



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA INTERAÇÃO DE  
CÉLULAS DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL EM HIDROGÉIS  
DE CELULOSE BACTERIANA**

**GISELE VOLPATO DE SOUZA**

**FLORIANÓPOLIS  
2011**



**Gisele Volpato de Souza**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA INTERAÇÃO DE  
CÉLULAS DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL EM HIDROGÉIS  
DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Luismar Marques Porto, *PhD*

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Derce de O. S. Recouvreux

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Janice Koepp

Florianópolis  
2011

SOUZA, Gisele Volpato de.

Avaliação da Viabilidade e da Interação de Neurônios do Gânglio da Raiz Dorsal em Hidrogéis de Celulose Bacteriana  
Florianópolis. UFSC, Centro Tecnológico, 2011, 82p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa  
de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Luismar Marques Porto, *PhD* (EQA-UFSC)

Coorientadora: Profa. Dra. Derce de O. S. Recouvreux (CEM-UFSC)

Coorientadora: Dra. Janice Koepp (FMC-UFSC)

1. *Gluconacetobacter hansenii* 2. Celulose bacteriana 3. Fibronectina  
4. Poli-L-lisina 5. Laminina 6. Engenharia de tecidos

**Avaliação da viabilidade e da integração de células do gânglio da raiz dorsal em hidrogéis de celulose bacteriana**

Por

**Gisele Volpato de Souza**

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
**Orientador**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Derce de Oliveira Souza Recouvreur  
**co-orientadora**

---

Dr<sup>a</sup>. Janice Koepf  
**co-orientadora**

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cintia Soares

---

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo

---

Prof. Dr. Paulo Fernando Dias

**Florianópolis, 16 de dezembro de 2011**



Dedico este trabalho aos meus pais, Cilésio e Ivone (*in memoriam*),  
a minha irmã Ivanise (*in memoriam*) e ao meu irmão Vitor.  
Em especial ao meu companheiro Marcelo, por todo amor, compreensão  
e carinho dedicados neste momento tão importante.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Luismar Marques Porto, pela oportunidade de ingressar numa área tão fascinante e pelos conhecimentos transmitidos.

À Professora Derce de Oliveira Souza Recouvreux e a Janice Koepp agradeço pelo orientação, paciência, dedicação, amizade, atenção e por todos os conhecimentos transmitidos.

Agradecimentos em especial a Lara Cledes Assis pelo companheirismo e pela incansável ajuda na realização deste trabalho. A sua parceria foi essencial. Sempre me lembrarei de você com muito carinho.

A todos os colegas do Intelab, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

À Professora Andrea Gonçalves Trentin e à doutoranda Fernanda Melo do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual pela ajuda prestada.

Aos Professores Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e Giles Alexander Rae pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Professora Regina Vasconcellos Antônio pela oportunidade de realizar o estágio obrigatório sobre sua supervisão e orientação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da UFSC agradeço pelos conhecimentos transmitidos. Especial agradecimento ao Edevilson, sempre prestativo e nos atendendo com muita atenção e carinho.

Aos meus pais, Cilésio e Ivone (*in memoriam*), aos meus irmãos, Vítor e Ivanise (*in memoriam*), ao meu companheiro, Marcelo, agradeço por todo amor e carinho com que me apoiaram.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

E, finalmente, ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pelo suporte técnico, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.



## RESUMO

A utilização de materiais hidrogéis poliméricos visando ancorar células e promover a regeneração neuronal é uma abordagem atual e promissora. Neste sentido, o estudo da viabilidade e interação de células neuronais nesses biomateriais é de grande importância para engenharia de tecido neuronal. A interação das células com o material arcabouço pode definir o sucesso da formação do novo tecido. Neste trabalho foram avaliadas a viabilidade e a interação de células de gânglios da raiz dorsal de ratos Wistar em arcabouço hidrogel baseado em celulose bacteriana. Utilizou-se hidrogel de celulose bacteriana modificado com fibronectina e poli-L-lisina/laminina como arcabouço para o cultivo celular com o objetivo de avaliar a viabilidade e interação celular *in vitro*. Os resultados evidenciaram que houve interação entre as células e o arcabouço e que as mesmas se mantiveram viáveis e não apresentaram citotoxicidade para células neuronais, sendo que o hidrogel de superfície modificada composto de CB e poli-L-lisina/laminina manteve o maior número de células viáveis. Também, a adsorção de fibronectina e poli-L-lisina/lamina aumentou a adesão e a interação celular ao biomaterial e o tratamento enzimático hidrogel composto de CB-PL (CB-PL injetável) não apresentou citotoxicidade. No entanto ocorreu uma diminuição na viabilidade celular quando comparado ao biomaterial CB-PL sem tratamento enzimático. Portanto, o hidrogel de celulose bacteriana modificada com poli-L-lisina/laminina se apresenta como um biomaterial promissor para promover a regeneração de tecidos neurais uma vez que os mesmos potencializam a adesão celular e aumentam a sobrevida neuronal.

**Palavras-chave:** Engenharia de tecido neuronal, gânglio da raiz dorsal (GRD), viabilidade celular, hidrogel de celulose bacteriana.



## ABSTRACT

The use of polymeric hydrogel materials to anchor cells and to promote the neuronal regeneration is a promising current approach. In this way, the study of viability and interaction neuronal cells in these biomaterials is of great importance for neuronal tissue engineering. The cell interactions with the material scaffold can define the success of the new tissue formation. In this work was assessed the viability and interaction of ganglion cells of Wistar rat dorsal roots, hydrogel scaffold based in bacterial cellulose. It was used modified bacterial cellulose with fibronectin and poli-L-lisina/lamina as scaffold for cell culture, aiming to assess the cellular viability and interaction *in vitro*. The results showed that there was interaction between cells and scaffold and that ones were viable and did not present cytotoxicity for neuronal cells, being that the modified surface hydrogel composed of CB and poli-L-lisina/lamina kept the highest number of viable cells. The absorption of fibronectin and poli-L-lisina/lamina also increased the cell adhesion and interaction to the biomaterial and the hydrogel enzymatic treatment compound of CD-PL (injected CB-PL) did not present cytotoxicity, however, occurred a decrease in the cell viability when compared to CB-PL biomaterial without enzymatic treatment. Therefore, the hydrogel of modified bacterial cellulose with poli-lisina/lamina present as a prosperous biomaterial to promote neuronal tissue regeneration, since they potentiate cell adhesion and increase the neuronal survival.

Keywords: Neural tissue engineering, dorsal root ganglion (DRG), cell viability, bacterial cellulose hydrogel.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	Becton Dickinson
CB	Celulose bacteriana
CB-FN	Celulose bacteriana-fibronectina
CB-PL	Celulose bacteriana-poli-L-lisina-laminina
CB-PLi	Celulose bacteriana-poli-L-lisina-laminina injetável
CCT	Coleção de culturas tropicais
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Meio de Earle Modificado por Dulbecco</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HMDS	Hexametildisilazane
ISSO	<i>International Standart Society Organization</i>
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
NGF	Fator de crescimento do nervo
NSCISC	<i>National Spinal Cord Injury Stastistical Center</i>
PBS	Tampão fosfato salina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
2D	Dois dimensões
3D	Três dimensões



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática demonstrando os principais elementos anatômicos da medula espinal .....	25
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática demonstrando as principais vias de transmissão da informação nervosa na medula espinal .....	28
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática demonstrando os danos nas vias de transmissão da informação nervosa em lesões na medula espinal .....	29
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da celulose, mostrando as ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas e as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias de celulose .....	34
<b>Figura 5</b> - Aplicações da celulose bacteriana na área biomédica ...	36
<b>Figura 6</b> - Representação da obtenção do biomaterial de celulose bacteriana .....	47
<b>Figura 7</b> - Micrografias de MEV da superfície dos biomateriais CB, CB-FN e CB-PL com ampliações de 1500 e 3000 $\times$ .....	48
<b>Figura 8</b> - Avaliação da viabilidade de neurônios em função do tempo .....	49
<b>Figura 9</b> - Fotografias de neurônios cultivados em placas 2D .....	50
<b>Figura 10</b> - Evidência imunocitoquímica da presença de células neurônais no cultivo de células do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos em placa 2D .....	51
<b>Figura 11</b> - Viabilidade celular das culturas de células neuronais do gânglio da raiz dorsal de ratos (RGD) cultivados em placa 2D, biomaterial CB, CB-FN, CB-PL e BD Puramatrix <sup>®</sup> por um período de 24, 48, 72 e 96 horas .....	53
<b>Figura 12</b> - Comparação da viabilidade celular apresentada pelos biomateriais CB, CB-FN, CB-PL e BD Puramatrix nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h de cultivo .....	53
<b>Figura 13</b> - Micrografias obtidas por MEV da superfície de diferentes biomateriais .....	54
<b>Figura 14</b> - Análise da interiorização das células neuronais cultivadas durante 24 h sobre CB ou CB-FN .....	55
<b>Figura 15</b> - Imagens obtidas por microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial CB .....	56
<b>Figura 16</b> - Imagens obtidas por microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial CB-FN .....	57
<b>Figura 17</b> - Imagens obtidas através de microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial CB-PL .....	58

<b>Figura 18</b> - Imagens obtidas por microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial BD Puramatrix® .....	59
<b>Figura 19</b> - Micrografias obtidas por MEV do hidrogel injetável de celulose bacteriana, poli-L-Lisina e laminina (CB-PLi) .....	60
<b>Figura 20</b> - Viabilidade de células de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos (RGD) cultivados no controle 2D, CB-PL e CB-PLi utilizando o método MTT, com leituras nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h .....	61
<b>Figura 21</b> - Comparação entre viabilidade celular entre os biomateriais CB, CB-FN, CB-PL, BD Puramatrix® e CB-PLi mostrado no gráfico representativo dos valores de absorbância obtidos para cada grupo .....	61
<b>Figura 22</b> - Comparação da viabilidade celular de células de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos (RGD) cultivados sobre os biomateriais CB, CB-FN, CB-PL, BD Puramatrix® e CB-PLi por um período de 24, 48, 72 ou 96h .....	62
<b>Figura 23</b> - Imagens obtidas através de microscópio invertido de fluorescência, de cultivos celulares em CB-PLi .....	63
<b>Figura 24</b> - Esquema ilustrando a diferença entre o arranjo espacial de culturas celulares em monocamadas (2D) e em dimensões (3D) .....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Anticorpos primários utilizados para os diferentes tipos celulares analisados .....	44
<b>Tabela 2</b> - Relação dos anticorpos secundários utilizados .....	45



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>1.1 Justificativa</b> .....	23
<b>1.2 Sistema nervoso central: a medula espinhal</b> .....	24
1.2.1 <i>Fisiopatologia da medula espinhal</i> .....	27
1.2.2 <i>Lesão traumática da medula espinhal</i> .....	29
<b>1.3 Estratégias não farmacológicas para regeneração do tecido neuronal</b> .....	31
<b>1.4 Celulose bacteriana: um arcabouço hidrogel para engenharia de tecido neuronal</b> .....	33
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	37
2.1 <b>Objetivo geral</b> .....	37
2.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	37
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
<b>3.1 Produção dos biomateriais</b> .....	39
3.1.1 <i>Hidrogel de celulose bacteriana</i> .....	39
3.1.2 <i>Hidrogel de celulose bacteriana com superfície modificada</i> ..	39
<u>3.1.2.1 <i>Adsorção de fibronectina</i></u> .....	39
<u>3.1.2.2 <i>Adsorção de poli-L-lisina e laminina</i></u> .....	40
3.1.3 <i>Hidrogel de peptídeos BD™ PURAMATRIX™</i> .....	40
3.1.4 <i>Hidrogel injetável</i> .....	40
<b>3.2 Caracterização dos biomateriais</b> .....	41
<b>3.3 Cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos adultos</b> .....	41
<b>3.4 Análise da citotoxicidade <i>in vitro</i></b> .....	42
<b>3.5 Ensaio de adesão celular</b> .....	43
<b>3.6 Identificação e morfologia celular</b> .....	43
<b>3.7 Análise estatística</b> .....	45
<b>4 RESULTADOS</b> .....	47
<b>4.1 Produção e caracterização dos biomateriais</b> .....	47
<b>4.2 Avaliação do tempo de sobrevivência de células do gânglio da raiz dorsal de ratos cultivados em ambiente bidimensional (2D)</b> .....	48
<b>4.3 Análise da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos biomateriais CB, CB-FN e CB-PL</b> .....	52
<b>4.4 Hidrogel injetável baseado em CB (CB-PLi)</b> .....	59
4.4.1 <i>Caracterização do hidrogel injetável CB-PLi</i> .....	60
4.4.2 <i>Crescimento e viabilidade celular</i> .....	60

<i>4.4.3 Identificação celular</i> .....	<b>62</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativa

Ênfase tem sido dada às lesões traumáticas da medula espinhal, por ser uma das mais devastadoras entre as lesões que podem afetar o ser humano, pois apresenta limitada ou nenhuma recuperação neurológica.

Mundialmente, a taxa de incidência de lesões na medula espinhal é de 22 ocorrências por milhão de habitantes (ROSSIGNOL et al., 2007). No Brasil, há cerca de 250.000 pacientes com esta condição, somando-se aproximadamente nove mil novos casos por ano (MEYER et al., 2003).

A intervenção clínica atual se restringe, essencialmente, na estabilização da coluna vertebral, restauração do alinhamento e descompressão da medula espinhal e no uso de doses altas de metilprednisolona, administrada até oito horas após a lesão da medula espinhal (para revisão ver THURET; MOON; GAGE, 2006).

No entanto, embora os estudos pré-clínicos e clínicos sejam promissores, o avanço das pesquisas é limitado devido à ausência de interação célula-célula, ou seja, falta de matriz extracelular no sítio de lesão e conseqüente limitação da diferenciação e atividade celular. Uma das estratégias não farmacológicas promissoras para a regeneração do tecido neural tem sido a utilização de arcabouços tridimensionais, que podem mimetizar uma matriz extracelular fornecendo sítios de ancoragem e diferenciação celular essencial para a regeneração axonal e conseqüente restauração de funções (para revisão ver SAMADIKUCHAKSARAEI, 2007).

A versatilidade dos materiais compostos por celulose bacteriana é marcada por características como a disponibilidade, biocompatibilidade, resistência e fácil produção desses biopolímeros favorecem sua utilização na engenharia de tecidos e na área biomédica. Além disso, áreas promissoras e que necessitam de estudos é a associação com fármacos, com compostos bioativos ou com outros biopolímeros, além de estudos de sua produção em larga escala (CZAJA et al., 2006; CZAJA et al., 2007; RECOUVREUX, 2008; FERREIRA et al., 2010).

Para que um novo material possa ser utilizado em aplicações biomédicas exige-se uma avaliação completa de possíveis danos que possam vir a causar em organismos vivos. Desta forma, torna-se extremamente necessária avaliar a toxicidade e a biocompatibilidade, e o desempenho do material em meios biológicos.

Até o momento, não existem relatos na literatura de estudos de biomateriais baseados em nanofibras de celulose bacteriana, com superfície modificada, utilizados em estudos de regeneração de tecido neural de animais submetidos a lesões da medula espinal.

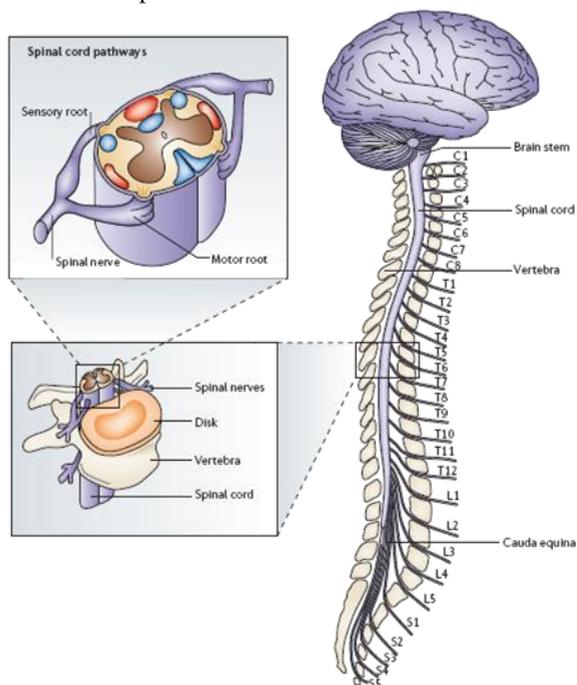
Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da viabilidade e da interação de células de gânglios da raiz dorsal em arcabouços de celulose bacteriana modificada pela adsorção de fibronectina e poli-L-lisina/laminina, atuando, portanto como suporte estrutural. Aos biomateriais produzidos e caracterizados neste estudo pretende-se, em um futuro próximo implantá-los na medula espinal de ratos submetidos ao trauma raquimedular, visando o favorecimento da regeneração do tecido neuronal danificado e consequente recuperação funcional destes animais.

## **1.2 Sistema nervoso central: a medula espinal**

O sistema nervoso central é formado pelo encéfalo e pela medula espinal os quais apresentam independência funcional, embora estejam intimamente relacionados. A medula espinal é uma massa cilíndrica de tecido nervoso, ligeiramente achatada no sentido antero-posterior, situada na parte posterior do neuroeixo, dentro do canal vertebral sem, entretanto, ocupá-lo completamente. Seu calibre não é uniforme, pois apresenta duas dilatações denominadas intumescências cervical e lombar, as quais se relacionam com os membros superiores e inferiores, respectivamente. No homem adulto a medula espinal possui aproximadamente 45 centímetros de comprimento, sendo um pouco menor na mulher. Cranialmente a medula limita-se com o bulbo, aproximadamente ao nível do forame magno do osso occipital. O limite caudal, no adulto, situa-se entre as vértebras lombares L1 e L2. A medula não está presente abaixo do nível vertebral L1. Portanto, os axônios possuem raízes longas que vão do término da medula espinal até a saída na coluna vertebral lombossacra, formando, dentro do canal vertebral inferior, a chamada cauda equina (LUNDY-EKMAN, 2008, MACHADO, 2005). Uma característica importante da medula espinal é a sua organização segmentar. Cada segmento da medula se liga a uma região específica do corpo por axônios, que seguem por um par de nervos espinhais. Assim, da medula partem 31 pares de nervos espinhais, sendo 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares e 6 sacrais. Todos fazem parte do sistema nervoso periférico e emergem da medula espinal por meio de espaços existentes entre cada vértebra da coluna vertebral, como pode ser observado na Figura 1. Por meio dessa rede de

nervos, a medula espinhal se conecta com o restante do corpo, recebendo sinais provenientes da periferia em direção ao encéfalo, ou a partir do encéfalo em direção ao corpo. A medula possui dois sistemas de neurônios: o sistema descendente, que controla a função motora dos músculos, regula a pressão arterial e temperatura, transporta sinais originados no cérebro até seu destino na periferia, e o sistema ascendente, que transporta os sinais sensoriais da periferia até a medula, e então, até o cérebro (MARTINI, 1992; LUNDY-EKMAN, 2008).

**Figura 1** - Representação esquemática demonstrando os principais elementos anatômicos da medula espinhal.



FONTE: Thuret et al. (2006).

Relativo à estrutura interna da medula, em toda a medula espinhal, a substância branca circunda a substância cinzenta. A substância branca contém colunas de axônios que ligam os diversos níveis da medula espinhal e que ligam a medula ao encéfalo. Dessa maneira, os feixes axonais que seguem ao longo da superfície dorsal, ventral ou lateral da substância branca formam a coluna dorsal, ventral e lateral, respectivamente (GUYTON; HALL, 2006; MARTINI, 1992). As

colunas dorsal e lateral da substância branca contêm axônios das células dos tratos, transmitindo informações sensoriais acima até o encéfalo. A substância branca lateral e anterior contêm axônios de neurônios motores superiores, que transmitem informações descendentes do encéfalo para interneurônios e neurônios motores inferiores. Na parte central da medula espinhal encontra-se um tecido nervoso constituído de interneurônios espinhais, dendritos e corpos de células dos tratos, denominada de substância cinzenta que, por sua vez, apresenta uma forma da letra H ou borboleta (em destaque na Figura 1), dividindo-se em cornos dorsal, lateral e ventral (MACHADO, 2005).

Toda informação sensorial proveniente da pele, músculos, tendões e vísceras, chega ao sistema nervoso central (SNC) pelos neurônios sensoriais, cujos corpos estão nos gânglios da raiz dorsal (GRD) que, por sua vez, estão junto ao SNC, entretanto, sem penetrar nele. Estes neurônios possuem morfologia pseudo-unipolar e formam um axônio que se bifurca a pouca distância do neurosoma. O ramo periférico segue pelos nervos espinhais para a periferia até o terminal sensorial. O ramo central segue pela raiz dorsal até a medula espinhal, onde forma sinapses com neurônios ali presentes, ou prossegue pela medula até o bulbo. O neurosoma é desprovido de dendritos e aferências sinápticas. Isso garante que toda a informação que trafega pelo axônio seja proveniente exclusivamente da terminação sensorial que ele se forma. Os corpos dos neurônios não estão em contato franco com o espaço extracelular do gânglio, pois estão envolvidos por delgadas células gliais (BATISTA, 2008).

Tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico, os neurônios relacionam-se com células coletivamente denominadas neuroglia, glia ou gliócitos. São as células mais frequentes do sistema nervoso, podendo a proporção entre neurônios e células gliais variar de 1:10 a 1:50 (MACHADO, 2005). Na substância branca e substância cinzenta as células gliais formam uma rede de sustentação dos neurônios. As grandes células gliais são denominadas macróglia e nesta categoria encontram-se três grupos celulares: astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann. Os astrócitos possuem forma estrelada, são encontradas em todo sistema nervoso central, participam da sinalização celular e desempenham função nutritiva ao ligar neurônios e capilares sanguíneos. Oligodendrócitos e células de Schwann formam uma cobertura protetora composta de lipídeos e proteínas, designada como bainha de mielina, onde a mielina é um isolante que protege os neurônios do ambiente extracelular. Os neurônios do SNC são mielinizados por oligodendrócitos, enquanto que

as células de Schwann mielinizam os neurônios do sistema nervoso periférico. As pequenas células gliais, chamadas de micróglias, funcionam normalmente como fagócitos e agem como o sistema imunológico do SNC, sendo ativadas no processo de desenvolvimento cerebral e após uma lesão, infecção ou doença (LUNDY-EKMAN, 2008; MACHADO, 2005).

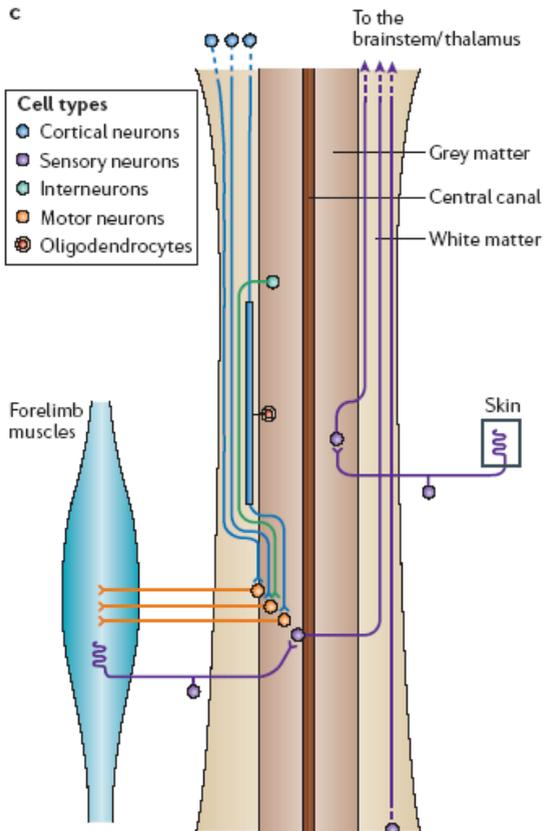
Por fim, o conjunto formado pela coluna vertebral, os ligamentos, tendões e músculos circundantes isolam a medula espinhal do ambiente externo. Além disso, o tecido neural também precisa ser protegido contra as paredes ósseas da coluna. Para isso, membranas fibrosas especializadas denominadas meninges – dura-máter, aracnóide e pia-máter – são responsáveis por fornecer a estabilidade física e amortecimento de impacto, além de nutrientes e oxigênio que chegam através de vasos sanguíneos que brotam dentro dessas camadas (MARTINI, 1992; LUNDY-EKMAN, 2008; MACHADO, 2005).

### *1.2.1 Fisiopatologia da medula espinhal*

É comum considerarmos a medula espinhal como sendo apenas uma via de transmissão da informação nervosa, cujo objetivo é enviar impulsos sensoriais oriundos de receptores periféricos ao encéfalo e trazer, a partir dele, impulsos direcionados a órgãos efetadores e também periféricos. Porém, as funções da medula espinhal são bem mais complexas do que a simples condução de informações. Somente para um tipo de informação a medula espinhal serve como um simples condutor, a citar, os axônios, que levam informações táteis e proprioceptivas, entram na coluna dorsal e fazem projeção para o bulbo sem fazer sinapse. Todos os outros tratos que transmitem informações fazem sinapse na medula e, portanto, elas estão sujeitas a processamentos e modificação dentro da medula espinhal (Figura 2)

Então, o controle fisiológico das funções motoras, sensoriais e autonômicas requer vias neurais intactas (GUYTON; HALL, 2006). Assim, lesões na região medular (Figura 3) interferem na função da medula espinhal, tais como alterações do desenvolvimento, lesões das raízes nervosas dorsais e ventrais, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, acidentes vasculares, síndrome pós-poliomielite, tumores da região medular, lesões traumáticas da medula espinhal, entre outros, podem interferir na função segmentar, dos tratos ou ambos (LUNDY-EKMAN, 2008).

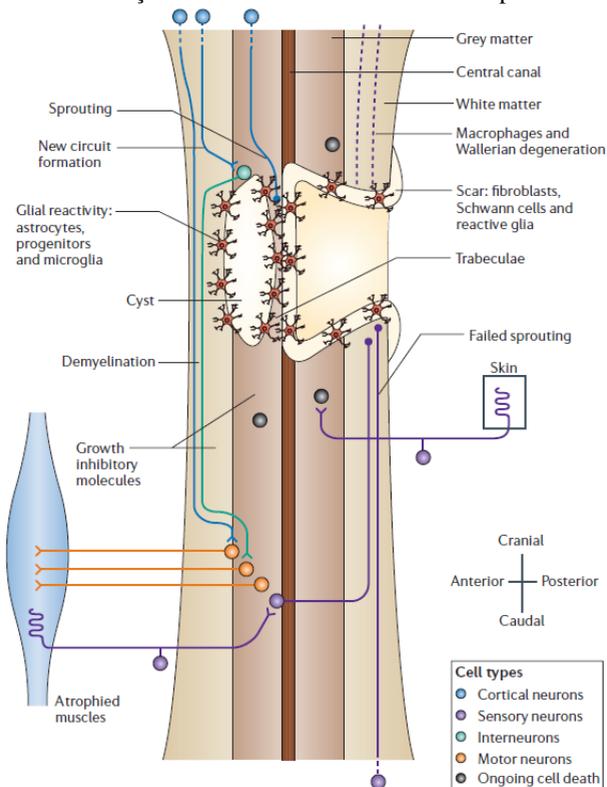
**Figura 2** - Representação esquemática demonstrando as principais vias de transmissão da informação nervosa na medula espinhal.



FONTE: Thuret et al. (2006).

No contexto do presente estudo demos ênfase às lesões traumáticas da medula espinhal, uma das mais devastadoras entre as lesões que podem afetar o ser humano, pois apresenta limitada ou nenhuma recuperação neurológica (para revisão ver THURET et al., 2006).

**Figura 3** - Representação esquemática demonstrando os danos nas vias de transmissão da informação nervosa em lesões na medula espinhal.



FONTE: Thuret et al. (2006).

### 1.2.2 Lesão traumática da medula espinhal

Segundo estimativa do National Spinal Cord Injury Statistical Center (NSCISC) a lesão medular ocorre em cerca de 20% das fraturas da coluna vertebral, e 10 a 15% dos pacientes apresentam dano neurológico severo com grande morbidade (NSCISC, 2009). Esta patologia representa um grande problema socioeconômico devido a essa elevada incidência e os custos envolvidos no diagnóstico, tratamento, reabilitação e suporte dos pacientes. Segundo relatório do NSCISC de 2009, a lesão é mais frequente no sexo masculino, representando 80% dos casos, sendo os adultos na faixa etária de 14 a 40 anos os mais atingidos. Os acidentes automobilísticos são as principais causas dessas

lesões, seguido por quedas de alturas, ferimentos com armas de fogo e traumatismos esportivos, entre os quais se destaca o mergulho em águas rasas.

A metilprednisolona tem a capacidade de atenuar a resposta inflamatória medular que se segue à lesão primária, reduzir a peroxidação lipídica e preservar a integridade das estruturas neuronais. Porém, como há inclusive estudos clínicos que contestam a eficácia do tratamento com o corticóide em promover melhoras nestes quadros, a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes tem sido intensa (para revisão ver KWON et al., 2004).

Atualmente, sabe-se que o déficit neurológico decorrente da lesão traumática da medula espinhal advém da somatória de dois eventos distintos: a lesão mecânica inicial e a lesão endógena secundária. A lesão primária é produzida pelo trauma em si, com liberação de eletrólitos, produção de metabólitos, ativação de enzimas e morte celular, sendo, portanto, um processo mecânico que independe de controle celular. A lesão secundária envolve complexas mudanças bioquímicas, surgindo como uma cascata de eventos envolvendo edema, inflamação, isquemia, reperfusão, peroxidação lipídica e apoptose (para revisão ver HULSEBOSCH, 2002). Assim, os avanços no entendimento da patofisiologia do trauma raquimedular têm conduzido a diversos estudos clínicos de fase I e II. Entre eles, estuda-se a eficácia do tratamento com metilprednisolona e de outros agentes farmacológicos, de intervenções, tais como a descompressão cirúrgica precoce, estimulação elétrica de campo, estratégias de neuroproteção como riluzole e minociclina, inativação de fatores inibitórios de regeneração e o transplante de vários substratos celulares na medula espinhal lesada (para revisão ver HAWRYLUK et al., 2008; GISZTER 2008).

No entanto, embora os estudos pré-clínicos e clínicos sejam promissores, o avanço das pesquisas é limitado devido à ausência de interação célula-célula, ou seja, falta de matriz extracelular no sítio de lesão e consequente limitação da diferenciação e atividade celular. Uma das estratégias não farmacológicas promissoras para a regeneração do tecido neural tem sido a utilização de arcabouços tridimensionais, os quais podem mimetizar uma matriz extracelular fornecendo sítios de ancoragem e diferenciação celular essencial para a regeneração axonal e consequente restauração de funções (para revisão ver SAMADIKUCHAKSARAEI, 2007).

### **1.3 Estratégias não farmacológicas para regeneração do tecido neuronal**

A lesão da medula espinhal conduz frequentemente à perda significativa de tecido nervoso. Diferentes abordagens têm sido utilizadas visando reconstruir a medula espinhal lesada. O uso de fatores de crescimento, através de administração exógena (LU et al., 2004) ou pela introdução de implantes contendo esses fatores (HOULE; ZIEGLER, 1994; MEIJS et al., 2004), além de células geneticamente engenhas (LOH et al., 2001; RUITENBERG et al., 2005) tem sido utilizado, porém com sucesso limitado. Outra abordagem utilizada tem sido o implante de células de diferentes fontes diretamente no sítio da lesão. No entanto, a grande desvantagem desta abordagem refere-se ao tempo de permanência das células no local lesionado, uma vez que elas tendem a migrar para as regiões vizinhas (ROCKIND et al., 2006).

Portanto, a abordagem mais promissora para promover a regeneração neuronal após a lesão medular inclui a construção de pontes funcionais, arcabouços para ancorar as células implantadas, que estejam embebidos em meio adesivo viscoso e suplementados com uma variedade de fatores tróficos (GELLER; FAWCETT, 2002; ROCKIND et al., 2006).

No contexto acima, a Engenharia de Tecidos vem se destacando como sendo um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem funções de um tecido ou de um órgão (LANGER; VACANTI, 1993; WINTERMANTEL et al., 1997). Atualmente, exemplos típicos são aplicações que visam possibilitar o desenvolvimento de um tecido, a partir de células específicas, em arcabouços constituídos de materiais poliméricos biodegradáveis e bioabsorvíveis, revestidos com compostos bioativos. Esses arcabouços atuam como suportes estruturais temporários para o crescimento de novos tecidos (DONG, 2009; TUZLAKOGLU, 2009).

Os recentes avanços na área de biomateriais e suas aplicações em áreas médicas mostram o grande potencial de vários polímeros no desenvolvimento de novas classes de biomateriais que possam guiar a regeneração neuronal. Os suportes e moldes para o desenvolvimento celular (arcabouços) constituídos por uma rede tridimensional de nanofibras, com morfologia e diâmetros de fibras em uma escala comparável com aquelas encontradas na matriz extracelular do tecido nervoso, tem mostrado fornecer um ambiente mais adequado para a migração, proliferação e diferenciação das células neuronais, quando

comparado com ambiente bidimensional tradicional (MARTINS et al., 2007). Neste contexto, dentre os biomateriais compostos de uma rede tridimensional de nanofibras, podemos citar a celulose bacteriana como uma das classes de polímeros mais promissores em fornecer um ambiente favorável à regeneração neuronal.

O sucesso de um arcabouço para engenharia de tecido depende das propriedades de superfície que promovam a interação célula-material. Modificações da superfície dos materiais, utilizados no desenvolvimento de arcabouços, têm sido utilizadas como estratégia para regular essa interação.

Fundamentalmente, arcabouços para engenharia tecidual devem fornecer: suporte mecânico para a reposição e regeneração do tecido, um ambiente que favoreça a interação, proliferação e diferenciação celular e ainda, uma matriz permeável que permita difusão de nutrientes, gases e metabolitos (SERPOOSHAN et al., 2010).

Polímeros que são frequentemente utilizados para engenharia de tecido são: poli(a-hidroxiesters), poliortoesters, polianidridos, polidioxanona e alguns poliuretanos. No entanto, não é facilmente obtido o equilíbrio entre a degradação e a regeneração do tecido, a rápida degradação pode levar à perda da estabilidade, distorção e perda tecidual. Além disso, há a preocupação com possíveis efeitos tóxicos dos produtos de degradação, apesar de que o polímero por si não se apresenta tóxico. Os polímeros não degradáveis oferecem uma melhor resistência estrutural, porém estes materiais se apresentam como um corpo estranho após a implantação, podendo provocar uma reação inflamatória. O emprego de biopolímeros como alginato, colágeno, ácido hialurônico e outros tem demonstrado excelente biocompatibilidade, mas seu uso é limitado por apresentarem baixas propriedades mecânicas (ZANETTA et al., 2009).

Dessa forma, os hidrogéis poliméricos oferecem uma excelente oportunidade para engenharia tecidual, tendo em vista que eles mimetizam a condição *in vivo* para o desenvolvimento celular. Assim, arcabouços hidrogéis, constituídos de hidrogel celulose bacteriana (CB) vem sendo amplamente estudados para diversas aplicações de engenharia de tecidos.

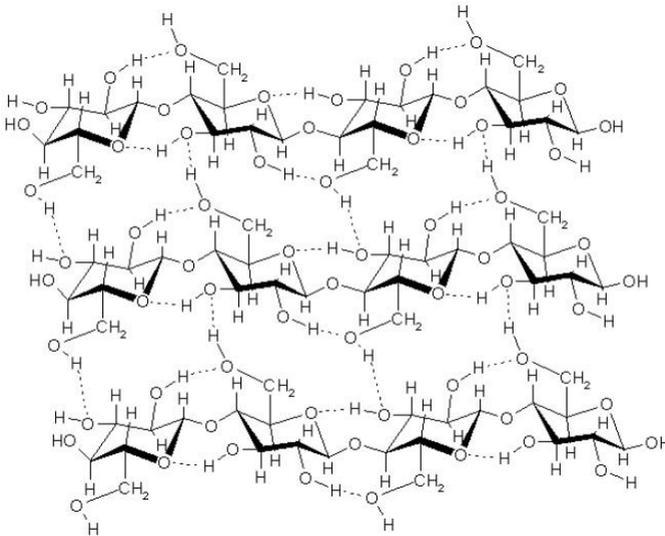
Por outro lado, a fibronectina, proteínas da matriz extracelular, e a polilisina, um homopolímero natural, e laminina, uma glicoproteína, apresentam-se como alternativas para modificar a superfície dos hidrogéis e melhor promover a interação celular, medida pelas integrinas (RICHTER et al., 2010; MARTYN et al., 2010).

## 1.4 Celulose bacteriana: um arcabouço hidrogel para engenharia de tecido neuronal

A celulose é um polímero formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de  $\beta$ -D-glicose, unidas por ligação do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  glicosídicas. Cada resíduo de glicose está rotacionado aproximadamente  $180^\circ$  em relação ao resíduo vizinho. A unidade estrutural de repetição da molécula de celulose é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose. A cadeia glicana pode ter de 2000 a mais de 25000 resíduos de glicose. Na natureza, a celulose não existe como uma única cadeia. As moléculas longas e rígidas de celulose combinam-se para formar microfibrilas, cada uma consistindo de várias cadeias de celulose. Essas cadeias, que compõem a microfibrila, estão orientadas paralelamente, formando ligações de hidrogênio intermolecular (entre unidades de glicose de moléculas de celulose adjacentes) e intramolecular (entre unidades de glicose da mesma molécula de celulose) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), como pode ser verificado na Figura 4.

A celulose forma a base estrutural da parede celular de plantas e também é produzida por outros organismos como algas, fungos e algumas bactérias (CANNON; ANDERSON, 1991; ROSS et al. 1991; BROWN, 1886). Dentre as espécies bacterianas encontradas as *Glucoacetobacter* foram utilizadas em estudos que padronizaram e investigaram a produção de celulose em laboratório. As bactérias da espécie *Glucoacetobacter* são bactérias Gram-negativas, e assim como os membros da família Acetobacteraceae, são estritamente aeróbicas e muito utilizadas na indústria de produção de vinagre (GARRITY; BOONE, 1984). Essas bactérias têm a capacidade de utilizar diversos substratos carbônicos como frutose, maltose, manitol, sacarose, glicerol, lactose e glicose para a síntese da celulose. As condições ótimas para a produção de celulose foram: 2% de glicose, pH entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre  $25^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ , sendo amplamente utilizadas até os dias atuais (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

**Figura 4** - Estrutura química da celulose, mostrando as ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  glicosídicas e as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias de celulose.



FONTE: Recouvreur (2008).

A celulose sintetizada por bactérias possui a mesma estrutura química da celulose sintetizada por plantas, porém com propriedades físicas e mecânicas únicas, não apresentadas por outros biomateriais. A celulose produzida pelas bactérias *Gluconacetobacter* é altamente pura e uniforme, sendo obtida na forma de um hidrogel natural o qual possui grande capacidade de retenção de líquidos, com mais de 95% de água na sua composição e biocompatibilidade elevada, propriedades estas importantes para aplicações médicas. Enquanto a celulose sintetizada por plantas necessita de processos de purificação complexos, dispendiosos e altamente poluentes para a extração da lignina e da hemicelulose, a obtenção de celulose bacteriana é bastante simples não envolvendo processos poluentes (BROWN JR., 1999).

A CB, por sua estrutura nanométrica diferenciada da celulose vegetal, é utilizada como molde para preparação de novos materiais com aplicações desde a fotônica, como suporte para telas eletroluminescentes, até a medicina como curativos (FONTANA et al., 1990; SIQUEIRA; MORESCHI, 2000). Na indústria alimentícia ela é utilizada na produção de nata de coco, sorvetes de baixas calorias, aperitivos, doces, espessantes e soro para redução do colesterol. Na indústria de cosméticos a CB é utilizada como hidratantes e

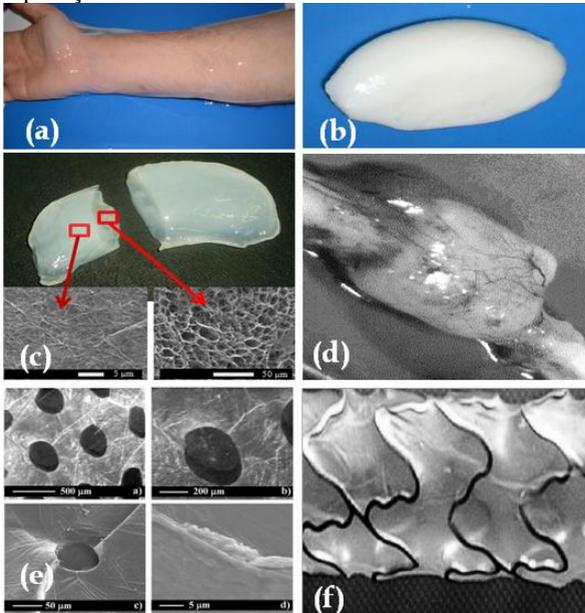
adstringentes. Em empresas de aparelhos eletroacústicos ela é utilizada como membrana para aparelhos de áudio de alta qualidade. A CB é utilizada ainda para membrana de célula combustível (hidrogênio), aditivo para papel de alta qualidade e papel eletrônico (*e-paper*) (BROWN JR., 1998).

Nas últimas décadas a celulose bacteriana tem despertado grande interesse como biomaterial para uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo substituto temporário da pele para recuperação de ferimentos e queimaduras, recuperação da gengiva (FONTANA et al., 1990; MELLO et al., 2001; CZAJA et al., 2006; CZAJA et al., 2007), produção de vasos sanguíneos, recuperação da dura-máter, revestimento de *stents* (malha de aço colocada dentro dos vasos para promover a sua desobstrução) e recuperação de nervos (KLEMM et al., 2001), potencial uso para engenharia de tecido cartilaginoso (SVENSSON et al., 2005). A Figura 5 mostra algumas aplicações da CB na área biomédica.

Klemm et al (2006) implantaram tubos constituídos de celulose bacteriana no nervo ciático lesionado de ratos. Após um período de observação de 4 a 26 semanas o tubo foi recoberto por um tecido conectivo e por pequenos vasos sanguíneos que cresceram no seu interior. De forma importante, nenhuma reação inflamatória foi observada ou ainda o encapsulamento do implante. Já as funções do nervo foram melhoradas após 10 semanas, quando comparado a um nervo lesionado sem a cobertura de celulose bacteriana. Os resultados demonstraram um processo de integração sem degradação (KLEMM et al., 2001; KLEMM et al., 2006).

A avaliação *in vivo* da biocompatibilidade da CB mostrou que ela possui excelente integração com o tecido vivo e não apresentou reação inflamatória crônica (HELENIUS et al., 2006). Culturas de células musculares lisas utilizando CB como *scaffolds* mostraram que estas se aderem e proliferam permitindo a formação de uma camada confluenta no lado luminal dos canais de CB (BACKDAHL et al., 2006).

**Figura 5** - Aplicações da celulose bacteriana na área biomédica.



NOTA: (a) CB com acemanana para regeneração da pele; (b) CB com hidroxiapatita para regeneração óssea; (c) CB para órgão artificial (RECOUVREUX, 2008); (d) CB para regeneração de nervos (KLEMM et al., 2001; KLEMM et al., 2006); (e) controle da porosidade de CB (RAMBO et al., 2007) e (f) CB como revestimento de *stents* (NEGRÃO et al., 2006).

FONTE: Souza (2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliação da viabilidade e da interação de células de gânglios da raiz dorsal em biomateriais baseados em celulose bacteriana visando à utilização em engenharia de tecido neural.

### 2.2 Objetivos específicos

- Produção de membranas de celulose bacteriana com espessura e diâmetros pré-definidos;
- Produção de membranas de celulose bacteriana com superfície modificada através da adsorção de proteínas adesivas, entre elas a poli-L-lisina e Laminina e a fibronectina;
- Padronização da cultura primária de neurônios adultos do gânglio da raiz dorsal de ratos;
- Determinação do perfil de sobrevivência dos neurônios na presença ou ausência do fator de crescimento do Nervo – NGF;
- Avaliação da viabilidade de neurônios do gânglio da raiz dorsal cultivados sobre membranas *in natura* ou de superfície modificada;
- Avaliação o perfil de adesão e a morfologia dos neurônios cultivados sobre os diferentes biomateriais;
- Produção e caracterização de um gel injetável na medula espinhal de ratos.



## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Produção dos biomateriais

#### 3.1.1 Hidrogel de celulose bacteriana

A bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, utilizada neste estudo para a produção de CB, foi obtida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) – Fundação André Tosello (Campinas, SP). A bactéria foi cultivada em placas de 96 poços contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura composto de manitol ( $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e bactopectona ( $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Os compostos para o meio de cultivo foram diluídos em água destilada com o pH ajustado para 6,6 e esterilizados em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Ao meio de cultivo foram inoculados 5% (v/v) de inóculo obtido de uma cultura estoque. Os cultivos foram mantidos em condições estáticas, em temperatura ambiente, durante sete dias.

Os hidrogéis de CB formados na superfície do meio de cultivo foram coletados e purificados através da imersão das amostras em solução de NaOH 0,1M a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Em seguida, para permitir a eliminação de contaminantes do meio de cultivo, as amostras foram submetidas a sucessivas lavagens em água destilada tamponada.

Após a purificação, os biomateriais imersos em PBS tiveram seu pH ajustado em 7,3, autoclavados e armazenados em recipientes adequados até o seu uso .

#### 3.1.2 Hidrogel de celulose bacteriana com superfície modificada

##### 3.1.2.1 Adsorção de fibronectina

Para a obtenção de hidrogel de CB com fibronectina (CB-FN) adsorvida à superfície do biomaterial foi utilizado o método descrito por Mendonça, Thiré e Costa (2009).

Para tal, 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de fibro-nectina sérica humana ( $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluída em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 4,5) foi instilada na superfície do hidrogel de CB. Uma hora após a instilação, as amostras foram lavadas em meio de Earle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen Coporation, USA), sem soro fetal bovino, para remoção da proteína não adsorvida.

### 3.1.2.2 Adsorção de poli-L-lisina e laminina

Para a obtenção de amostras de hidrogel de CB com poli-L-lisina e laminina (CB-PL) utilizou-se o mesmo protocolo experimental descrito acima, com algumas modificações. Para tal, 2 horas após a instilação de 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de poli-L-lisina (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluído em KRH, pH 7,4) na superfície de cada hidrogel de CB e remoção do líquido excedente, um volume adicional de 25  $\mu\text{L}$  de laminina (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluído em KRH, pH 7,4) foi instilado na superfície do hidrogel e mantido por um período de 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, para remoção da proteína não adsorvida, as amostras foram lavadas em meio DMEM sem soro fetal bovino.

### *3.1.3 Hidrogel de peptídeos BD™ PURAMATRIX™*

Para a realização de cultura de células em 3D em BD™ PuraMatrix™ (BD Biosciences) como suporte foi necessária preparação prévia do material para plaqueamento de superfície.

A partir da solução concentrada de BD Puramatrix foi realizada uma diluição a 0,3% em água estéril. Essa solução foi pipetada cuidadosamente na placa de cultivo, em volume de 50  $\mu\text{L}\cdot\text{poço}^{-1}$  em placa de 96 poços. A gelificação foi promovida adicionando lentamente 150  $\mu\text{L}\cdot\text{poço}^{-1}$  de meio de cultura incompleto e incubando a 37 °C durante 60 minutos para completar a gelificação, substituindo 50% do meio duas vezes durante esse período. Após a gelificação, foi removido 2/3 do meio de cultivo sobre a superfície do BD Puramatrix e acrescido 100  $\mu\text{L}\cdot\text{poço}^{-1}$  da suspensão celular.

### *3.1.4 Hidrogel injetável*

A fim de se obter um biomaterial, composto de celulose bacteriana e poli-L-lisina e laminina passível de ser injetado diretamente na medula espinhal de ratos e com viscosidade que permitisse a passagem por uma agulha de gengival, foi realizado uma hidrólise enzimática em membranas de celulose bacteriana, através do método descrito por Recouvreux (2004), com algumas modificações.

Para tal, a cada 1 g das amostras de hidrogel de celulose bacteriana (produzidas conforme o item 3.1.1) foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de celulase (Celluclast 1.5 L – Novozymes) em 1 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,5). As amostras foram, então, incubadas em

banho-maria a 50 °C por 1 hora, centrifugadas (5000 rpm, 5 min) e o sobrenadante descartado.

Em seguida, foi realizado o procedimento de adsorção de poli-L-lisina e laminina ao hidrolisado de celulose bacteriana, conforme descrito no item 3.1.2, com algumas alterações. Resumidamente, 2 horas após a instilação de 25  $\mu\text{L.g}$  de amostra<sup>-1</sup>, de uma solução de poli-L-lisina (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  diluído em KRH, pH 7,4) no hidrolisado de CB e posterior agitação para homogeneização, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 5 min) e o líquido excedente foi removido. Em seguida, um volume adicional de 25  $\mu\text{L}$  de laminina.g de amostra<sup>-1</sup> (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  diluído em KRH, pH 7,4) foi instilado na superfície do hidrogel, agitado para homogeneizar e mantido por um período de 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 5 min) e o líquido excedente foi removido. Para remoção da proteína não adsorvida, as amostras foram lavadas em meio DMEM sem soro fetal bovino.

### **3.2 Caracterização dos biomateriais**

A microestrutura das amostras dos diferentes biomateriais produzidos foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Philips, XL-30). Para as observações por MEV, as amostras foram primeiramente desidratadas através da manutenção das amostras em estufa por um período de 48 h. Após a obtenção das amostras secas, as mesmas foram colocadas sobre um suporte de alumínio e recobertas com ouro para posterior visualização através do MEV.

### **3.3 Cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos adultos**

Os GRDs que inervam os segmentos torácicos e lombares foram isolados de ratos Wistar machos pesando entre 280 e 300 g. Para tal, após indução de eutanásia dos animais em câmara de CO<sub>2</sub> e exposição da medula espinhal, aproximadamente 15 GRDs por animal foram removidos e submetidos à digestão enzimática com papaína e colagenase. Após a digestão, 10<sup>3</sup> células neuronais/campo foram semeadas em placas de cultura 2D, ou cultura 3D contendo hidrogel de CB, CB-FN, CB-PL ou BD™ PuraMatrix™. Em seguida, adicionaram-se meio de cultivo DMEM (Invitrogen Coporation, USA), suplementado com albumina tipo IV bovino (BSA) e fator de crescimento do nervo (Nerve Grow factor – NGF; 100 ng.mL<sup>-1</sup>). O cultivo celular foi

acompanhado por um período de 12 a 96 horas através da observação em microscópio invertido (Medilux). Todas as placas de cultura 2D utilizadas neste estudo foram recobertas com 25  $\mu\text{L}\cdot\text{poço}^{-1}$  de uma solução de poli-L-Lisina (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluído em KRH, pH 7,4) por 2 horas e após a retirada do volume excedente, 25  $\mu\text{L}\cdot\text{poço}^{-1}$  uma solução de Laminina (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluído em KRH, pH 7,4) foi adicionada por 1 h e mantido em temperatura ambiente.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da UFSC (CEUA, processo n° 230080.030935/2010-53)

### 3.4 Análise da citotoxicidade *in vitro*

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Após de comprovada a sua taxa de toxicidade, é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter ou não continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO, 2003)

Portanto, foi utilizado a técnica de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide), a qual permite avaliar a viabilidade celular através da quantificação da atividade mitocondrial via formação de cristais de formazana, de coloração azul, resultante da redução dos sais tetrazólio MTT pela ação da enzima succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983). Para tal,  $10^3$  células GRDs foram semeadas sobre placas de cultura 2D (controle), ou 3D (CB, CB-FN, CB-PL e P) contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo DMEM (Invitrogen Coporation, USA) suplementado com albumina bovina tipo IV (BSA) e fator de crescimento do nervo (Nerve Grow factor – NGF; 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) seguido de incubação em atmosfera umidificada a 95% de  $\text{O}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37 °C. Após os tempos de cultivo de 24, 48, 72 ou 96 h, foi avaliado a citotoxicidade dos biomateriais através da remoção do meio de cultivo e adição de solução contendo tampão fosfato e MTT (5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluído em tampão fosfato) por um período de 2 horas. Na sequência, os cristais de formazana foram solubilizados com uma solução de dodecilsulfato de sódio e ácido clorídrico 10% por 18 horas sem agitação ou com agitação em agitador orbital a 30 °C e 2,5 Hz. Após esta etapa, 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura da

absorbância em leitora de placas (ThermoPlate - Reader) com comprimento de onda de 570 nm. Juntamente com as amostras foi realizado o branco, que é composto de meio de cultura, MTT, SDS 10% - HCl nas mesmas proporções contidas nas amostras, e incubado nas mesmas condições. A concentração dos cristais de formazana é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Os testes foram realizados em triplicata e a viabilidade celular determinada conforme a equação 1.

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Abs. das amostras} - \text{Abs. do branco}}{\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. do branco}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.5 Ensaio de adesão celular

Para determinar se os diferentes biomateriais utilizados promovem a adesão celular, as células neuronais do GRD foram semeadas ( $10^3$  células.poço<sup>-1</sup>) em placas de 96 poços que continham CB, CB-FN e CB-PL e incubadas por 24 h a 37 °C em 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, cada poço foi cuidadosamente lavado com solução PBS para remoção das células não aderentes. As células aderentes foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Philips, XL-30). Para as observações de MEV, amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e, em seguida, foram desidratadas com uma série de etanol 50% a 100% com intervalo de 10 minutos por etapa. Posteriormente, a solução de etanol 100% foi retirada e adicionada uma solução de etanol 50% e HMDS (hexametildisilazane) 50% por 10 minutos. Após essa etapa, a solução anterior foi retirada e adicionada HMDS 100% e armazenadas a temperatura ambiente até completa secagem. As amostras secas foram colocadas sobre um suporte de alumínio e recobertas com ouro para posterior visualização por MEV.

### 3.6 Identificação e morfologia celular

Para a identificação os tipos celulares e da morfologia das células, as amostras foram preparadas para avaliação microscópica eletrônica confocal e avaliação imunocitoquímica. Para tal, as células neuronais do GRD foram semeadas (103 células) em placas 3D de 96 poços que contendo CB ou CB-FN e incubadas por 24 horas a 37 °C em 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de cultivo, os biomateriais foram coletados e lavados com tampão fosfato (PBS). As células contidas no biomaterial foram fixadas com glutaraldeído 2,5%, os

núcleos foram corados com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) e observadas em microscópio confocal (Leica DMI6000HB). As imagens foram analisadas utilizando o software LAS AF Lite. A interação e interiorização celular foram avaliadas pela digitalização das imagens obtidas das células cultivadas no biomaterial, analisando do centro para a periferia, na direção z.

Para as análises imunocitoquímicas, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 1 hora e, a seguir, lavadas com solução de salina tamponada de fosfato (PBS) (pH 7,6). As células, após fixação, foram permeabilizadas, com solução de PBS-Triton X-100 0,25% por 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir a marcação de antígenos citoplasmáticos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de SFB em PBS durante 1 hora. As células foram, então, lavadas com PBS e incubadas, por 1 hora a 37 °C, com marcadores específicos para neurônios (Tabela 1).

**Tabela 1** - Anticorpos primários utilizados para os diferentes tipos celulares analisados.

Tipo Celular	Anticorpo primário	Produzido em	Imunoglobulina	Diluição	Fonte
	Anti $\beta$ -tubulina III	camundongo	IgG1	1:500	Promega
Neurônio	Anti Neurofilamento 150	coelho	IgG	1:150	Sigma
	Anti - Neu-N	camundongo	IgG1	1:50	Chemicon

FONTE: Souza (2011).

As células foram, então, lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma) e subsequentemente incubadas, por 1 hora, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários (Tabela 2).

As células foram novamente lavadas com PBS e, então, incubadas por 40 segundos com corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI) ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Sigma) e observadas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX71).

**Tabela 2** - Relação dos anticorpos secundários utilizados.

<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Reconhece</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fonte</b>
<b>Alexa Fluor 488</b>	coelho	1:500	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 594</b>	camundongo	1:400	Invitrogen

FONTE: Souza (2011).

### **3.7 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a diferença entre a média ( $\bar{X}$ ) e o erro-padrão da média (EPM) dos grupos 2D (controle) e 3D (CB, CB-FN ou CB-PL) através do software GraphPadPrism 5, utilizando os testes estatísticos ANOVA de uma via, seguido de teste de Dunnett's e Newman-Keuls para amostras não-pareadas e o teste t de *Student* para amostras pareadas. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Produção e caracterização dos biomateriais

A CB sintetizada por *G. hansenii* em condições estáticas, utilizando manitol como fonte de carbono, produziu um biomaterial homogêneo, gelatinoso e resistente, na superfície da placa de cultura, com seis milímetros de diâmetro, conforme mostrado na Figura 6. O tempo de cultivo foi de sete dias.

**Figura 6** - Representação da obtenção do biomaterial de celulose bacteriana.

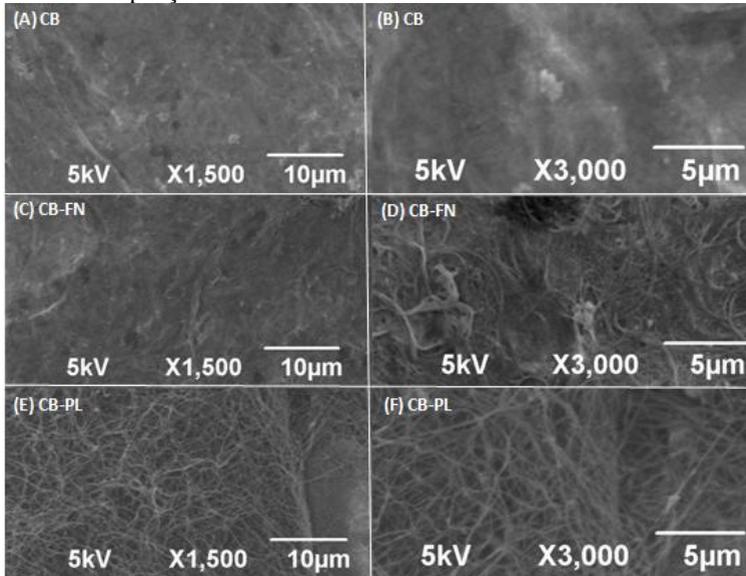


NOTA: Imagens representativas da placa de cultura de 96 poços (A), e do biomaterial celulose bacteriana (B), obtida após cultura em placas de 96 poços.

FONTE: Souza (2011).

A caracterização da microestrutura dos biomateriais foi realizada utilizando MEV nos aumentos de 1500 e 3000 $\times$ . A Figura 7 apresenta micrografias de MEV obtidas da superfície dos biomateriais Celulose Bacteriana (CB, A e B); celulose bacteriana com fibronectina (CB-FN, C e D), e celulose bacteriana com poli-L-lisina e laminina (CB-PL, E e F). Claramente, quando comparado ao biomaterial CB, pode-se observar uma alteração estrutural promovida pelas proteínas adsorvidas na superfície dos compostos CB-FN e CB-PL caracterizada por uma rede proteica frouxa recobrando a superfície do biomaterial.

**Figura 7** - Micrografias de MEV da superfície dos biomateriais CB, CB-FN e CB-PL com ampliações de 1500 e 3000 $\times$ .



FONTE: Souza (2011).

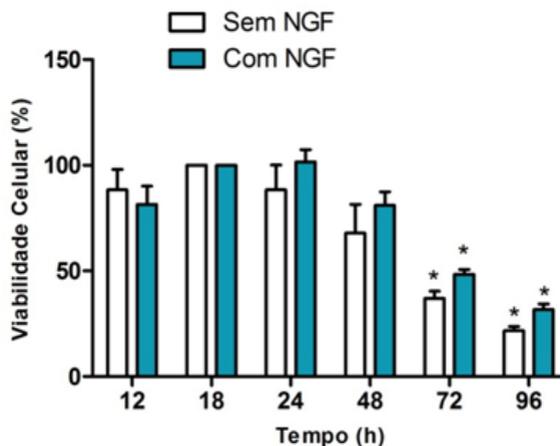
#### 4.2 Avaliação do tempo de sobrevivência de células do gânglio da raiz dorsal de ratos cultivados em ambiente bidimensional (2D)

Após a realização de diversos experimentos, voltados a determinação da quantidade ideal de gânglios da raiz dorsal (13–14 DRGs.animal<sup>-1</sup>) de ratos a serem removidos e que fossem capazes de nos fornecer uma densidade celular adequada e adesão consistente, passou-se a avaliar o tempo de sobrevivência das células do GRD de ratos adultos, cultivadas em placas de cultura bidimensionais (culturas 2D), contendo meio DMEM, suplementado ou não com fator de crescimento do nervo (NGF – 100 ng.mL<sup>-1</sup>). O parâmetro utilizado no estudo foi a análise da viabilidade celular através da redução do MTT e avaliação microscópica das células em cultura.

Na Figura 8 verificou-se uma diminuição significativa na viabilidade celular das culturas do GRD, a partir da décima oitava hora de cultivo, em meio sem suplementação com NGF. Em contraste, a adição de NGF ao meio de cultivo foi capaz de prolongar o início da morte celular. No entanto, nos tempos de 48, 72 e 96 horas não foi

observado alteração significativa na viabilidade celular, quando se fez uso do NGF.

**Figura 8** - Avaliação da viabilidade de neurônios em função do tempo.



NOTA: Avaliação da viabilidade celular de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos na presença (barras escuras) ou ausência (barras brancas) do fator de crescimento do nervo (NGF,  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de redução do MTT. Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média de experimentos realizados em triplicata. Asteriscos denotam significância em relação ao tempo de cultivo de 18 h (ANOVA de uma via, seguido de teste *t* de Student).

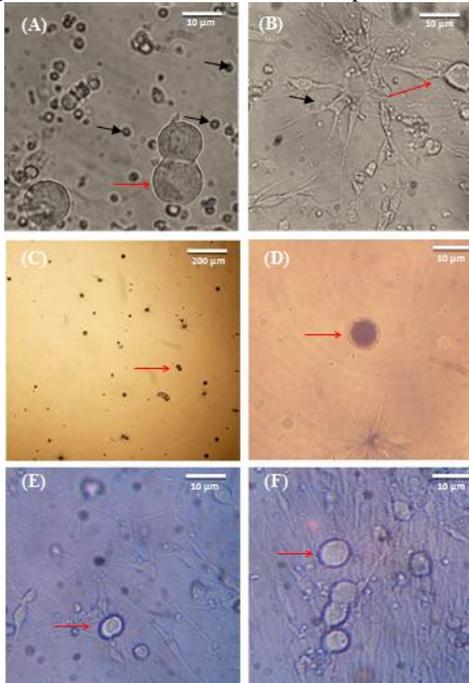
FONTE: Souza (2011).

A avaliação microscópica das culturas primárias de GRD, apresentada na Figura 9, permitiu identificar células com formato arredondado e diâmetro médio de  $14 \mu\text{m}$  (setas vermelhas), no período de 24 horas (painel A), acompanhadas de formação de prolongamentos no tempo de 96 horas de cultivo (painel B), indicativo de células neuronais. Ademais, como não foi realizado o uso de inibidores de crescimento de células gliais ou de células não neuronais, foi possível observar diversas células (setas pretas) nas adjacências desses possíveis corpos neuronais, indicativo de células gliais. A exposição destas células à reação de redução do MTT mostra a formação dos cristais de formazana no interior da célula, fornecendo uma coloração mais escura

a célula (painel C e D). Os painéis E e F da Figura 9 mostram uma população de células viáveis marcadas com azul de tripan.

Sendo assim, padronizou-se o período de 18 horas de incubação em meio de cultivo suplementado com o fator de crescimento do nervo, como o que apresenta melhores condições fisiológicas e sem alteração na viabilidade celular das culturas primárias de neurônios adultos do GRD, entre os diversos períodos avaliados.

**Figura 9** - Fotografias de neurônios cultivados em placas 2D.



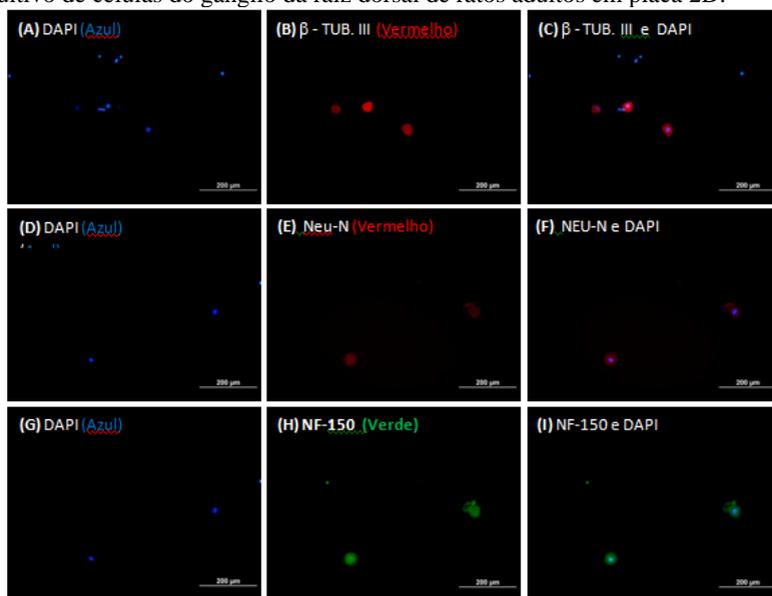
NOTA: Fotografias de células neuronais do gânglio da raiz dorsal cultivadas durante 24 h (A) ou 96 h (B) em placas de cultura 2D. Em C e D células mantidas durante 24 h em cultivo e submetidas ao método de redução do MTT. Em E e F células neuronais viáveis mantidas durante 96 h em cultivo, expostas ao azul de tripan. As setas vermelhas indicam células neuronais (corpos do neurônio), enquanto que as setas pretas indicam células gliais.

FONTE: Souza (2011).

Em seguida, visando identificar a presença de células neuronais nas culturas de GRD, mantidas durante 24 h em cultivo, as amostras

foram submetidas à análise imunocitoquímica, através da imunodeteção por meio de anticorpos específicos (mono/policlonais) para marcador de neurônios adultos, o neurofilamento N ( Neu-N), para células progenitoras neurais a  $\beta$ -tubulina III ou para proteínas do citoesqueleto, o neurofilamento 150 (NF-150). Vinte e quatro horas após o cultivo, muitas células apresentaram marcação positiva para  $\beta$ -Tubulina III (Figura 10 A - C) e Neu-N (Figura 10 D - F). Em adição, os neurônios expressaram a proteína NF-150 (Figura 10 G - I), indicando um processo de regeneração nos estágios iniciais de crescimento celular. Estes resultados indicam a presença de células neuronais viáveis. No entanto, não permite distinguir os tipos de neurônios presentes na cultura ou ainda a população de células gliais.

**Figura 10** - Evidência imunocitoquímica da presença de células neuronais no cultivo de células do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos em placa 2D.



NOTA: A–C são micrografias mostrando neurônios marcados com  $\beta$  Tubulina II (marcador específico de células progenitoras neurais). D–F, marcações fluorescentes de células positivas para NEU-N (marcador específico para neurônios adultos). Em G–I neurônios marcados com NF -150, marcador específico da proteína neurofilamento 150.

FONTE: Souza (2011).

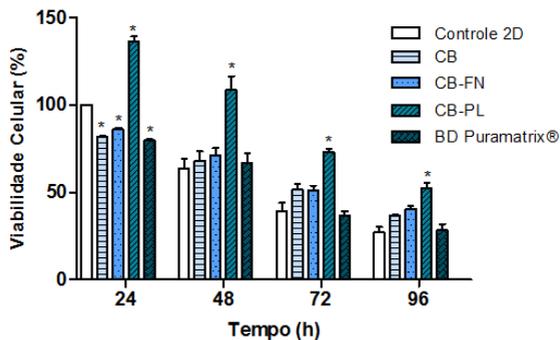
### 4.3 Análise da citotoxicidade *in vitro* dos biomateriais CB, CB-FN e CB-PL

Uma vez padronizada e identificada a cultura primária de neurônios do GRD de ratos adultos, passou-se a investigar a possível citotoxicidade dos biomateriais. Para tal, as placas de cultura foram previamente recobertas com CB, CB-FN, CB-PL ou BD Puramatrix®. Em seguida, as células neuronais foram semeadas diretamente sobre a superfície de cada um dos biomateriais, mantidas em cultura por um período de 24, 48, 72 ou 96 horas e submetidas ao método de redução do MTT para avaliação da viabilidade celular.

Quando comparado ao cultivo celular em ambiente 2D, o cultivo em ambiente 3D, isto é, sobre a superfície de CB ou CB-FN, apresentou uma redução na viabilidade celular no tempo de 24 horas, seguido de um aumento superior àquele apresentado pelo controle 2D nos demais tempos avaliados. Já o cultivo sobre o biomaterial BD Puramatrix®, um biomaterial disponível comercialmente, apresentou um decurso temporal de viabilidade celular semelhante àquele apresentado pelo controle 2D. Em adição e de forma surpreendente, quando comparada ao cultivo em placa 2D, as células neuronais cultivadas sobre o biomaterial CB-PL apresentaram um aumento de 31%, 49%, 31% e 28 % na viabilidade celular nos períodos de 24, 48, 72 e 96h, respectivamente (Figura 11).

Ademais, na Figura 12, a qual compara a viabilidade celular dos biomateriais CB-FN, CB-PL e BD Puramatrix® com o biomaterial CB, pode-se observar uma melhora na viabilidade celular quando se promove a adsorção de proteínas na superfície do biomaterial, sendo que a modificação estrutural da superfície do biomaterial CB com as proteínas poli-L-lisina e laminina apresentou uma evidente capacidade em potencializar e prolongar a sobrevivência de neurônios adultos em cultura. Estes achados podem ser melhor observados na Figura 13 a qual demonstra a adesão de células do GRD mantidas 24 horas em cultivo na superfície de CB (A e B), CB-FN (C e D) ou CB-PL (E e F), comprovando o ambiente favorável à adesão celular, sobrevivência e regeneração, propiciado pela modificação estrutural da superfície do biomaterial CB, induzido pela proteína fibronectina e em especial pelas proteínas poli-L-lisina e laminina.

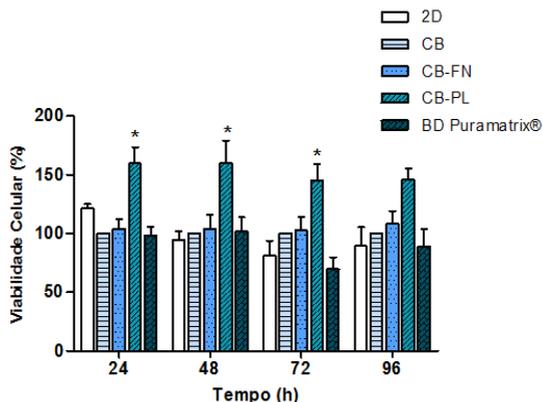
**Figura 11** - Viabilidade celular das culturas de células neuronais do gânglio da raiz dorsal de ratos (RGD) cultivados em placa 2D.



NOTA: Biomaterial CB, CB-FN, CB-PL e BD Puramatrix® por um período de 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA de uma via, seguido de *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Asteriscos (\*) denotam diferença estatística em relação ao controle 2D 24 horas.

FONTE: Souza (2011).

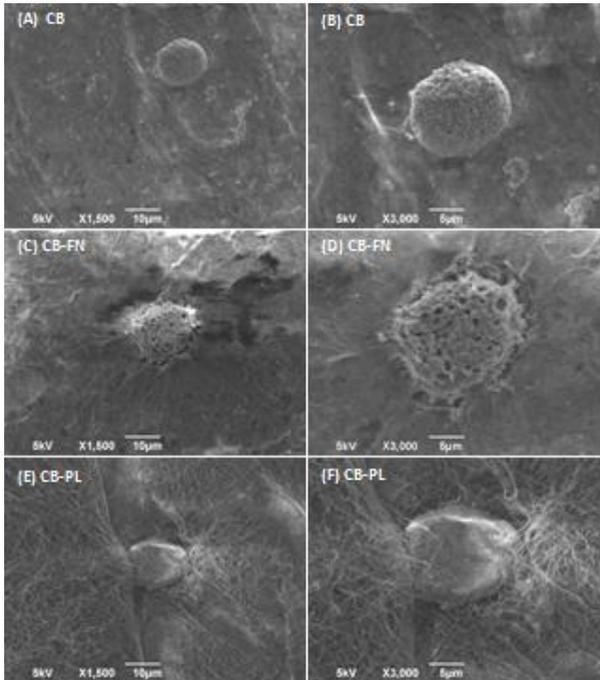
**Figura 12** - Comparação da viabilidade celular apresentada pelos biomateriais CB, CB-FN, CB-PL e BD Puramatrix nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h de cultivo.



NOTA: Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3 experimentos realizados em triplicata. ANOVA de uma via, seguido de *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Asteriscos (\*) denotam diferença estatística em relação ao biomaterial CB nos tempos de 24, 48, 72 ou 96 horas, respectivamente.

FONTE: Souza (2011).

**Figura 13** - Micrografias obtidas por MEV da superfície de diferentes biomateriais.



NOTA: Micrografias de celulose bacteriana (CB) (A e B), CB-FN (C e D) e CB-PL (E e F) nos aumentos de 1500 e 3000 $\times$ , respectivamente.

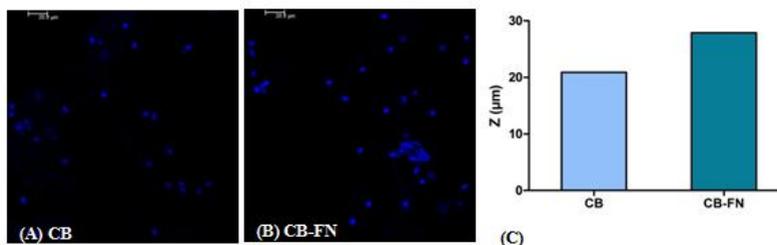
FONTE: Souza (2011).

No estudo comparando as diferenças no grau de interiorização celular nos biomateriais CB e CB-FN, pode-se observar que o grau de interiorização depende do tipo de biomaterial utilizado. Células neuronais cultivadas sobre CB foram capazes de migrar para o interior do biomaterial atingindo uma profundidade de 20,9  $\mu\text{m}$  (Figura 14 A e C), enquanto àquelas cultivadas sobre CB-FN adentraram no biomaterial até uma distância de 27,9  $\mu\text{m}$  (Figura 14 B e C). A interiorização celular foi avaliada através da digitalização das imagens obtidas das células cultivadas nos biomateriais, analisando do centro para a periferia, na direção z.

Em seguida, foi realizada a identificação celular das culturas sobre CB (Figura 15), CB-FN (Figura 16), CB-PL (Figura 17) e BD

Puramatrix® (Figura 18), onde foi possível detectar marcação positiva para neurônios adultos e células progenitoras neurais.

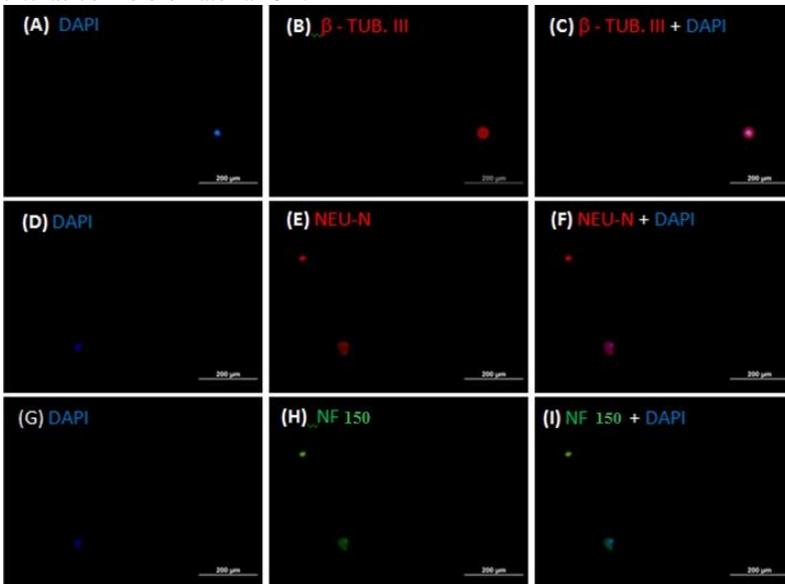
**Figura 14** - Análise da interiorização das células neuronais cultivadas durante 24 h sobre CB ou CB-FN



NOTA: Em A e B imagens obtidas através de microscopia confocal de núcleos celulares corados com DAPI. Em C, gráfico representando a interiorização celular avaliada através da digitalização das imagens obtidas das células cultivadas sobre CB ou CB-FN, analisando do centro para a periferia, na direção z.

FONTE: Souza (2011).

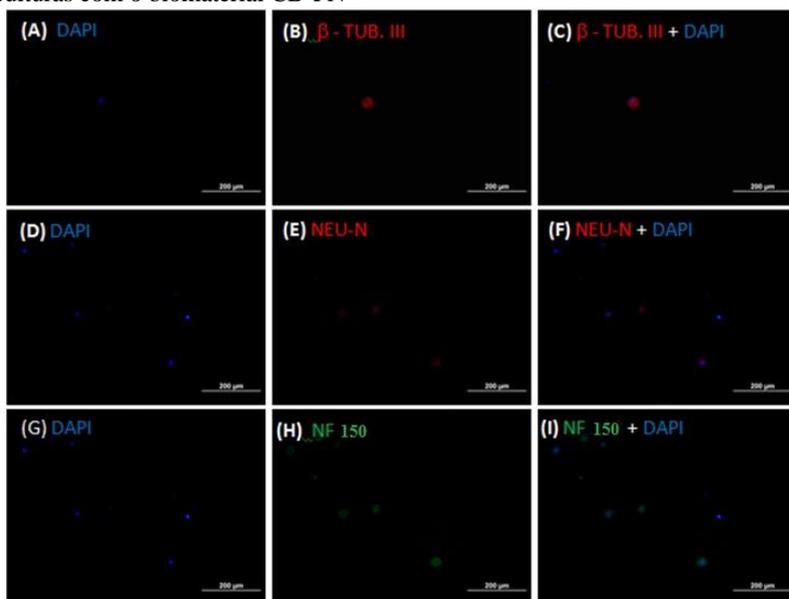
**Figura 15** - Imagens obtidas por microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial CB.



NOTA: A, B e C são imagens de culturas com  $\beta$  - Tubulina III, D, E e F são imagens com Neu-N, G, H e I com anti Neurofilamentos.

FONTE: Souza (2011).

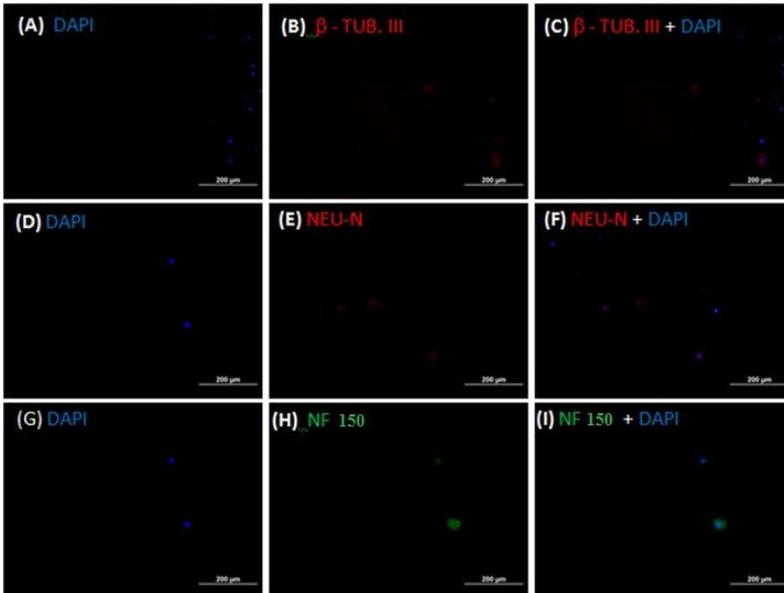
**Figura 16** - Imagens obtidas por microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial CB-FN



NOTA: A, B e C são imagens de culturas com  $\beta$  - Tubulina III, D, E e F são imagens com Neu-N, G, H e I com anti Neurofilamentos.

FONTE: Souza (2011).

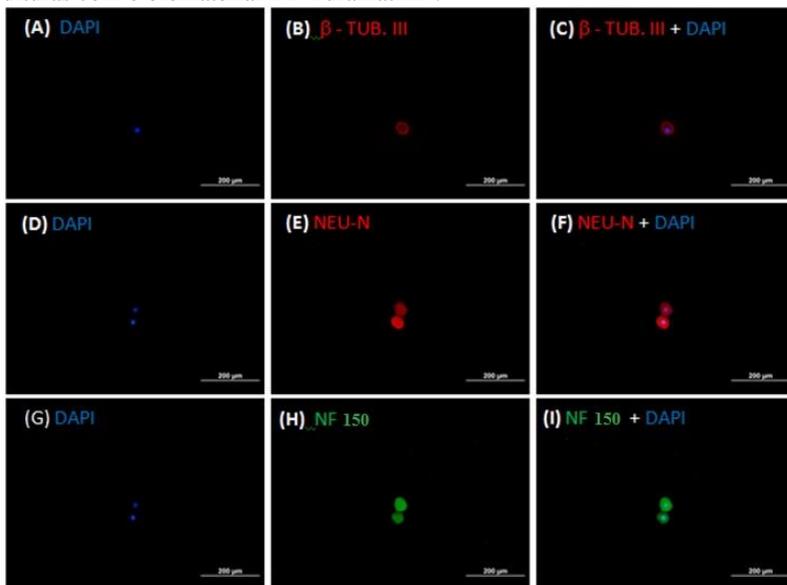
**Figura 17** - Imagens obtidas através de microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial CB-PL.



NOTA: A, B e C são imagens de culturas com  $\beta$  - Tubulina III, D, E e F são imagens com Neu-N, G, H e I com anti Neurofilamentos.

FONTE: Souza (2011).

**Figura 18** - Imagens obtidas por microscópio invertido de fluorescência em culturas com o biomaterial BD Puramatrix®.



NOTA: A, B e C são imagens de culturas com  $\beta$  - Tubulina III, D, E e F são imagens com Neu-N, G, H e I com anti Neurofilamentos.

FONTE: Souza (2011).

#### 4.4 Hidrogel injetável baseado em CB (CB-PLi)

Uma vez confirmado que os biomateriais CB, CB-FN e CB-PL não são citotóxicos para as células estudadas e que ocorrem diferenças no que diz respeito à adesão e proliferação celular dependente do tipo de biomaterial empregado, diferenças estas que podem repercutir na taxa de adesão celular e/ou em sua sobrevivência, passou-se a investigar as consequências do ponto de vista químico e biológico da hidrólise enzimática do biomaterial CB-PL, uma vez que este biomaterial promoveu uma alta taxa de adesão e sobrevivência celular.

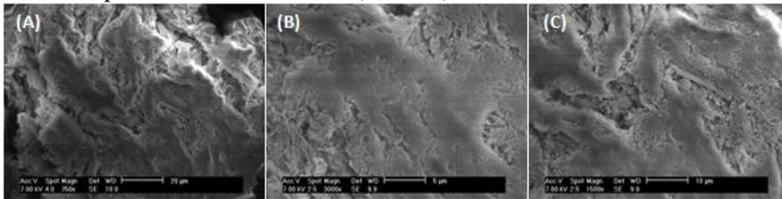
A proposição de promover a hidrólise enzimática do biomaterial CB-PL baseia-se na hipótese de que a produção de um biomaterial passível de ser administrado diretamente na medula espinhal por via intra-tecal poderia auxiliar no tratamento da lesão medular traumática através da formação de um arcabouço favorável a neuroregeneração. Assim, foi realizada uma hidrólise enzimática incompleta, utilizando a enzima celulase Celluclast® (Novozymes®), formando um hidrogel

composto por oligômeros de celulose bacteriana. Após a hidrólise foi adicionado poli-L-lisina e laminina ao hidrogel seguindo os mesmos protocolos anteriormente citados. Dessa forma, obtivemos o hidrogel injetável baseado em CB com poli-L-lisina e laminina denominado CB-PLi.

#### 4.4.1 Caracterização do hidrogel injetável CB-PLi

Através das análises em microscópio eletrônico de varredura da superfície de CB-PLi foi possível observar uma superfície mais compacta com aglomerados de fibras em regiões específicas (Figura 19 A–C) diferentemente da superfície do biomaterial CB-PL não submetido ao processo de hidrólise enzimática (ver Figura 7 A e B).

**Figura 19** - Micrografias obtidas por MEV do hidrogel injetável de celulose bacteriana, poli-L-Lisina e laminina (CB-PLi).



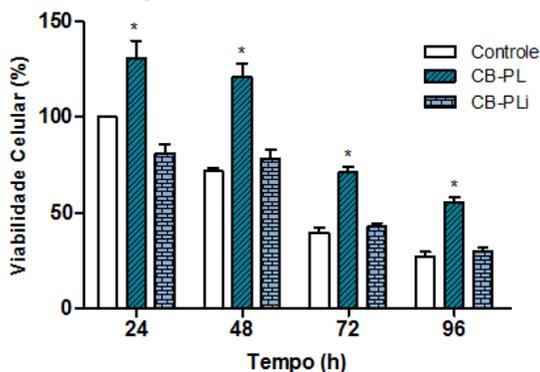
NOTA: Micrografias obtidas nos aumentos de 750 (A), 1500 (B) e 3000× (C).  
FONTE: Souza (2011).

#### 4.4.2 Crescimento e viabilidade celular

Quando comparado, a viabilidade celular das células do GRD de ratos adultos cultivadas sobre CB-PLi em relação ao cultivo sobre CB-PL não hidrolisado, pode-se observar uma redução da viabilidade celular, induzida, possivelmente, pela hidrólise enzimática em todos os tempos de cultivo avaliado. No entanto, esta redução na viabilidade celular não foi estatisticamente diferente do controle 2D (Figura 20).

De forma semelhante, quando foi avaliada a viabilidade das células cultivadas sobre CB, CB-FN, CB-PL, BD Puramatrix® ou CB-PLi, não houve alteração significativa na viabilidade entre os biomateriais CB, CB-FN, BD Puramatrix® ou CB-PLi, quando comparada ao controle 2D (Figura 21 e Figura 22).

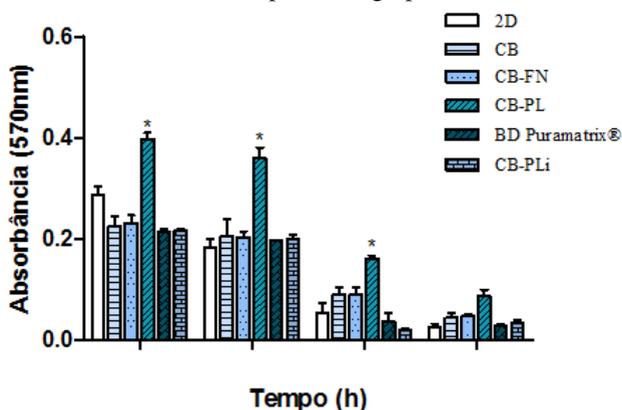
**Figura 20** - Viabilidade de células de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos (RGD) cultivados no controle 2D, CB-PL e CB-PLi utilizando o método MTT, com leituras nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h.



NOTA: Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA de uma via, seguido de *Dunnnett's Multiple Comparison Test*. Onde, asteriscos (\*) denotam diferença estatística entre os hidrogéis analisados em relação ao controle 2D em 24, 48, 72 e 96h, respectivamente.

FONTE: Souza (2011).

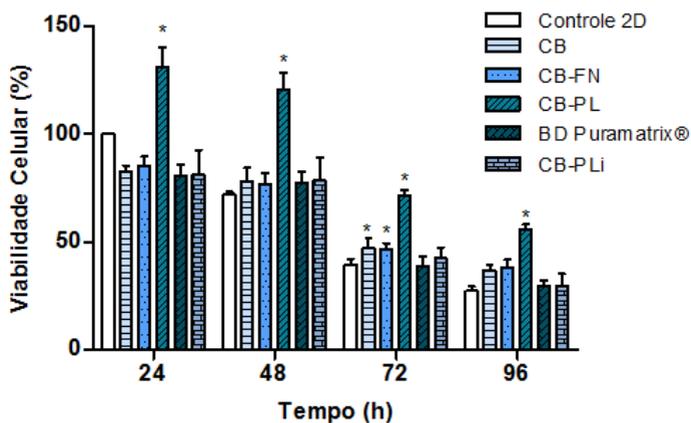
**Figura 21** - Comparação entre viabilidade celular entre os biomateriais CB, CB-FN, CB-PL, BD Puramatrix® e CB-PLi, mostrado no gráfico representativo dos valores de absorbância obtidos para cada grupo.



NOTA: Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA de uma via, seguido de *Dunnnett's Multiple Comparison Test*. Asteriscos (\*) denotam diferença estatística entre os hidrogéis analisados em relação a CB.

FONTE: Souza (2011).

**Figura 22** - Comparação da viabilidade celular de células de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos (RGD) cultivados sobre os biomateriais CB, CB-FN, CB-PL, BD Puramatrix® e CB-PLi por um período de 24, 48, 72 ou 96h.



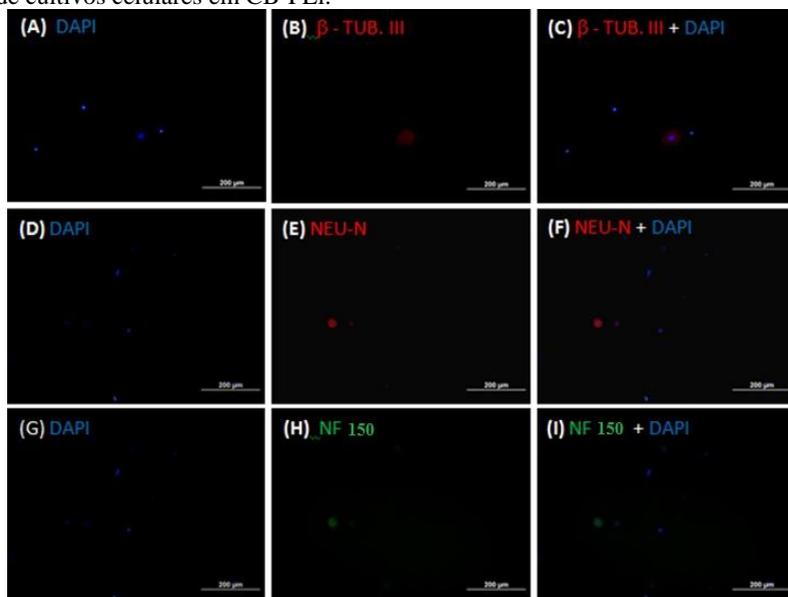
NOTA: Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA de uma via, seguido de *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Asteriscos (\*) denotam diferença estatística entre os hidrogéis analisados em relação a CB.

FONTE: Souza (2011).

#### 4.4.3 Identificação celular

Por fim, e de forma similar a identificação celular das culturas sobre CB, CB-FN, CB-PL e BD Puramatrix®, nas culturas celulares sobre CB-PLi também foi possível detectar marcação positiva para células progenitoras neurais (Figura 23 A - C), neurônios adultos (Figura 23 D - F) e neurônios em regeneração (Figura 23 G - H).

**Figura 23** - Imagens obtidas através de microscópio invertido de fluorescência, de cultivos celulares em CB-PLi.



NOTA: Na primeira coluna de imagens (A, D e G) os núcleos celulares estão corados com DAPI, a coluna central (B, E e H) são imagens de células marcadas com anticorpos específicos ( $\beta$ -tubulina III, Neu-N e Neurofilamento, respectivamente) e a terceira coluna (C, F e I) é a colocalização da primeira coluna e a central.

FONTE: Souza (2011).

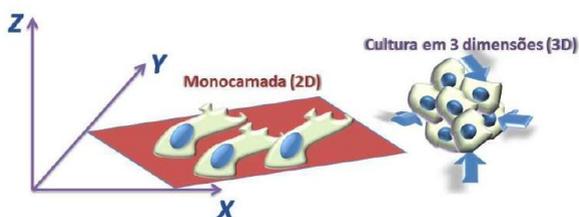


## 5 DISCUSSÃO

A cultura celular permite a manutenção de células vivas em laboratório independentemente do organismo que as originou. Desse modo, a utilização dessa técnica tem possibilitado o estudo de fenômenos inacessíveis em tecidos intactos, o controle das condições ambientais (pH, temperatura, concentração de  $O_2$  e  $CO_2$ , etc.), a obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas, economia de reagentes e de tempo, bem como o conhecimento do comportamento em função de uma população isolada de células. Por outro lado, possuem desvantagens, como gasto elevado de material, condição de crescimento da cultura, instabilidade de cultura celular, perda de características, dificuldade de extrapolação para o modelo de organismo intacto, entre outras. Muitas destas desvantagens se devem ao fato das células obtidas a partir da dissociação de células com geometria tridimensional terem sua propagação e cultivo realizado em um substrato bidimensional (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Assim, a cultura de células em três dimensões (3D) possui seu diferencial por permitir que as células, dependendo da sua origem morfológica, explorem as três dimensões do espaço, aumentando, assim, as interações da célula com o ambiente e com outras células, como pode ser visualizado na Figura 24 (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

**Figura 24** – Esquema ilustrando a diferença entre o arranjo espacial de culturas celulares em monocamadas (2D) e em dimensões (3D).



FONTE: Amaral e Machado-Santelli (2011).

Neste contexto, este estudo buscou produzir e caracterizar um biomaterial capaz de promover um ambiente 3D favorável a um tecido com conformação tridimensional.

Primeiramente induzimos uma modificação da superfície do biomaterial base, a celulose bacteriana, através da adsorção de proteínas adesivas, tais como a fibronectina e a poli-L-lisina/laminina

Sabe-se que a modificação de superfícies dos materiais para aplicações biomédicas possibilita a combinação de propriedades do volume do material com as propriedades desejadas na superfície, como a biocompatibilidade, bioatividade, resistência mecânica, dentre outras. Esta combinação visa aperfeiçoar o desempenho do sistema, simultaneamente diminuindo as perdas funcionais decorrentes da substituição do tecido ou órgão lesado pelo biomaterial implantado (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

O método mais fácil e mais utilizado para modificar biomateriais para o uso na engenharia de tecido neural tem sido a cobertura/adsorção de moléculas/proteínas de adesão na superfície dos biomateriais. As moléculas de adesão se ligam fisicamente à superfície do biomaterial através de ligações fracas, como força de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Este método foi utilizado para aplicar a laminina e a poli-L-lisina a filmes de poli(ácido láctico)-co-(ácido glicólico) (PLGA) (PARK et al., 2008); laminina, polilisina e colágeno à superfícies de hidrogel de ácido polisialico (HAILE et al., 2008); laminina a filmes de PLGA tratados com plasma, filmes de quitosana (HUANG et al., 2007) e nanofibras de ácido poli L-láctico (PLA) (KOH et al., 2008). Estas proteínas trazem importantes mecanismos de interação biomaterial-sistema vivo, e possuem uma sequência primária de aminoácidos que se organizam em estruturas bidimensionais e tridimensionais, promovendo a formação de arranjos com conformações particulares que influenciam a ocorrência de fenômenos na interface do implante. Esta distribuição tridimensional atribui características funcionais, especificidade e seletividade a esta classe de macromoléculas (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). De fato, os resultados comprovam uma alteração na conformação estrutural do biomaterial CB após a adsorção de fibronectina, poli-L-lisina e laminina a qual foi capaz de promover uma melhor interação e adesão entre as células e o substrato. Sempre que uma solução de proteína entra em contato com uma superfície sólida, espontaneamente moléculas se acumulam na interface líquido-sólido (WAHLGREN; ARNEBRANT, 1991; SCHAKENRAAD; BUSSCHER, 1989; ABSOLOM; NEUMANN, 1988). A adsorção de proteínas tem sido relatada por diversos pesquisadores como o primeiro evento quando uma superfície artificial entra em contato com o sangue (BASMADJIAN; SEFTON; BALDWIN, 1997). Controlar e manipular a adsorção de proteínas, de soluções aquosas ou do sangue, na superfície de dispositivos médicos, tem sido almejado por pesquisadores da área de biomateriais. Para isso é necessário compreender as propriedades/composição da estrutura molecular, bem

como os mecanismos de interação entre células/biomateriais. Para a engenharia de tecido as moléculas de adesão que compõem a matriz extracelular, tais como fibronectina, laminina e colágeno, são de grande interesse, uma vez que elas proporcionam uma superfície de adesão a tipos particulares de células (SCHMIDT; LEACH, 2003).

Concomitante a adsorção de moléculas de adesão na superfície da CB, também foi utilizado o fator de crescimento do nervo, um fator trófico essencial para a sobrevivência do neurônio, o qual foi diluído diretamente no meio de cultivo, o que nos permite sugerir que além de proteínas adesivas, os biomateriais produzidos neste estudo poderiam conter, além de proteínas adesivas, NGF em sua superfície. No entanto, fazem-se necessários estudos adicionais para comprovar tal hipótese.

No contexto dos resultados obtidos, em cultura bidimensional, a adição de NGF ao meio de cultivo prolongou o tempo de sobrevivência de células do gânglio da raiz dorsal. A viabilidade celular destas células se manteve máxima até o período de 24 horas, decrescendo a partir das 48 horas. Ademais, a suplementação do meio com NGF aumentou em 11% o número de células viáveis ao final de 4 dias de cultivo.

Outro achado importante relaciona-se a formação de prolongamentos axonais dependentes do tempo e das condições de cultivo, sendo que em 24 h de cultivo as células aderem, e com o passar do tempo espriam e formam comunicação entre si. Ademais, a marcação positiva para  $\beta$ -tubulina III, um marcador para células progenitoras neurais, confirma o processo de regeneração celular observado em nosso estudo.

Ainda, a questão mais relevante a ser discutida é o fato de que o cultivo das células do gânglio da raiz dorsal sobre os diferentes biomateriais produzidos, ou seja, em ambiente 3D, foi capaz de potencializar a adesão e o tempo de sobrevivência dessas células. Os resultados mais surpreendentes foram observados quando se fez uso do biomaterial CB-PL, o qual promoveu um aumento médio no número de células viáveis de 31%, 49%, 31% e 28% nos tempos de cultivo de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, respectivamente.

Em adição, o biomaterial CB-PL promoveu um aumento médio de 52% de células viáveis em relação ao biomaterial CB, e de 48% em relação ao hidrogel comercial baseado em peptídeos BD<sup>TM</sup> Puramatrix<sup>TM</sup>, respectivamente.

Também, se pode observar nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 13) a adesão das células nos biomateriais CB, CB-FN e CB-PL, onde houve uma maior interação quando as células do gânglio da raiz dorsal foram cultivadas sobre

membranas modificadas com fibronectina ou poli-L-lisina/laminina. Essa maior interação célula-biomaterial se deve, provavelmente, as propriedades dos compostos adsorvidos na superfície do biomaterial. Além disso, é possível verificar os diâmetros dos corpos celulares nas amostras analisadas e, a partir deles, calcular a área média, que foi de  $157\mu\text{m}^2$ , sendo que a área não se alterou em cultivo 3D, essa área encontrada é compatível com de neurônios de ratos. Uma vez que estudos realizados estimam um pico de neurônios de ratos com área entre  $120$  e  $200\mu\text{m}^2$ , variando com as características de cada animal, como a idade, por exemplo, (ROMANO et al, 2010; GABELLA, 1989). Ainda, nas análises de interiorização realizadas com CB e CB-FN, apresentou uma maior interiorização na direção z nas amostras com a adição de fibronectina, sendo  $20,9\mu\text{m}$  em CB e  $27,9\mu\text{m}$  em CB-FN. Ainda, verificou-se a presença de células neuronais, identificadas através da imunodeteção por meio de anticorpos específicos, em todas as amostras analisadas e, aparentemente, mantendo a morfologia celular (Controle 2D, CB, CB-FN, CB-PL, BD™ Puramatrix™) Em conjunto, os resultados apresentados permitem sugerir que os biomateriais com superfície modificada, CB-FN e CB-PL, parecem ser os biomateriais mais promissores em fornecer um ambiente favorável a neuroregeneração.

Sugere-se que a melhoria na adesão e sobrevivência celular se deve as características físico-químicas e biológicas de cada proteína adsorvida na superfície das membranas de celulose bacteriana. A fibronectina, por exemplo, é uma glicoproteína formada por dois polipeptídeos ligados através de ligações dissulfetos. Essa proteína pode ser encontrada no plasma sanguíneo e em outros fluidos na forma solúvel e também como proteína estrutural em tecido sólido. Na sua cadeia é encontrada a sequência de aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD). A sequência RGD pode estar relacionada à interação da proteína com a superfície das células (HYNES, 1985). Vários estudos têm mostrado a influência desta molécula na interação com integrinas e não integrinas da superfície celular, influenciando, desta forma, na adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. A adsorção da fibronectina aos biomateriais provoca uma mudança conformacional de uma estrutura globular para uma estrutura prolongada, dependendo das propriedades de superfície, tais como a carga da superfície, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, desempenhando um papel crítico na mediação da resposta celular (BERGKVIST, 2003). A adsorção de fibronectina em diferentes tipos de materiais, tais como sílica e mica (BERGKVIST, 2003), politereftalato de etileno (PET) (KESELOWSKY et

al., 2007) e silicone (SALAKHUTDINOV et al., 2008) tem sido utilizada para determinar o seu papel na mediação da resposta celular.

A laminina é uma proteína da matriz extracelular com função de organização estrutural da arquitetura do tecido e da transmissão de sinais extracelulares, controlando uma variedade de fenômenos biológicos, tais como crescimento celular, sobrevivência, migração e diferenciação. No sistema nervoso, a expressão da laminina é espacialmente e temporalmente regulada para guiar a migração neural e crescimento axonal durante o desenvolvimento embrionário e regeneração. No SNC, a expressão da laminina endógena aumenta após a lesão, e esse aumento tem sido associado com regeneração, quando ela ocorre. No entanto, no cérebro dos mamíferos adultos e na medula espinhal, a produção espontânea de laminina após a lesão não é suficiente para promover uma regeneração substancial (MENEZES et al., 2010).

Menezes et al (2010) investigaram se um polímero biomimético de laminina em pH ácido denominado polilaminina poderia promover uma melhora da atividade locomotora de ratos paraplégicos. A injeção local de polilaminina melhorou a função motora após a transecção parcial ou completa por compressão da medula espinhal torácica. A Polilaminina também teve uma ação anti-inflamatória, que fundamenta o início precoce de seus efeitos positivos sobre a melhora na locomoção na primeira semana após o tratamento.

Cheng et al (2007) projetaram um arcabouço poroso constituído de quitosana incorporada com laminina na superfície interna, com o objetivo de direcionar o reparo de axônios danificados após a lesão da medula espinhal. Após o implante dos biomateriais, os ratos mostraram uma tendência à recuperação funcional. Análises imunohistoquímicas e imunocitoquímicas indicaram que nos animais que receberam o implante houve uma melhora na condução dos axônios danificados através da área lesionada, sem desencadear inflamação ou apoptose.

Por fim, a polilisina é um homopolímero de L-lisina, contendo aproximadamente 30 subunidades L-lisina, ligados entre os grupos carboxil e amino (HIRAKI et al., 2003). Poli-L-lisina é secretado por várias bactérias *Streptomycetaceae* e é industrialmente produzido por fermentação (NISHIKAWA, 2005). A poli-D-lisina (PDL) e a poli-L-lisina (PLL) são compostos que melhoram a adesão celular e a absorção de proteína, alterando as cargas de superfície do substrato celular.

Nas análises por microscopia eletrônica do biomaterial injetável, baseado em celulose bacteriana com poli-L-lisina e laminina, foi possível observar o rompimento das fibras de celulose (Figura 19).

No cultivo celular demonstrado na Figura 20, pode se observar, através da viabilidade, que houve uma diminuição de 50% no número de células viáveis em relação à CB-PL, essa diminuição parece ser decorrente da perda da conformação tridimensional presente nas membranas de celulose. Mas, quando comparado com os outros biomateriais, (Figura 21 e Figura 22), obteve-se resultado semelhante ao hidrogel comercial BD Puramatrix<sup>®</sup>. Quando a viabilidade celular é calculada em relação ao controle 2D, o CB-PLi apresentou resultado equivalente ao BD Puramatrix<sup>®</sup>, CB e CB-FN em todos os tempos analisados e uma diminuição de 50%, 42%, 29% e 26% na viabilidade celular quando comparado com CB-PL em 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente (Figura 21).

Também, nas análises de imunofluorescência (Figura 22), utilizando os anticorpos Anti  $\beta$ -Tubulina III, Anti Neu-N e Anti Neurofilamento 200, verificou-se a presença de células neuronais.

## 6 CONCLUSÕES

A morte de células do GRD teve início a partir de 24 horas de cultivo em ambiente 2D suplementado com NGF.

Em ambiente 3D, preparados com os diferentes biomateriais, à viabilidade celular decaiu a partir das 48 horas, o que independe da presença do fator de crescimento do nervo no meio de cultivo.

Os diferentes hidrogéis analisados neste estudo não apresentaram citotoxicidade para células neuronais, sendo que o hidrogel de superfície modificada, composto de CB e poli-L-lisina/laminina, manteve o maior número de células viáveis.

A adsorção de fibronectina e poli-L-lisina/lamina aumentou a adesão e interação celular ao biomaterial.

A média das áreas dos corpos celulares visualizados foi de  $157\mu\text{m}^2$ , sendo que nenhuma alteração no diâmetro celular foi observada após o cultivo em ambiente 3D.

O tratamento enzimático do hidrogel composto de CB-PL (CB-PL injetável) não apresentou citotoxicidade. No entanto, ocorreu uma diminuição na viabilidade celular quando comparado ao biomaterial CB-PL sem tratamento enzimático.

Portanto, o hidrogel de celulose bacteriana modificada com poli-L-lisina/laminina parece ser um biomaterial promissor para promover a regeneração de tecidos neurais uma vez que o mesmo potencializa a adesão celular e aumenta a sobrevida das células neuronais.



## REFERÊNCIAS

ABSOLOM, D. R.; NEUMANN, A. W. Modification of Substrate Surface-Properties through Protein Adsorption, **Colloids and Surfaces**, v.30, p.25,1988.

AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A. Cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados à formação do lúmen. **Naturalia**, v.34, p. 1-20, 2011.

BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P.. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 2141–2149, 2006.

BASMADJIAN, D.; SEFTON M. V.; BALDWIN S. A. Coagulation on biomaterials in flowing blood: some theoretical considerations, **Biomaterials**, v.18, p.1511-1522, 1997.

BATISTA, D. R. **Estudos dos receptores purinérgicos em células gliais do gânglio da raiz dorsal**, 2008. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Biofísica) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERGKVIST, M.; CARLSSON, J.; OSCARSSON, S. Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy. **Biomed. Mater. Res.** v.4A, p. 349-356, 2003.

BROWN, A. J. An acetic ferment which forms cellulose. **Journal of Chemical Society**, v.49, p.432-439, 1886.

BROWN JR., M. R. Microbial Cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products ([www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/](http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/)), **Position Paper**, 1998.

BROWN JR., M. R. **Microbial Cellulose: A New Resource for Wood, Paper, Textiles, Food and specialty Products. Position Paper**, 1999. Disponível em: <<http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.htm>>, acesso em 15/08/2011.

CANNON, R. E.; ANDERSON, S. M. Biogenesis of Bacterial Cellulose, **Critical Reviews in Microbiology**, v.17 p.435-447, 1991.

CHENG, H.; HUANG, Y.; CHANG, P.; HUANG, Y. Laminin-incorporated nerve conduits made by plasma treatment for repairing spinal cord injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2007.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R. M. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v.27, p.145-151, 2006.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D.J.; KAWECKI, M. BROWN, M.J. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 8 p. 1-12, 2007.

DONG, Y.; LIAO, S.; NGIAM, M.; CHAN, C. K. Degradation behaviors of electrospun resorbable polyester nanofibers. **Tissue Engineering: Part B**, v. 15, p. 333-351, 2009.

FERREIRA, L. M.; SOBRAL, C. S.; BLANES, L.; IPOLITO, M. Z.; HORIBE, E. K. Proliferation of fibroblasts cultured on a hemi-cellulose dressing. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, Oxford, v.63, n.5, p.865-869, 2010.

FONTANA, J. D.; DE SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DE SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L.F. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Appl Biochem Biotechnol**, v.24-25, p. 253-264, 1990.

GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.96, p 1487-1493, 1989.

GARRITY, G. M.; BOONE, D. R. Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**, 1984.

GELLER, H. M.; FAWCETT, J. W. Building a Brigade: Engineering Spinal cord Repair, **Exp. Neurol**, v.137, p.333-349, 2002.

GISZTER, S. F. Spinal cord injury: present and future therapeutic devices and prostheses. **Neurotherapeutics**, 5:147-62, 2008.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. Funções motoras da medula espinhal; os reflexos espinhais. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAILE, Y.; BERSKI, S.; DRAGER, G.; NOBRE, A.; STUMMEYER, K.; GERARDY-SCHAHN, R.; GROTHE, C. The effect of modified polysialic acid based hydrogels on the adhesion and viability of primary neurons and glial cells. **Biomaterials**, v.29, p.1880-1891, 2008.

HAWRYLUK G. W.; ROWLAN, J.; KWON, B. K.; FEHLING, M. G. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. **Neurosurg Focus**, 25: 1-16, 2008.

HELENIUS, G.; BACKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials**: Part, v. 76, p. 431-438, 2006.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal, London**, v.58, n.2, p.345-52, 1954.

HIRAKI, J. T.; ICHIKAWA, S.; NINOMIYA, H.; SEKI, K.; UOHAMA, H.; SEKI, S.; KIMURA, Y.; YANAGIMOTO, J. W.; BARNETT, JR. Use of ADME studies to confirm the safety of  $\epsilon$ -polylysine as a preservative in food. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** 37:328- 34, 2003.

HOULE, J. D.; ZIEGLER, M. K. Bridging a complete transection lesion of adult rat spinal cord with growth factor-treated nitrocellulose implants. **J Neural Transplant Plast**, v. 5, p.115-124, 1994.

HUANG, Y. C.; HUANG, C. C.; HUANG, Y. Y.; CHEN, K. S. Surface modification and characterization of chitosan or PLGA membrane with laminin by chemical and oxygen plasma treatment for neural regeneration. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 82, p.842-851, 2007.

HULSEBOSCH, C. E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Adv Physiol Educ.**, 26 (1-4):238-55, 2002.

HYNES, R. O. Molecular biology of fibronectin. **Annual Rev. Cell Biol.**, v. 1, p.67-90, 1985.

ISO 10993 – 1: 2003. **Avaliação biológica de produtos para a saúde.** Parte 1: Avaliação e ensaio. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil

KESELOWSKY, B. G.; WANG, L.; SCHWARTZ, Z.; GARCIA, A. J.; BOYAN, B. D. Integrin alpha(5) controls osteoblastic proliferation and differentiation responses to titanium substrates presenting different roughness characteristics in a roughness independent manner. **J Biomed Mater Res A.** 2007.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESSLER, N.; HORNUNG, M.; SCHMAUDER, H. P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Polysaccharides II**, v.205, p.49-96. 2006.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. **Prog. Polym. Sci.** v. 26, p. 1561-1603, 2001.

KOH, H. S.; YONG, T.; CHAN, C. K.; RAMAKRISHNA, S. Enhancement of neurite outgrowth using nanostructured scaffolds coupled with laminin. **Biomaterials** 29, 3574-3582, 2008.

KWON, S.; MIN, B. J.; LEE, W. B.; et al. Effect of dietary natural herb extract (Biomate®) supplementation on growth performance, IGF-1 and carcass characteristics in growing/finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v.82, supp.1, p.177, 2004.

LANGER, R., VACANTI, J. Tissue engineering. **Science**, v.260, p.920-926, 1993.

LOH, N. K.; WOERLY, S.; BUNT, S. M.; WILTON, S. D.; HARVEY, A. R. The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is

promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts. **Exp Neurol**, v. 170, p.72-84, 2001.

LU, P.; YANG, H.; JONES, L. L.; FILBIN, M. T.; TUSZYNSKI, M. H. Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. **J Neurosci**, v.24, p.6402-6409, 2004.

LUNDY-EKMAN, L. **Neurociências: fundamentos para reabilitação**. Tradução: Mundim, F. D.; Oliveira, N. G.; Santos, R. R.; Robaina, T. F.; Varga, V. R. S. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005

MARTINI, F. **The Nervous system: The spinal cord and spinal nerves**. In: Fundamentals of anatomy and physiology. 2<sup>a</sup> ed. Prentice Hall, 1992.

MARTINS, A.; ARAÚJO, J. V.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. **Nanomed**, v.2, p. 929-942, 2007.

MARTYN, S. V.; HEYWOOD, H. K.; ROCKETT, P.; PAINE, M. D.; WANG, M. J.; DOBSON, P. J.; SHEARD, S. J.; LEE, D. A.; STARK, J. P. W. Electro spray deposited fibronectin retains the ability to promote cell adhesion, **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.96b, p. 110-118, 2010.

MEIJS, M. F.; TIMMERS, L.; PEARSE, D. D.; TRESKO, P. A.; BATES, M. L.; JOOSTEN, E. A.; BUNGE, M. B.; OUDEGA, M. Basic fibroblast growth factor promotes neuronal survival but not behavioral recovery in the transected and Schwann cell implanted rat thoracic spinal cord. **J Neurotrauma**, v.21, p.1415-1430, 2004.

MELLO, L. R.; FELTRIN, Y.; SELBACH, R.; MACEDO JUNIOR, G.; SPAUTZ, C.; HAAS, L. J. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos Neuro psiquiatria**, v.59, n.2-B, p.372-379. 2001.

MENDONÇA, H. R.; THIRÉ, R. M. S. M.; COSTA, M. F. Adsorção de Fibronectina a Arcabouços de Polihidroxibutirato Aplicáveis à Engenharia Óssea. **Polímeros**, v.19, p. 143-148, 2009.

MENEZES, K.; MENEZES, J. R. L.; NASCIMENTO, M. A.; SANTOS, R. S.; COELHO-SAMPAIO, T. Poly laminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration after cord injury. **The Faseb Journal**, v. 24, 2010.

MEYER, F.; VIALLE, L.; VIALLE, E.; BLEGGI-TORRES, L.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, 18:203-207, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEGRÃO, S. W.; BUENO, R. R. L.; GUÉRIOS, E. E.; ULTRAMARI, F. T.; FAIDIGA, A. M.; ANDRADE, P. M. P.; NERCOLINI, D. C.; TARASTCHUCK, J. C.; FARAH, L. F. A eficácia do stent recoberto com celulose biossintética comparado ao stent convencional em angioplastia em coelhos. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, São Paulo, v.14, n.1, p.10-19, 2006.

NISHIKAWA, M.; OGAWA, K. **Inhibition of Epsilon-poly-L-lysine biosynthesis in Streptomycetaceae bacteria by short-chain polyols**. Received October, 2005

NSCISC, **National Spinal Cord International Statistical Center**. Annual report for the spinal cord injury model system. In <http://www.nscisc.uab.edu>. Acesso em julho de 2011.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro, Brasil: Cultura Médica, 1998.

PARK, K. S.; KIM, S. M.; KIM, M. S.; LEE, I.; RHEE, J. M.; LEE, H. B.; KHANG, G. Effect of cell- adhesive molecule- coated poly(lactide-co-glycolide) film on the cellular behaviors of olfactory ensheathing cells and Schwann cells. **J. Appl. Polym. Sci. Symp.**, p.107, v.1243-1251, 2008.

RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; ANTONIO, R. V.; PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering**, p. 549-554, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan. 2001. 906 p.

RECOUVREUX, D. O. S. **Produção de Celulose Bacteriana: Identificação do Operon *bcs* e Produção de Biofilme Celulósico por *Chromobacterium violaceum***, 2004 124p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**, 2008 124p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RICHTER, C.; REINHARDT, M.; GISELBRECHT, S.; LEISEN, D.; TROUILLET, V.; TRUCKENMÜLLER, R.; BLAU, A.; ZIEGLER, C.; WELLE, A. Spatially controlled cell adhesion on three-dimensional substrates, **Biomed Microdevices**, v. 12, p.87–795, 2010.

ROCHKIND, S.; SHAHAR, A.; FLISS, D.; EL-ANI, D.; ASTACHOV, L.; HAYON, T.; ALON, M.; ZAMOSTIANO, R.; AYALON, O.; BITON, I. E.; COHEN, Y.; HALPERIN, R.; SCHNEIDER, D.; ORON, A.; NEVO, Z. Development of a tissue-engineered composite implant for treating traumatic paraplegia in rats. **Eur Spine J**, v. 15, p.234-245, 2006.

ROGERO, S. O. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, abr./jun. vol.6 no.3, p.317-320. Apr./June 2003.

ROMANO, E. B.; NATALI, M. R. M.; LEITE, J. C.; CAMPOS, L. B.; BERARDI, E. J. Análise Morfométrica dos Neurônios NADH-Diaforese positivos do jejuno de ratos wistar em diferentes idades. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.3, n.1, p.63-70. Jan/abr, 2010.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v.55, p.35-58, 1991.

ROSSIGNOL, S.; SCHWAB, M.; SCHWARTZ, M.; FEHLINGS, M.G. Spinal cord injury: time to move? **J Neurosci.**, 27(44): 11782-11792, 2007.

RUITENBERG, M.J.; LEVISON, D. B.; LEE, S. V.; VERHAAGEN, J.; HARVEY, A. R.; PLANT, G. W. **NT-3 expression from engineered olfactory ensheathing glia promotes spinal sparing and regeneration**, **Brain** v.128, p.839-853, 2005.

SALAKHUTDINOV, I.; VANDEVORD, P.; PALYVODA, O.; MATTHEW, H.; TATAGIRI, G.; HANDA, H.; MAO, G.; AUNER, G. W.; NEWAZ, G.; Fibronectin Adsorption to Nanopatterned Silicon Surfaces. **Journal of Nanomaterials**, v. 2008, p. 1-5, 2008.

SAMADIKUCHAKSARAEI, A. An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries. **J. Neuroengineer. Rehab.**, v. 4, p. 1-16, 2007.

SCHAKENRAAD, J. M.; BUSSCHER, H. J. **Cell-polymer interactions: The influence of protein adsorption**, **Colloids and Surfaces**, v.42, p.331,1989.

SCHMIDT, C.E., LEACH, J.B., Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. **Annual Rev Biomed Eng**, v.5, p.293-347,2003.

SERPOOSHAN, V.; JULIEN, M.; NGUYEN, O.; WANG, H.; LI, A.; MUJA, N.; HENDERSON, J.; NAZHAT, S. Reduced hydraulic permeability of three-dimensional collagen scaffolds attenuates gel contraction and promotes the growth and differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 3978-3987, 2010.

SIQUEIRA, J. J. P.; MORESCHI, J. C. Membranas de Celulose Porosas Desidratadas para Curativos em Úlceras, Escoriações e Queimaduras. **Cirurgia Vascular & Angiologia** 16 (2000) 179.

SOUZA, G. V. **Avaliação da Viabilidade e da Interação de Células do Gânglio da Raiz Dorsal em Hidrogéis de Celulose Bacteriana.**

2011. 82p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v.26, p.419-431, 2005.

THURET, S.; MOON, L. D.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci.**, 7(8): 628-43, 2006.

TUZLAKOGLU, K; REIS, R. L. Biodegradable polymeric fiber structures in tissue engineering. **Tissue Engineering: Part B**, v.15(1), p.17-27, 2009.

WAHLGREN, M.; ARNEBRANT, T. Protein adsorption to solid surfaces, **Trends in Biotechnology**, v.9, p.201, 1991.

WINTERMANTEL, E.; MAYER, J.; BLUM, J.; ECKERT, K. L.; LÜSCHER, P.; MATHEY, M. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. **Biomaterials** v.17, p. 83, 1997.

ZANETTA, M.; QUIRICI, N.; DEMAROSIC, F.; TANZIA, M. C.; RIMONDINIB, L.; FARÈ, S. Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts. **Acta Biomaterialia** 5, 1126-1136, 2009.