolds*, esperando uma determinada concentração de dexametasona no meio, ao longo do período de cultivo celular, torna-se tarefa inviável. Por esse motivo, no presente estudo optou-se por utilizar soluções poliméricas com concentrações de dexametasona já estabelecidas como adequadas para estimulação da diferenciação osteogênica, além de concentrações acima e abaixo das reportadas na literatura.

No presente estudo, demonstrou-se que os *scaffolds* de PLGA produzidos pela técnica de *electrospinning*, e acrescidos de dexametasona, apresentaram características adequadas para associação com SCDT, no entanto, não apresentaram condições de promover sua diferenciação em linhagem osteogênica. Tal situação discorda de estudos previamente publicados, onde a diferenciação em linhagem osteogênica foi atingida pela adição de DEX ao biomaterial ou sistema de cultivo (MARTINS *et al.*, 2010; THIBAUT *et al.*, 2010). Por outro lado, outros autores apenas obtiveram tal diferenciação quando a DEX foi associada a outros fatores indutores, como Bmp-2, ácido ascórbico e  $\beta$ -glicero fosfato (SU *et al.*, 2016; DAWES *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2011).

Em vista dos resultados obtidos no presente estudo, mais estudos, associando os *scaffolds* a outros fatores osteoindutores, são recomendados. Ainda, pelas propriedades dos glicocorticoides, estudos em relação um possível potencial antiinflamatório e imunossupressor dos *scaffolds* produzidos é sugerido.

## 6 Perspectivas e Considerações Finais

Os *scaffolds* produzidos no presente estudo não foram capazes de promover a osteodiferenciação. Por outro lado, os glicocorticóides têm como um de seus efeitos, inibir a expressão de uma série de genes inflamatórios incluindo genes de citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão. Eles se ligam em receptores próprios e essa ação inibitória envolve além dos receptores, fatores de transcrição como o fator nuclear-kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) e a proteína ativadora-1 (AP-1), sendo que estes regulam a expressão gênica de diversos componentes inflamatórios (FRY *et al.*, 2007), além de interferir na transcrição de outras citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1) (FOX, 2006). Por este motivo, os glicocorticóides são extensamente utilizados para suprimir os processos inflamatórios que estão associados com o aumento da expressão de genes inflamatórios (CHI *et al.*, 2003; BARNES, 1998). Pelo perfil de liberação controlado e contínuo da dexametasona, *scaffolds* com tais propriedades podem ser desejados para emprego em procedimentos cirúrgicos. Dessa forma, estudos acerca do potencial antiinflamatório e imunossupressor dos *scaffolds* apresentados são fortemente recomendados.

A integração da terapia gênica, terapia celular e biomateriais apresenta o potencial para criar ambientes sintéticos que forneçam os sinais necessários para promover a formação dos tecidos funcionais. Assim, dentro de alguns anos, com apoio da engenharia de tecidos, espera-se que exista a possibilidade de produção de estruturas capazes de substituir tecidos ou órgãos em sua completa estrutura e/ou função. Nesse contexto, para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso dentro da engenharia de tecidos, o papel do pesquisador é fundamental para a contínua busca da criação e do aperfeiçoamento de novas tecnologias.

## **7 Agradecimentos**

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), Programa de Pós-Graduação em Odontologia e IPCT (Instituto de Pesquisa com Células-tronco), que financiaram este projeto.

## Referências Bibliográficas

AGARWAL S, WENDORFF JH, GREINER A. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. **Adv Mater**, v.21, n. 32-33, p. 3343-51, 2009.

ACASIGUA<sup>A</sup> GA, *et al.* Nanofiber Scaffolds Support Bone Regeneration Associated with Pulp Stem Cells. **Curr Stem Cell Res Ther**, v.9, n, 4, p. 330-7, 2014.

ACASIGUA<sup>B</sup> GA, *et al.* Novel Chemically Modified Bacterial Cellulose Nanocomposite as Potential Biomaterial for Stem Cell Therapy Applications. **Curr Stem Cell Res Ther**, v.9, n, 2, p. 117-23, 2014.

ANGERMANN P, JEPSEN OB. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. **J Hosp Infect**, v.17, n. 3, p. 159-69, 1991.

AUBIN JE. Advances in the osteoblast lineage. **Biochem Cell Biol**, v. 76, p. 899, p. 1998.

AZUMA K, *et al.* Glucocorticoid-induced gene tripartite motif-containing 63(TRIM63) promotes differentiation of osteoblastic cells. **Endocr J**, v. 57, p. 455–62, 2010.

BAMBERGER CM, SCHULTE HM, CHROUSOS GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Endocr Rev**, v. 17, p. 245-61, 1996.

BARBANTI SH, ZAVAGLIA CAC, DUEK EAR. Polímeros reabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARNES PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clin Sci**, v. 94, n. 6, p. 557-72, 1998.

BEATO M, SANCHEZ-PACHECO A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. **Endocr Rev**, v. 17, p. 587-609, 1996.

BERESFORD JN, *et al.* The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. **Arch Oral Biol**, v. 39, p. 941, 1994.

BERESFORD JN, GRAVES SE, SMOOTHY CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro:a model of bone formation? **Am J Med Genet**, v. 45, p. 163, 1993.

BERNARDI L, *et al.* The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **J Endod**, v. 37, n. 7, p.973-9, jul. 2011.

BOUDRIOT U, *et al.* Role of electrospun nanofibers in stem cell technologies and tissue engineering. **Macromol Symp**, v. 225, n. 1, p 9-16, may. 2005.

BRODIE JC, *et al.* Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. **J Biomed Mater Res A**, v. 73, n. 4, p. 409-21, jun. 2005.

BRUDER SP, *et al.* The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **J Bone Joint Surg Am**, v. 80, n. 7, p. 985-96, jul. 1998.

CATERSON EJ, *et al.* Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. **MedGenMed**, v. 5, n. E1, feb. 2001.

CHANG PL, *et al.* Comparison of fetal and adult marrow stromal cells in osteogenesis with and without glucocorticoids. **Connect Tissue Res**, v. 47, p. 67, 2006.

CHANG SC, *et al.* *Ex vivo* gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. **Plast Reconstr Surg**, v. 112, n. 7, p. 1841-50, dec. 2003.

CHENG SL, ZHANG SF, AVIOLI LV. Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. **J Cell Biochem**, v. 61, p. 182, 1996.

CHENG SL, *et al.* Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **Endocrinology**, v. 134, p. 277, 1994.

CHI YS, *et al.* Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: *in vivo* regulation of inflammation-associated gene expression. **Bioch Pharmac**, v. 66, n. 7, p. 1271-8, 2003.

CONRAD C, HUSS R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **J Surg Res**, v. 124, n. 2, p. 201-8, 2005.

CONRAD EU, *et al.* The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. **Clin Orthop Relat Res**, n. 290, p. 279-84, may.1993.

COSTA AM, *et al.* Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 1, p. 204-10, jan. 2008.

DAWES GJS, *et al.* Effects of dexamethasone-loaded PLGA microspheres on human fetal osteoblasts. **J Biomater Appl**. v. 27, n. 4, p. 477-83, 2012.

DERSCH R, GREINER A, WENDORFF JH. Polymer Nanofibers by electrospinning. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, Marcel Dekker, 2004.

D'IPPOLITO G, *et al.* Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. **J Bone Miner Res**, v. 14, p. 1115, 1999.

DUAILIBI MT, *et al.* Bioengineered teeth from cultures rat tooth bud cells. **J Dent Res**, v. 83, n. 7, p. 523-8, 2004.

EIJKEN M, *et al.* The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. **Mol Cell Endocrinol**, v. 248, p. 87-93, 2006.

FERREIRA JCR. **Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autogenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático.** Estudo experimental em coelhos (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; p. 128, 1997.

FORBES SJ, *et al.* Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. **Clin Sci (Lond)**, v. 103, n.4, p. 355-69. oct. 2002.

FOX LP. As bases farmacológicas da terapêutica. In: BRUNTON, L. L. L., J.S.

FROMIGUE O, MARIE PJ, LOMRI A. Differential effects of transforming growth factor beta2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells. **Cytokine**, v. 9, p. 613, 1997.

FRY L, BAKER BS, POWLES AV. Psoriasis-A possible candidate for vaccination. *Autoimmunity Reviews*, v. 6, n. 5, p. 286-9, 2007.

FUKUTA K, *et al.* Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. **J Craniofac Surg**, v. 3, n. 25, 1992.

GLASS CK, ROSENFELD MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes Dev**, v. 14, p. 121-41, 2000.

GOESSLER UR, HORMANN K, RIEDEL F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery. **Int J Mol Med**, v. 15, n. 6, p. 899-905, 2005.

GONG T, *et al.* Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. **Stem Cells Int**, 2016

GROGER A, *et al.* Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: preliminary study. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v. 37, p. 129-33, 2003.

GRONTHOS S, *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 13625, 2000.

HALL PA, WATT FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, London, v. 106, n. 4, p. 619-33, ago. 1999.

HAMIDOUCHE Z, *et al.* FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. **FASEB J** v. 22, p. 3813, 2008.

HAMMER S, *et al.* Glucocorticoids mediate differential anti-apoptotic effects in human fibroblasts and keratinocytes via sphingosine-1-phosphate formation. **J Cell Biochem**, v. 91, p. 840-51, 2004.

HARDY R, COOPER MS. Glucocorticoid-induced osteoporosis – a disorder of mesenchymal stromal cells? **Front Endocrinol**. v. 27, p. 2-24, 2011.

HARDIN CK. Banked bone. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 27, 911p, 1994.

HATTORI H, *et al.* Establishment of a novel method for enriching osteoblast progenitors from adipose tissues using a difference in cell adhesive properties. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 343, n. 4, p.1118-23, 2006.

HE W, *et al.* Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. **Biomaterials**, v. 26, p. 7606-15, 2005.

HENG BCL-2, *et al.* Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. **J Bone Miner Res**, v. 19, p. 1379, 2004.

HOLLENBERG SM, *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. **Nature**, v. 318, p. 635-41, 1985.

HOLTORF HL, JANSEN JA, MIKOS AG. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. **J Biomed Mater Res A**, v. 72, p. 326, 2005.

HONG D, *et al.* Quantitative proteomic analysis of dexamethasone-induced effects on osteoblast differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC. **Osteoporos Int**. v. 22, n. 7, p. 2175-86, 2011.

HONG HJ, *et al.* TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. **Science**, v. 309, p. 1074, 2005.

HOU L, *et al.* Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. **Int J Hematol**, v. 78, n. 3, p. 256-61, 2003.

HU B, *et al.* Bone Marrow Cells Can Give Rise to Ameloblast-like Cells. **J Dent Res**, v. 85, n. 416, 2006.

JAGER M, *et al.* Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers *in vitro*. **Ann Biomed Eng**, v. 33, p. 1319, 2005.

JAISWAL N, *et al.* Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. **J Cell Biochem**, v. 64, p. 295, 1997.

JONES NC, TRAINOR PA. The Therapeutic Potential Of Stem Cells In The Treatment Of Craniofacial Abnormalities. **Expert Opinion Biol Ther**, v. 4, n. 5, p. 645-57, 2004.

KALAK R, *et al.* Endogenous glucocorticoid signaling in osteoblasts is necessary to maintain normal bone structure in mice. **Bone**, v. 7, p. 45:61, 2009.

KERKIS I, *et al.* Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med**, v. 3, n. 6, 2008.

KERKIS I, *et al.* Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 105, 2006.

KIM HJ. New understanding of glucocorticoid action in bone cells. **BMB Rep**, v. 9, n. 43, p. 524–9, 2010.

KIM CH, CHENG SL, KIM GS. Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. **J Endocrinol**, v. 162, p. 371, 1999.

LANE NE, YAO W. Glucocorticoid-induced bone fragility. **Ann N Y Acad Sci**, v. 3, p. 1192, 2010.

LANNUTTI J, *et al.* Electrospinning for tissue engineering scaffolds. **Mater Sci Eng C** v. 27, p. 504-9, 2007.

LEMPERLE SM, *et al.* Bone healing of large cranial and mandibular defects protect from soft tissue interposition: a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. **Plast Reconstr Surg**, v. 101, n. 660, 1998.

LEONG NL, JIANG J, LU HH. Polymer–ceramic composite scaffold induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Eng Med Biol Soc**, v. 1, p. 2651-4, 2006.

LI WJ, *et al.* Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. **J Biomed Mater Res**, v. 60, p. 613–21, 2002.

LIPPENS E, *et al.* Evaluation of bone regeneration with an injectable, in situ polymerizable Pluronic F127 hydrogel derivative combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibia defect model. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 617, 2010.

LU L, *et al.* The epithelial sodium channel is involved in dexamethasone-induced osteoblast differentiation and mineralization. **Cell Biol Toxicol**, v. 28, n. 5, p. 279-89, 2012.

LUCARELLI E, *et al.* Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. **Transfus Apher Sci**, v. 30, n. 2, p.169-74, 2004.

MACEDO CAS, *et al.* Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. **Rev Bras Ortop**, v. 34, n. 9-10, p. 529-34, 1999.

MARTINS A, *et al.* Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality. **Biomaterials**, v.31, n. 22, p. 5875-85, 2010.

MAUNEY JR, VOLLOCH V, KAPLAN DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. **Tissue Eng**, v. 11, p. 787, 2005.

MEIJER GJ, *et al.* Cell-based bone tissue engineering. **PloS Med**, v. 4, n.260, 2007.

MIKOS AG, TEMENOFF JS. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. **Electron J Biotechnol**, v. 3, p. 114-9, 2000.

MIURA M, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5807, 2003.

MORSCZECK C, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. **Matrix Biol**, v. 24, n. 155, 2005.

MOSTAFA NZ, *et al.* Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured with dexamethasone, vitamin D3, basic fibroblast growth factor, and bone morphogenetic protein-2. **Connect Tissue Res**, v. 1, p. 15, 2011.

MOYNAGH PN. Toll-like receptor signalling pathways as key targets for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids. **J Endocrinol**, n. 179, p. 139-44, 2003.

MONTEIRO BG, *et al.* Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. **Cell Prolif**, v. 42, n. 587, 2009.

MURUGAN R, RAMAKRISHNA S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. **Tissue Eng**, n. 12, p. 435-47, 2006.

NAIR LS, LAURENCIN CT. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progr Polym Sci**, v. 32, n. 762, 2007.

NIEMEYER P, *et al.* Transplantation of human mesenchymal stem cells in a nonautogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 900, 2010.

OLYVEIRA GM, *et al.* Human Dental Pulp Stem Cell Behavior Using Natural Nanolith/Bacterial Cellulose Scaffolds for Regenerative Medicine. **J Biomed Nanotechnol**, v. 9, p. 1-8, 2013.

PARKER KL. **Farmacologia dermatológica**. GOODMAN & GILMAN (Ed.). Rio de Janeiro:McGrawHill, p.1534-1537, 2006.

PERRY CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. **Clin Orthop Rel Res**, v. 360, p. 71-86, 1999.

PASSIER R, MUMMERY C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. **Curr Opin Biotechnol**, v.16, p. 498-502, 2005.

PHAM QP, SHARMA U, MIKOS AG. Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2796-805, 2006.

PIERDOMENICO L, *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 27, n. 836, 2005.

PRANKE P, *et al.* Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCount-BD and ISHAGE protocols. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 7, p. 901-6, 2006.

PRATT WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. **J Biol Chem** v. 15, n. 29, p. 21455-8, 1993.

REICHERT JC, *et al.* The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. **Biomaterials**, v. 30, n. 2149, 2009.

ROMANOV YA, SVINTSITSKAYA VA, SMIRNOV VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, n. 105, 2003.

SAAD B, ABU-HIJLEH G, SUTER UW. Cell culture techniques for assessing tissue compatibility of biomaterials. **Polym Biomater, A**. The Citus Books. p. 263-99, 2003.

SAILER HF, PAJAROLA GF. **Cirurgia Bucal**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2000.

SALGADO AJ, *et al.* Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering. **Curr Stem Cell Res Ther** v. 1, p. 345-64, 2006.

SCHACKE H, DOCKE WD, ASADULLAH K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, p. 23-43, 2002.

SCHEINMAN RI, *et al.* Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science** v. 270, p. 283-6, 1995.

SECCO M, *et al.* Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! **Stem Cells**, v. 26, n. 146, 2008.

SEO BM, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 149, 2004.

SHANG Q, *et al.* Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. **J Craniofac Surg**, v. 12, n. 586, 2001.

SCHANTZ JT, *et al.* Repair of calvarial defects with customised tissue engineered grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy *in vivo*. **Tissue Eng**, v. 9, n. 127, 2003.

SHIN YM, *et al.* Electrospinning: a whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. **Appl Phys Lett**, v. 78, p. 1149-51, 2001.

SCHLIEPHAKE H, *et al.* Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects - an experimental pilot study in mini pigs. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 30, n. 531, 2001.

SHUR I, SOCHER R, BENAYAHU D. Dexamethasone regulation of cFos mRNA in osteoprogenitors. **J Cell Physiol**, v. 202, p. 240, 2005.

SILVA ADB, *et al.* Retalho ósseo pré-fabricado com osso homogêneo: estudo da maturação óssea em um modelo experimental. **Acta Cir Bras**, v. 15, n. S3, p. 65-8, 2000.

SPRADLING A, DRUMMOND-BARBOSA D, KAI T. Stem cells find their niche. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 98-104, 2001.

SU WT, *et al.* Differentiation potential of SHEDs using biomimetic periosteum containing dexamethasone. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 1, n. 58, p. 1036-45, 2016.

SU Y, *et al.* Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 8, n. 2, p. 763-71, 2012.

SWAN MC, GOODARCE TEE. Morbidity at the iliac crest donor site following bone grafting of the cleft alveolus. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, p. 129-133, 2006.

SYLVESTER KG, LONGAKER MT. Stem Cells: Review and Update. **Arch Surg**, v. 139, n. 93, 2004.

TAIRA M, *et al.* Effects of two vitamins, two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells. **J Oral Rehabil**, v. 30, p. 697, 2003.

TAKAGI K, URIST MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann Surg**, v. 196, n. 100, 1982.

WALKER MR, PATEL KK, STAPPENBECK TS. The Stem Cell Niche. **J Pathol**, v. 217, n. 2, p.169-80, 2009.

WALSH S, *et al.* High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. **Rheumatology**, v. 40, p. 74, 2001.

XIAO Y, *et al.* Dexamethasone treatment during the expansion phase maintains stemness of bone marrow mesenchymal stem cells. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 4, n. 374, 2010.

XIAO Y, *et al.* Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. **Tissue Eng**, v. 9, n. 1167, 2003.

XIAOQIANG L, *et al.* Encapsulation of proteins in poly (L-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 418-24, 2010.

YAMAGUCHI M, *et al.* Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. **Int J Hematol**, v. 78, n. 256, 2003.

YAMAGUCHI M, *et al.* Serum-free coculture for ex-vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. **Exp Hematol**, v. 29, n.174, 2001.

YIN X, *et al.* Engineering Stem Cell Organoids. **Cell Stem Cell**. v. 7, n. 18, p. 25-38, 2016.

YOON EMD, *et al.* *In vivo* osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. **Tissue Eng**, v. 13, n. 619, 2007.

YU J, *et al.* Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. **Biol Cell**, v. 99, n. 465, 2007.

YU DT MR, CIDLOWSKI JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. **Mol Endocrinol**, v. 16, p. 1719-26, 2002.

YUN SP, RUY JM, HAN HJ. Involvement of  $\beta$ 1-integrin via PIP complex and FAK/paxillin in dexamethasone-induced human mesenchymal stem cells migration. **J Cell Physiol** v. 226, p. 683, 2011.

ZHANG ZY, *et al.* Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. **Biomaterials**, v. 31, n. 608, 2010.

ZHAO L, *et al.* Preparation and cytocompatibility of PLGA scaffolds with controllable fiber morphology and diameter using electrospinning method. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. v. 87, p. 26-34, 2008.

ZHENG Y, *et al.* Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **J Dent Res**, v. 88, n. 249, 2009.

**Anexo – Termo de Doação de Material Biológico.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – NÍVEL DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS ODONTOPEDIATRIA**

**Termo de Doação de Material Biológico**

**Título do Projeto de Pesquisa: Estudo mecânico e biológico de matrizes  
poliméricas acrescidas de dexametasona.**

Pesquisas indicam que existem células-tronco no nervo do dente de leite. A grande vantagem do uso do nervo do dente de leite para a obtenção destas células-tronco é que os dentes utilizados iriam cair naturalmente. Com este trabalho, irá se verificar se essas células-tronco dos dentes de leite possuem o potencial de auxiliar na formação de tecido ósseo no momento em que são misturadas com fibras biodegradáveis.

Esse projeto de pesquisa está vinculado ao Comitê de Ética e em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone 51 3308 5023.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa. Não haverá qualquer tipo de remuneração ou bonificação caso haja concordância em participar do projeto, bem como custos por parte do doador. Será mantida a confidencialidade da identidade do paciente.

Eu, \_\_\_\_\_, como responsável pelo(a) menor \_\_\_\_\_, declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, estando disposto (a) a trazê-lo (a) nas consultas marcadas, assim como, doar seu dente de leite depois da extração.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo Participante

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável: Anna Christina Medeiros Fossati

RG: 1025935386

Telefone para contato: (51) 8282.6719 ou 3308-5024

## Tabelas

Tabela 1

Quantidade dos reagentes utilizados no preparo das soluções poliméricas submetidas à técnica de *electrospinning* para a produção dos *scaffolds*.

Grupo	Hexafluor	PLGA	DEX
A	1 mL	0.12 g	-----
B	1 mL	0.12 g	0.006 g
C	1 mL	0.12 g	0.012 g
D	1 mL	0.12 g	0.03 g
E	1 mL	0.12 g	0.06 g
F	1 mL	0.12 g	0.09 g
G	1 mL	0.12 g	0.12 g

Tabela 2

Sequência de primers usados para o real-time PCR.

Nome do gene	Sequência do primer
Osteonectin	F: 5'-CTCTGCCTTAAACACACATTG-3'
	R: 5'-TTCCCTTTGCCACCTC-3'
RUNX2	F: 5'-CTGAGGTAACCTTGCTAACG-3'
	R: 5'-ATCAATACACTAAGAAATGTTTCAAGG-3'
Osteopontin	F: 5'-AGCCAATGATGAGAGCAA-3'
	R: 5'-TTCAGGTGTTTATCTTCTTCCTTAC-3'
GAPDH	F: 5'-ATGAGAAGTATGACAACAGCC-3'
	R: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAA-3'

## Figuras

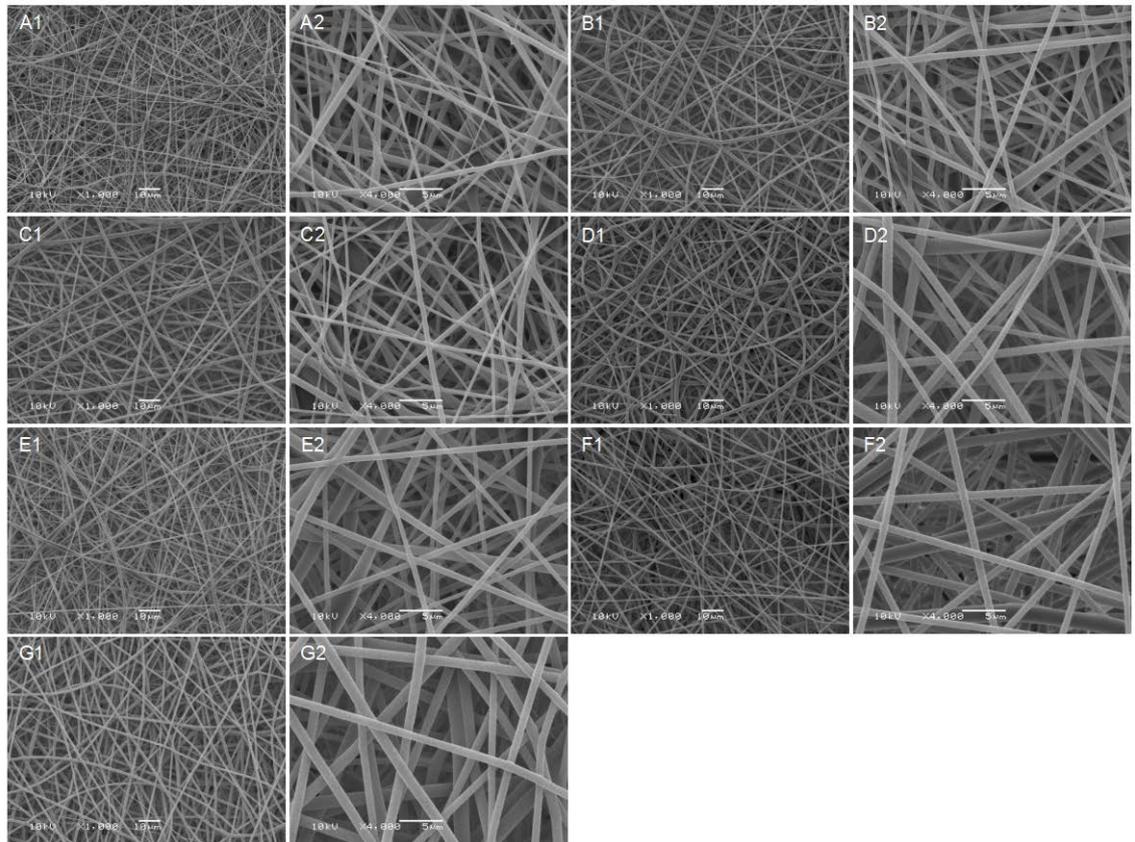


Figura 1. Imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (magnificação 1.000x e 4.000x). A1 e A2) grupo A; B1 e B2) grupo B; C1 e C2) grupo C; D1 e D2) grupo D; E1 e E2) grupo E; F1 e F2) grupo F, G1 e G2) grupo G.

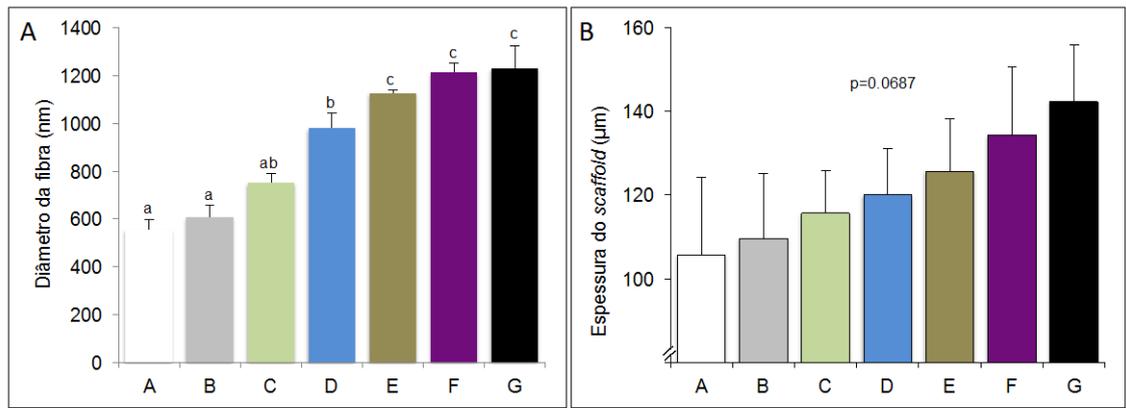


Figura 2 – A) Diâmetro médio das fibras dos *scaffolds*. B) Espessura média dos *scaffolds* após sua confecção. Significância estatística quando  $p < 0.001$ .

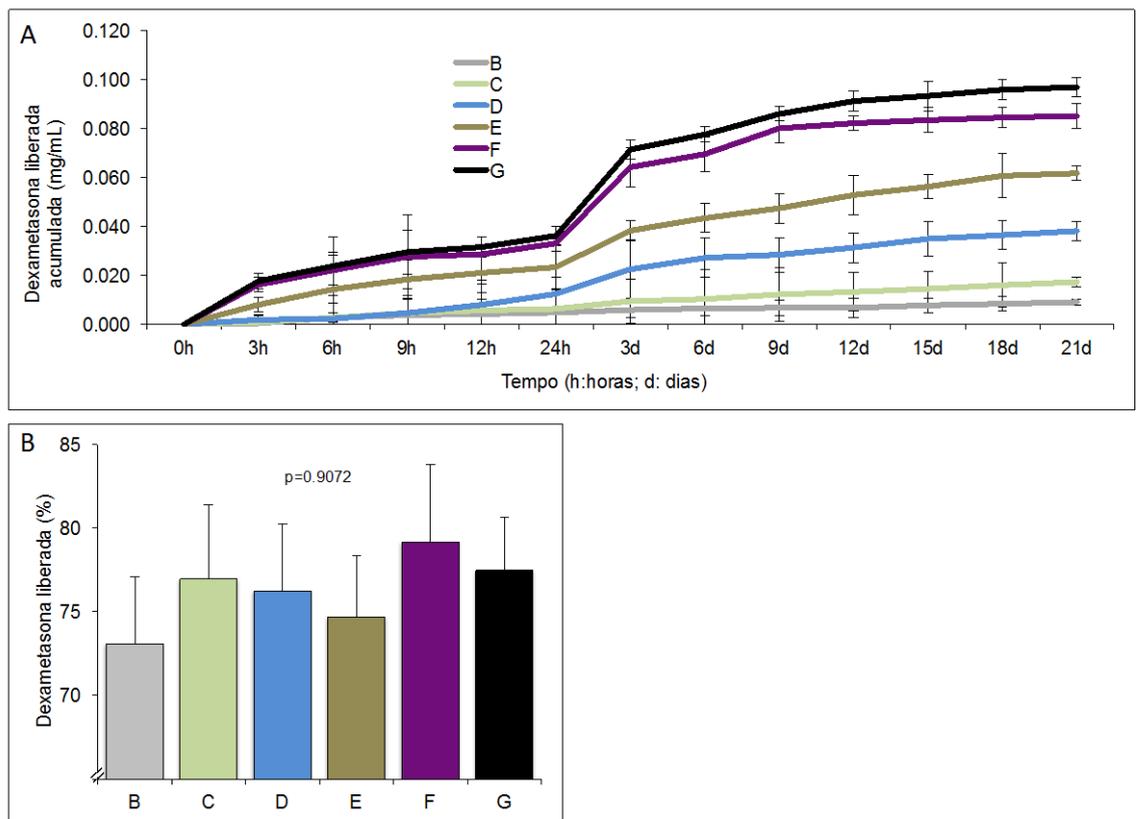


Figura 3 – A) Perfil de liberação acumulada da dexametasona ao longo de 21 dias. B) Dexametasona liberada em 21 dias de cultura. Porcentagem encontrada em relação ao total presente ao início do experimento.

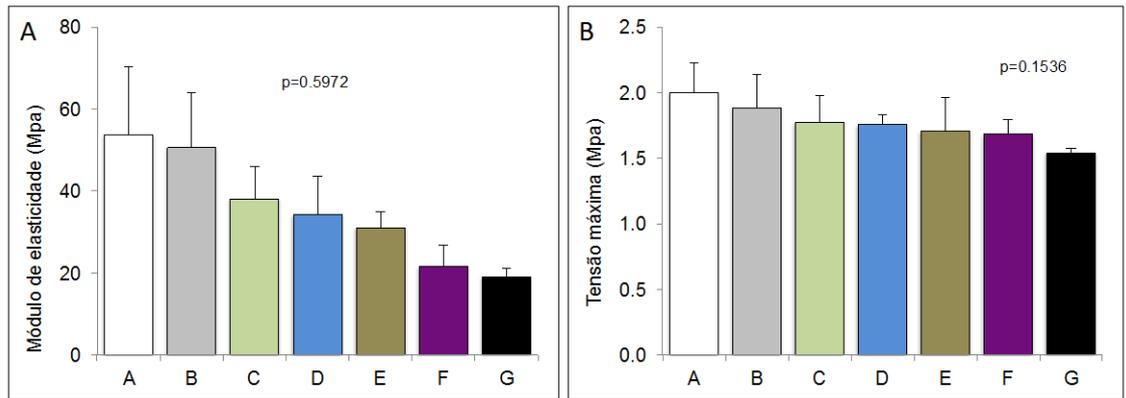


Figura 4 – A) Módulo de elasticidade dos *scaffolds*. B) Tensão máxima dos *scaffolds*.

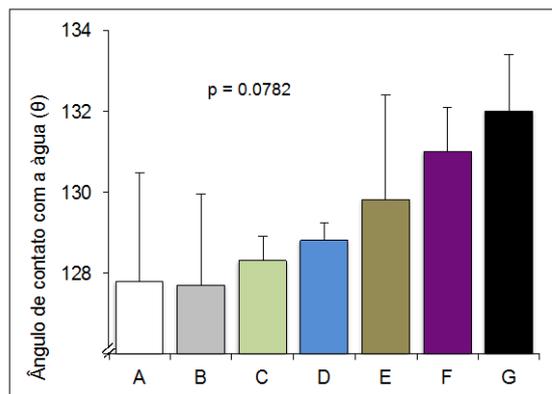


Figura 5 – Avaliação do ângulo de contato com a água.

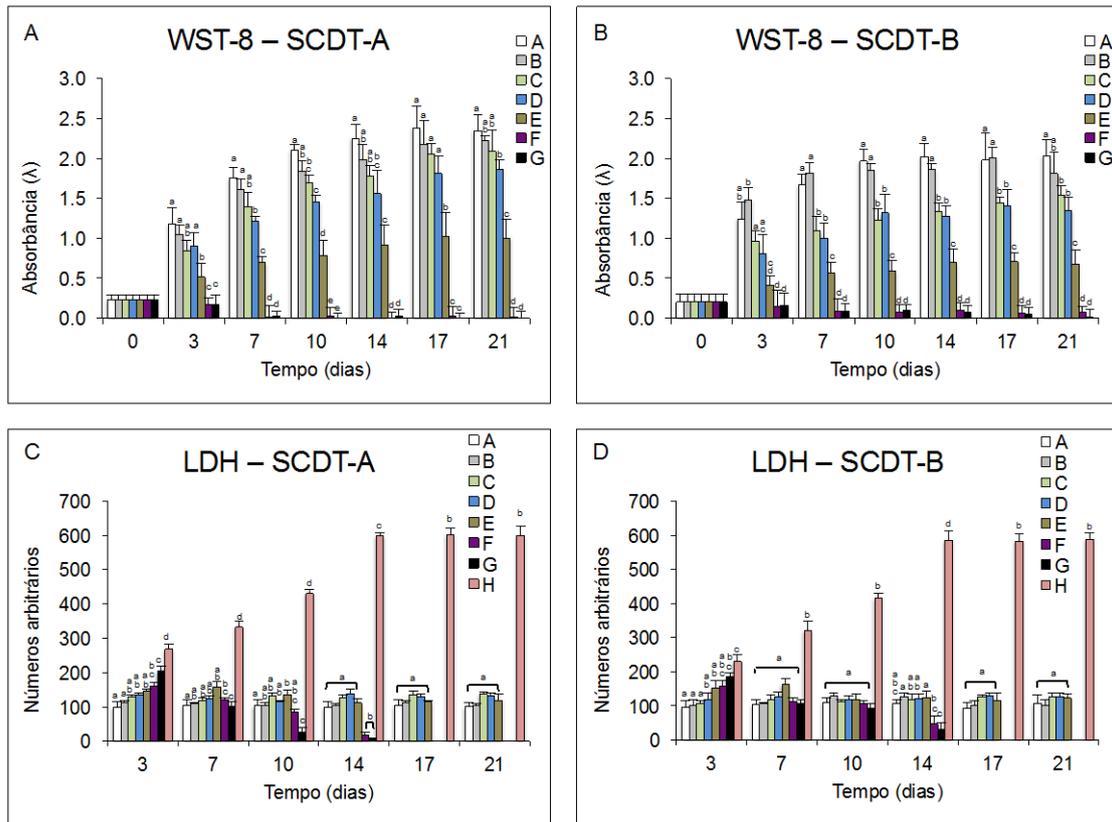


Figura 6. Ensaio de interação entre os *scaffolds* e células-tronco mesenquimais. A e B) Viabilidade celular para as duas culturas celulares cultivadas sobre os diferentes *scaffolds* em estudo. C e D) Avaliação da citotoxicidade dos *scaffolds* realizado com as duas culturas celulares. O grupo H representa o grupo controle positivo de morte celular. Significância estatística quando  $p < 0.001$ .

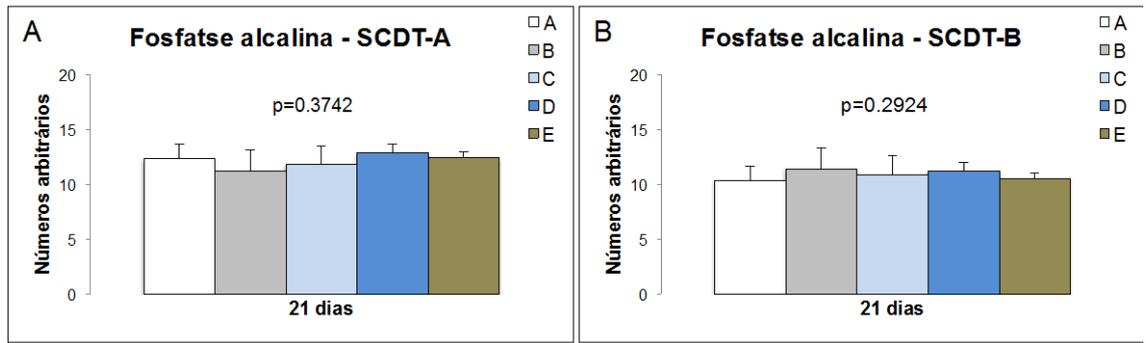


Figura 7 – Avaliação da expressão de fosfatase alcalina.

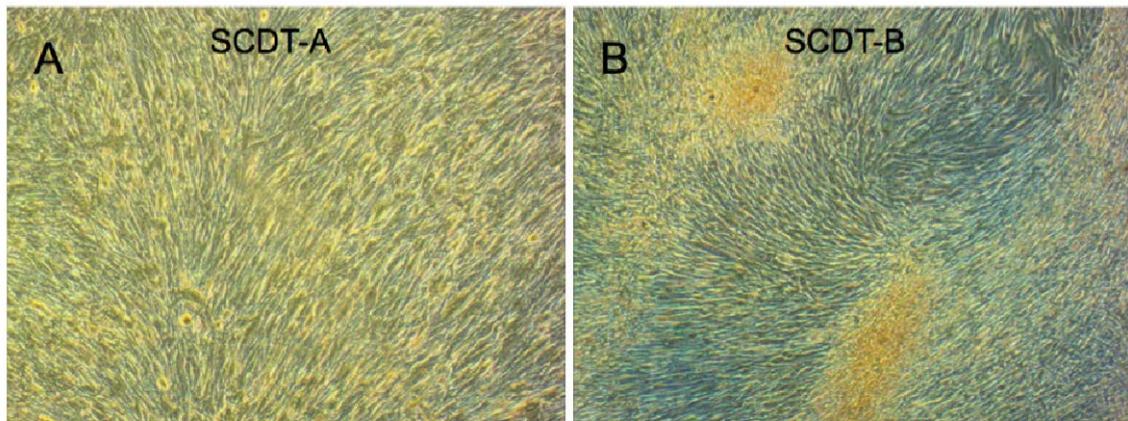


Figura 8 – Fotomicrografias de microscopia de luz. Exemplos representativos dos diferentes grupos (A, B, C, D, E, F e G) utilizados no estudo. A) cultura SCDT-A e B) para a cultura SCDT-B.