UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

GUILHERME FERREIRA CAETANO

Células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo e fração proteica do látex natural (*Hevea brasiliensis*) associados à *scaffolds* de policaprolactona e grafeno na osteogênese experimental

Ribeirão Preto

2017

GUILHERME FERREIRA CAETANO

Células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo e fração proteica do látex natural (*Hevea brasiliensis*) associados à *scaffolds* de policaprolactona e grafeno na osteogênese experimental

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

**Ribeirão Preto
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Caetano, Guilherme Ferreira

Células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo e fração proteica do látex natural (*Hevea brasiliensis*) associados à *scaffolds* de policaprolactona e grafeno na osteogênese experimental. Ribeirão Preto, 2016.

191 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani

1. Células tronco; 2. Grafeno; 3. *Hevea brasiliensis*; 4. Látex; 5. Regeneração Óssea; 6. Suporte tridimensional.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Ferreira Caetano

Células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo e fração proteica do látex natural (*Hevea brasiliensis*) associados à *scaffolds* de policaprolactona e grafeno na osteogênese experimental

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Eu
dedico
este trabalho
à todos aqueles
que um dia me apoiaram para seguir nesta carreira;
que um dia acreditaram que eu poderia chegar no final;
final este que se torna apenas um recomeço com
muito trabalho ainda por vir pela frente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, o grande Pai de todos, por ter iluminado este caminho cheio de pedras e barreiras, mas que com sua abençoada sabedoria guiou-me nos momentos mais difíceis e permitiu-me enxergar nos locais mais escuros e nas situações mais complexas;

À toda minha família: minha mãe **Regiane**; meu pai **Reginaldo**; meus também pais **Mariano**, pelo qual tenho enorme carinho e gratidão, e **Denise**; meus queridos e lindos irmãos, **Ana Laura** e **Marcelo**. Para sermos quem almejamos ser, grande parte vem da família, do apoio, da estrutura emocional proporcionada, da inspiração vinda por meio de um ente querido. Muito obrigado por toda dedicação em minha educação, em meu crescimento e por todo aprendizado de vida.

À minha noiva (e sempre namorada) **Ana Beatriz** que me acompanha e me apoia desde o início de minha história na Graduação com a Iniciação Científica. Tenho certeza que sem seu imensurável companheirismo, nas horas boas e ruins, fáceis e difíceis, o caminho para alcançar este degrau não teria sido tão seguro e prazeroso da forma que tem sido desde o início.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro proporcionado em todo projeto, desde a bolsa de estudos no país, material para pesquisa e bolsa de estudos no exterior (BEPE);

Ao meu orientador, supervisor, colaborador, amigo e companheiro **Marco Andrey Cipriani Frade**. Meus sinceros agradecimentos por ter aberto as portas do Laboratório de Cicatrização e Hanseníase e pelo enorme incentivo dado para o desenvolvimento de nosso trabalho. Sabíamos que não seria simples (eu nem queria que fosse), porém com todo nosso empenho e dedicação, desde a criação do projeto

à discussão de resultados e redação de artigos, conseguimos alcançar os resultados. Muito do que hoje tento ser é puro reflexo do que venho aprendendo ao seu lado.

À todos os amigos e parceiros do Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Dermatologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRPUSP. Gostaria de agradecer em especial ao **Dr. Thiago Antônio Moretti de Andrade** e **Marcel Nani Leite** pela credibilidade e pelos ensinamentos com métodos bioquímicos e histológicos, além de sempre pensarmos nos resultados adquiridos e experimentos futuros. À **Carolina Caliari, Flávia Guedes** e **Andrea Leone** pelos ensinamentos para isolamento e cultura de células a partir do tecido adiposo. À **Natália, Francielle** e **Patrícia** pelo grande apoio e companheirismo dentro do Laboratório. Obrigado pelo esforço individual de todos vocês em cada “batalha travada”.

À nossa querida técnica **Maria Aparecida**. Obrigado **“Cici”** pela grande ajuda com os experimentos, pela organização e zelo dentro do laboratório, além de sua paciência e seus ensinamentos transmitidos.

Ao meu supervisor no exterior, co-orientador e amigo **Paulo Jorge da Silva Bártolo** por ter dado a oportunidade de conhecer e vincular-me por 12 meses à Universidade de Manchester. Este fantástico estágio sob sua brilhante supervisão fez aumentar ainda mais meu desejo de continuar nesta carreira e crescer profissionalmente. Agradeço ainda ao **Centro de Manufatura Aditiva da Universidade de Manchester** e à **todos os alunos** do Prof. Paulo Bártolo que me ajudaram nas impressões dos *scaffolds*, no pensar dos experimentos e na discussão dos resultados obtidos.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Clínica Médica** por ter me aceitado como aluno e acredito em nosso projeto de pesquisa;

Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial ao **Émerson**, por todo suporte e ajuda fornecida ao longo do meu tempo de doutorado;

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP: **Adalberto, Maurício e Roni**, pela ajuda nos experimentos e no cuidado com os animais.

Aos Professores **Célia Jamur** (Biologia Celular e Molecular da FMRP), **Maria Carolina de Oliveira Rodrigues** e Miguel Angelo Hyppolito pela participação e contribuições em minha banca de qualificação. Seus ensinamentos e comentários muito me ajudaram para melhorar o trabalho;

À Profa. **Célia Jamur** pela disponibilidade e vontade em sempre ajudar. Obrigado pela atenção dada nos momentos de dúvidas quanto às células (morfologia, contaminação, meio de cultura, antibióticos) e microscopia de varredura. Ao Prof. **Miguel Angelo Hyppolito** pelas dicas fornecidas para resolver os trâmites burocráticos e pular as barreiras que apareceram antes da viagem a Manchester;

À técnica **Adriana Murashima** do Laboratório de Fisiopatologia da Audição, Olfato e Visão do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Muito obrigado por toda sua ajuda na desmineralização das amostras de calvária, nos procedimentos histológicos e imunoistoquímicos;

Às técnicas **Silvinha** e **Verinha** do Departamento de Bioquímica da FMRP pela ajuda com os experimentos com os animais, isolamento do osso da calvária e fração F1 proteica do látex;

À secretária **Cris** da divisão de Dermatologia da FMRP pela disposição em ajudar sempre que necessário;

Ao técnico e grande amigo **Renato** do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da FMRP por toda assistência para a utilização do microscópio de fluorescência;

À técnica **Paula Payão** do Laboratório de Nutrição da FMRP por toda ajuda e paciência nas leituras de ELISA e seus ensinamentos;

Amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que por ventura não tenham sido mencionados, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigado!

RESUMO

CAETANO, G. F. **Células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo e fração proteica do látex natural (*Hevea brasiliensis*) associados à *scaffolds* de policaprolactona e grafeno na osteogênese experimental.** 2017. 191 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Defeitos ósseos assumem importância na crescente prevalência de condições crônicas de saúde, agravando-se conforme o envelhecimento da população. O tratamento convencional baseia-se no transplante autólogo e abordagens extremamente invasivas. Uma proposta promissora é a obtenção de tecidos saudáveis em laboratórios utilizando suportes tridimensionais porosos (*scaffolds*) que atuarão como arcabouço para o crescimento e diferenciação de células tronco mesenquimais (CTMs) podendo ser otimizados para proporcionar adequada vascularização, uma importante característica na regeneração óssea. CTMs apresentam potencial de diferenciação, imunoregulação e angiogênese. O pico proteico F1 do soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* apresenta importante atividade angiogênica e cicatrizante. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de *scaffolds* de policaprolactona (PCL) colonizados com CTMs na osteogênese experimental *in vitro* e *in vivo* (xenotransplante), a segurança e a influência do pico F1 do látex em cultura de CTMs aplicadas no *scaffold* de PCL e PCL reforçado com diferentes concentrações de grafeno (PCL/grafeno) na proliferação e diferenciação osteogênica. Para isso, as CTMs foram isoladas do tecido adiposo humano (ADSCs), caracterizadas por imunofenotipagem e diferenciação *in vitro*. *Scaffolds* de PCL, produzidos por técnica de manufatura aditiva, foram avaliados quanto ao potencial de adesão/viabilidade celular (ensaio MTT), diferenciação osteogênica (vermelho de alizarina) e potencial *in vivo* de osteointegração e osteoindução em defeito crítico de calvária avaliados por histologia e imunoistoquímica. O pico F1 do látex, em diferentes concentrações, foi avaliado em cultura de ADSCs e fibroblastos 3T3 quanto a citotoxicidade (MTT), potencial proliferativo (timidina-tritiada), migratório (*scratch assay*) e indução osteogênica (fosfatase alcalina). *Scaffolds* de PCL foram reforçados com grafeno (PCL/grafeno), revestidos com pico F1 (adsorção), avaliados quanto a viabilidade/proliferação celular (*Alamar blue*) e diferenciação osteogênica (fosfatase alcalina e vermelho de alizarina). A imunofenotipagem das ADSCs demonstrou baixa percentagem para marcadores negativos, alta para os positivos e diferenciação *in vitro*, comprovando o sucesso do isolamento e manutenção das ADSCs. O *scaffold* de PCL apresentou não-toxicidade e diferenciação osteogênica induzida pelo meio de cultura. *Scaffolds* de PCL, pré-colonizado e não colonizado com ADSCs, foram implantados em defeito crítico de calvária de ratos. O grupo que recebeu *scaffolds* com ADSCs humanas proporcionou melhor formação óssea no animal, com participação direta e indireta das ADSCs neste processo. Nos ensaios *in vitro* com o pico F1 (cultura 2D), observou-se estímulo proliferativo para as concentrações de 0.00001% e 0.0001%, além de maior percentagem de migração celular para as concentrações de 0.001%, 0.0001% e 0.00001%, diferentes do controle. Os *scaffolds* de PCL/grafeno demonstraram estímulo proliferativo quando colonizados por ADSCs e este estímulo foi ainda maior em *scaffolds* revestidos com F1, principalmente na concentração de 0.75% de grafeno. Embora o pico F1 não tenha potencializado a diferenciação osteogênica em cultura 2D, este estímulo foi observado em *scaffolds* revestidos com F1 com superior atividade da fosfatase alcalina. Este trabalho demonstrou sucesso no emprego de ADSCs humanas e *scaffolds in vitro* e *in vivo* (transplante xenogênico) para regeneração óssea, além de apresentar dois promissores produtos para engenharia tecidual como os *scaffolds* com reforço de grafeno em baixas concentrações e o pico proteico F1 na proliferação e diferenciação celular.

Palavras-chave: 1. Células tronco; 2. Grafeno; 3. *Hevea brasiliensis*; 4. Látex; 5. Regeneração Óssea; 6. Suporte tridimensional.

ABSTRACT

CAETANO, G. F. **Adipose-derived multipotent stromal cells and natural latex protein fraction (*Hevea brasiliensis*) associated with polycaprolactone and graphene scaffolds in experimental osteogenesis.** 2017. 191 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The increment of life expectancy and frequency of chronic diseases in the population has led to an increasing incidence of chronic bone defects. Conventional treatment is based on autologous transplantation, which depends on extremely invasive approaches. A promising proposal is to obtain healthy tissues in laboratories using porous three-dimensional matrix (scaffolds), which enable cellular growth and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). Scaffolds can be optimized to provide adequate vascularization, a critical event to bone regeneration. MSCs have potential for differentiation, immunoregulation and angiogenesis. F1 natural latex protein from *Hevea brasiliensis* rubber tree presents important angiogenic and healing activity. The objective of this work was to investigate the influence of pre-colonized polycaprolactone (PCL) scaffolds on experimental *in vitro* and *in vivo* osteogenesis (xenotransplantation) and also the safety and influence of F1 protein on MSCs seeded on PCL and PCL reinforced with different concentrations of graphene scaffolds (PCL/graphene) in cell proliferation and osteogenic differentiation. MSCs were isolated from human adipose tissue (ADSCs), characterized by positive and negative markers and also *in vitro* differentiation. PCL Scaffolds, produced by an additive manufacturing technique, were evaluated for cell adhesion/viability potential (MTT assay), osteogenic differentiation (alizarin red) and *in vivo* xenogenic grafting potential for osteointegration and osteoinduction evaluated by histology and immunohistochemistry. F1 latex protein, prepared in different concentrations, was evaluated in contact with ADSCs and 3T3 fibroblasts culture *in vitro* regarding to cytotoxicity (MTT), proliferative potential (tritiated thymidine), migratory (scratch assay) and osteogenic induction (alkaline phosphatase). PCL scaffolds were reinforced with graphene (PCL/graphene scaffolds), coated with F1 protein (adsorption) and evaluated for cell viability/proliferation assay (Alamar blue) and osteogenic differentiation (alkaline phosphatase and alizarin red). ADSCs showed low percentage for negative markers, high percentage for positive markers and differentiation properties *in vitro*, providing enough information on the successful isolation and maintenance of human ADSCs. PCL scaffolds showed non-toxicity activity and osteogenic differentiation induced by culture medium. PCL scaffolds, pre-colonized and non-colonized with ADSCs, were implanted in a critical calvarial defect in rats. The group of rats which received scaffolds with ADSCs to treat the bone defect had improved bone formation with direct and indirect participation of ADSCs to the bone repair process. To *in vitro* assays with F1 (2D culture model), proliferative stimulus was observed to F1 0.00001% and 0.0001% samples, in addition to a higher percentage of cell migration to 0.001% and 0.0001%, different from control. PCL/graphene scaffolds demonstrated proliferative stimulation when colonized by ADSCs and this stimulus was even higher to F1 coated PCL/graphene scaffolds, mainly to 0.75% graphene. Although F1 have not enhanced osteogenic differentiation on 2D cell culture model, the stimulus was observed to F1 coated scaffolds with higher alkaline phosphatase activity. This work demonstrated success in the use of ADSCs and scaffolds for bone regeneration and presented two promising products to be applied in tissue engineering field, such as, scaffolds with graphene reinforcement at low concentration and F1 latex protein to improve cell proliferation and differentiation.

Keywords: 1. Bone Regeneration; 2. Graphene 3. *Hevea brasiliensis*; 4. Latex; 5. Scaffold; 6. Stem Cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeito parácrino das células tronco mesenquimais multipotentes para aplicação na regeneração tecidual (adaptado de da Silva-Meirelles et al., 2009) 38
Figura 2	(A) Representação virtual dos <i>scaffolds</i> para impressão. (B) Sistema de manufatura aditiva por extrusão <i>3D Discovery</i> 51
Figura 3	Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) cultivadas em placa de cultura 71
Figura 4	Imunofenotipagem das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano. Percentagem de expressão dos anticorpos de superfície celular 72
Figura 5	Diferenciação <i>in vitro</i> das células mesenquimais estromais derivadas do tecido adiposo humano em osteoblastos (Diferenciação osteogênica), em adipócitos (Diferenciação adipogênica) e seus controle (Sem diferenciação) 74
Figura 6	Quantificação <i>in vitro</i> da atividade da fosfatase alcalina em cultura de ADSCs em meio de cultura osteogênico e meio de cultura basal nos tempos 3, 7, 4 e 21 dias. Os valores estão expressos de acordo com a densidade ótica (D.O). Teste estatístico <i>Two-way ANOVA</i> com pós-teste de <i>Bonferroni</i> . * Evidência de diferença estatística entre os grupos 75
Figura 7	Caracterização e avaliação das ADSCs cultivadas em meio de cultura basal e meio de cultura indutor osteogênico por 28 dias. (A) Perfil imunofenotípico expresso em percentagem de marcação dos anticorpos. (B) Coloração com vermelho de alizarina. (C) Atividade da fosfatase alcalina. Teste estatístico teste <i>t-student</i> . * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) entre os grupos 77
Figura 8	(A) <i>Scaffold</i> de PCL utilizado nos ensaios com as dimensões de impressão. (B) Reconstrução virtual do <i>scaffold</i> utilizado por micro-CT..... 78
Figura 9	ADSCs associadas ao <i>scaffold</i> de policaprolactona pelo ensaio MTT após 14 dias em cultura. (A) Visão macroscópica da coloração púrpura dos cristais de formazan formados. (B) <i>Scaffolds</i> com células e um <i>scaffold</i> sem células (seta vermelha). (C) Imagem em microscopia de campo claro (aumento 100x) dos <i>scaffolds</i> após incubação com MTT. (D) Quantificação da cor púrpura nos <i>scaffolds</i> expressos de acordo com densidade ótima obtida (espectrofotômetro 570nm). Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> . * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao grupo sem células 80

- Figura 10** Diferenciação osteogênica das ADSCs no *scaffold* de PCL e coloração com vermelho de alizarina após 28 dias em cultura com meio indutor osteogênico e meio de cultura basal. A cor vermelha demonstra a mineralização da matriz extracelular. (A) Visão macroscópica dos *scaffolds*. A seta amarela aponta um *scaffold* controle (sem diferenciação). (B) Imagem em microscopia de campo claro (aumento 100x) dos *scaffolds* após coloração. (C) Quantificação da cor vermelha. Os valores no gráfico estão expressos de acordo com densidade ótima obtida (espectrofotômetro 405 nm). Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste Tukey. * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) entre os grupos 82
- Figura 11** Osso da calvária extraído dos animais após o sacrifício. (A) Osso da calvária mostrando defeito no osso parietal direito do grupo sem *scaffold*. (B) Osso da calvária mostrando defeito no osso parietal direito do grupo com *scaffold*. (C) *Scaffold* implantado em aumento maior 83
- Figura 12** Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 50x) coradas com hematoxilina e eosina em cada grupo experimental. Nas imagens é possível observar o osso antigo (OB), novo osso em formação (NB), tecido conjuntivo (CT) e poro do *scaffold* (P). Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas) 85
- Figura 13** Percentagem de novo osso (NB) e tecido conjuntivo (CT) formados quantificados pelo *ImageJ* a partir das imagens histológicas coradas com hematoxilina e eosina em aumento de 50x. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste Tukey. * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em comparação aos outros grupos quanto a quantificação do NB; # Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação aos grupos SCA, SUC e SDC comparados ao NBR quanto a quantificação do CT. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas) 86
- Figura 14** Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 50x e 200x) coradas com Tricrômio de Masson. A cor vermelha indica mineralização óssea, enquanto a cor azul indica tecido conjuntivo de colágeno, cartilagem. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas) 87
- Figura 15** Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas. Marcação anti-mitocondrial humano (MIT). (A) Imagens aumento 400x. (B) Imagens aumento 400x com ampliação dando destaque na marcação intra-citoplasmática. As marcações podem ser identificadas pela cor ocre intensa. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas) 89

Figura 16	Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 400x). Marcação anti-BMP-2. As marcações podem ser identificadas pela cor ocre intensa. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (<i>scaffold</i> de PCL); SUC (<i>scaffold</i> de PCL com ADSCs); SDC (<i>scaffold</i> de PCL com ADSCs pré-diferenciadas) 90
Figura 17	Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 400x). Marcação anti-CD31. As marcações podem ser identificadas pela cor ocre intensa. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (<i>scaffold</i> de PCL); SUC (<i>scaffold</i> de PCL com ADSCs); SDC (<i>scaffold</i> de PCL com ADSCs pré-diferenciadas) 91
Figura 18	Percentual de viabilidade celular em relação à cultura controle (100% células viáveis) após 24 horas. (A) ADSCs humanas. (B) fibroblastos 3T3. Controle Negativo (Contr. Negat.), pico proteico F1 do látex (F1 0.1% a 0.0001%). Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> . *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo 93
Figura 19	Percentual de viabilidade celular em relação à cultura controle (100% células viáveis) após 48 horas. (A) ADSCs humanas. (B) fibroblastos 3T3. Controle Negativo (Contr. Negat.), pico proteico F1 do látex (F1 0.1% a 0.0001%). Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> . *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo 93
Figura 20	Percentual de viabilidade celular em relação à cultura controle (100% células viáveis) após 72 horas. (A) ADSCs humanas. (B) fibroblastos 3T3. Controle Negativo (Contr. Negat.), pico proteico F1 do látex (F1 0.1% a 0.0001%). Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> . *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo 94
Figura 21	Proliferação celular pela incorporação da Timidina- H^3 . Percentual de proliferação das ADSCs tratadas com pico proteico F1 do látex em relação ao meio de cultura controle. (A) 24 horas e (B) 48 horas. Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> . * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle basal (proliferação basal) 95
Figura 22	Proliferação celular pela incorporação da Timidina- H^3 . Percentual de proliferação de fibroblastos 3T3 tratados com pico proteico F1 do látex em relação ao meio de cultura controle. (A) 24 horas e (B) 48 horas. Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> . * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle basal (proliferação basal) 96
Figura 23	Imagem por microscopia de fluorescência do ensaio <i>scratch assay</i> de fibroblastos 3T3 e ADSCs. A lesão artificial foi tratada com meio de cultura basal, meio de cultura basal suplementado com F1 e DMSO (controle negativo). A migração celular foi avaliada após 24 horas em todos os grupos 97

Figura 24	Percentagem de migração celular em culturas tratadas com o pico proteico F1 em relação à cultura basal. (A) ADSCs humanas. (B) Fibroblastos 3T3. Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> . *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle basal (proliferação basal) 97
Figura 25	Quantificação <i>in vitro</i> da atividade da fosfatase alcalina em cultura de ADSCs em meio de cultura basal, osteogênico (controle) e osteogênico suplementado com duas concentrações de F1 avaliados por 7, 14 e 21 dias. Valores expressos de acordo com a densidade ótica. Teste estatístico <i>Two-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Bonferroni</i> . *Evidência de diferença estatística em comparação com grupo basal 98
Figura 26	Quantificação <i>in vitro</i> da atividade da fosfatase alcalina em cultura de ADSCs em meio de cultura basal, osteogênico (controle) e osteogênico suplementado com F1 avaliados por 7, 14 e 21 dias. As ADSCs foram previamente tratadas com F1 em meio basal por 5 dias antes do início da diferenciação. Valores expressos de acordo com a densidade ótica. Teste estatístico <i>Two-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Bonferroni</i> . *Evidência de diferença estatística em comparação com grupo basal 99
Figura 27	<i>Scaffold</i> de PCL/grafeno 0.75% (negro) e <i>scaffold</i> de puro PCL (branco) produzido por manufatura aditiva 100
Figura 28	Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura em corte transversal dos <i>scaffolds</i> de puro PCL e com diferentes concentrações de grafeno. (A) 0%; (B) 0.25%; (C) 0.50%; (D) 0.75% 101
Figura 29	Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura. Observação da camada superior e parte interna (corte transversal) dos <i>scaffolds</i> de PCL/grafeno (0.75%) e puro PCL 101
Figura 30	Viabilidade/proliferação das ADSCs cultivadas nos <i>scaffolds</i> de PCL e PCL/grafeno em diferentes concentrações após 3, 7 e 14 dias em cultura. Teste estatístico <i>Two-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Bonferroni</i> . * Evidência de diferença estatística entre os grupos 103
Figura 31	Avaliação da adesão e morfologia das ADSCs nos <i>scaffolds</i> de puro PCL e PCL/grafeno em três diferentes concentrações cultivadas em meio de cultura basal. (A) Imagens por microscopia eletrônica de varredura em diferentes regiões dos diferentes <i>scaffolds</i> cultivados por 21 dias. O asterisco vermelho indica a presença de células. (B) Imagens por microscopia confocal dos diferentes <i>scaffolds</i> cultivados por 28 dias 105

- Figura 32** Adsorção e liberação do pico proteico F1 pelos *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno nas diferentes concentrações. (A) Quantificação da concentração inicial de F1 utilizada na adsorção, F1 não adsorvida e F1 adsorvida pelos *scaffolds*. (B) Curva da concentração proteica liberada pelos *scaffolds* em cada tempo de análise. (C) Curva da concentração proteica cumulativa liberada pelos *scaffolds* 107
- Figura 33** Viabilidade/proliferação celular pelo método *Alamar Blue* nos *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno em diferentes concentrações, revestidos e não revestidos com F1 nos tempos 7, 14 e 21 dias. Valores expressos pela intensidade da fluorescência obtida. Teste estatístico *Two-way ANOVA*, pós-teste *Bonferroni*. * Evidência de diferença estatística entre os grupos109
- Figura 34** Avaliação da adesão e morfologia das ADSCs por microscopia eletrônica de varredura nos *scaffolds* de PCL/grafeno 0.75% revestido com F1 cultivado em meio basal. O asterisco vermelho indica a presença de células 110
- Figura 35** Atividade da fosfatase alcalina em *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno revestidos e não revestidos com o pico proteico F1. (A) Atividade da ALP após 7 dias. (B) 14 dias. (C) 21 dias. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. * Evidência de diferença estatística do grupo *scaffolds* + F1 em meio osteogênico em relação aos outros grupos. #Evidência de diferença estatística do grupo *scaffolds* em meio osteogênico em relação a ambos os grupos cultivados em meio basal 112
- Figura 36** Quantificação da deposição de cálcio na matriz extracelular nos *scaffolds* puro PCL e PCL/grafeno em diferentes concentrações, revestidos e não revestidos com o pico proteico F1 cultivados em meio indutor osteogênico e meio basal. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. # Evidência de diferença estatística do grupo *scaffolds* em meio osteogênico em relação a ambos os grupos cultivados em meio basal 113
- Figura 37** Avaliação da adesão e morfologia das ADSCs nos *scaffolds* revestidos com pico proteico F1 cultivadas em meio indutor osteogênico por 28 dias. (A) Imagens por microscopia eletrônica de varredura nos diferentes *scaffolds* em diferentes aumentos. O asterisco vermelho indica a presença de células. (B) Imagens por microscopia confocal dos diferentes *scaffolds* em 2 aumentos distintos 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fases sobrepostas da regeneração óssea e principal função de cada fase. Adaptado de Karnes et al. (2015).....	27
Tabela 2	Requisitos biológicos a mecânicos para o emprego de materiais como suporte celular (adaptada de Bartolo et al, 2009a)	33
Tabela 3	Parâmetros utilizados para impressão de suportes poliméricos	51

SUMÁRIO

1	<i>Introdução</i>	23
1.1	Tecido ósseo.....	24
1.2	Regeneração óssea.....	25
1.3	Enxerto ósseo.....	28
1.4	Engenharia tecidual e <i>scaffolds</i>	31
1.5	Células tronco.....	36
1.6	Pico proteico F1 do soro do látex da seringueira <i>Hevea brasiliensis</i>	41
2	<i>Objetivos</i>	43
2.1	Objetivo geral.....	44
2.2	Objetivos específicos.....	44
3	<i>Material e Métodos</i>	45
3.1	Isolamento e caracterização das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano (ADSCs).....	46
3.1.1	Isolamento das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano.....	46
3.1.2	Imunofenotipagem das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano.....	47
3.1.3	Diferenciação <i>in vitro</i> das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano.....	48
3.1.4	Diferenciação osteogênica pela atividade da fosfatase alcalina <i>in vitro</i> ..	49
3.2	Materiais para produção dos suportes poliméricos 3D.....	49
3.3	Fabricação dos suportes poliméricos 3D.....	50
3.4	Selante de fibrina do plasma humano.....	51
3.5	Inoculação das ADSCs nos <i>scaffolds</i>	52
3.6	Avaliação da aderência e viabilidade celular pelo ensaio de MTT no <i>scaffold</i> de policaprolactona.....	53
3.7	Diferenciação osteogênica das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano no <i>scaffold</i> de policaprolactona.....	54
3.8	Avaliação da osteogênese experimental em modelo animal induzida por <i>scaffold</i> de policaprolactona associado a ADSCs.....	54
3.8.1	Defeito ósseo crítico: modelo animal (calvária).....	55
3.8.2	Estudo histológico e quantificação do novo tecido formado.....	57
3.8.3	Imunoistoquímica.....	58

3.9	Estudo da interação do pico proteico F1 do látex da seringueira <i>Hevea brasiliensis</i> nas células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano	59
3.9.1	Análise da viabilidade /citotoxicidade celular	59
3.9.2	Análise da proliferação celular	61
3.9.3	Ensaio de migração/proliferação celular.....	62
3.9.4	Diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> na presença da proteína F1.....	63
3.10	Associação do pico proteico F1 nos <i>scaffolds</i> e ensaio de liberação de proteína <i>in vitro</i>	63
3.11	Avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo <i>Alamar Blue</i> no <i>scaffold</i> de policaprolactona e policaprolactona/grafeno incubados com F1	64
3.12	Diferenciação celular osteogênica nos <i>scaffolds</i> de policaprolactona e policaprolactona/grafeno incubados com F1	65
3.13	Caracterização morfológica.....	66
3.13.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	66
3.13.2	Análise das células aderidas nos <i>scaffolds</i> por microscopia confocal...67	
3.13.3	Reconstrução do modelo de <i>scaffold</i> utilizado por tecnologia micro-CT (μ CT) 68	
3.14	Análise dos resultados	68
4	<i>Resultados</i>	70
4.1	Isolamento, expansão e caracterização das células mesenquimais estromais derivadas do tecido adiposo (ADSCs)	71
4.1.1	Isolamento das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano.....	71
4.1.2	Caracterização das ADSCs por imunofenotipagem	72
4.1.3	Caracterização das ADSCs por diferenciação <i>in vitro</i>	73
4.1.4	Avaliação da diferenciação osteogênica das ADSCs pela atividade da fosfatase alcalina	75
4.1.5	Avaliação por imunofenotipagem das ADSCs pós-diferenciação osteogênica.....	76
4.2	Avaliação das ADSCs do <i>scaffold</i> de policaprolactona aplicados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> 78	
4.2.1	Avaliação da aderência e viabilidade das ADSCs no <i>scaffold</i> de PCL	78
4.2.2	Avaliação da diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> das ADSCs no <i>scaffold</i> de PCL 81	
4.2.3	Aplicação do <i>scaffold</i> de PCL em modelo animal de regeneração óssea (calvária).....	83
4.2.4	Avaliação histológica do novo tecido formado	84
4.2.5	Avaliação qualitativa histológica (Trirômio de Masson)	86
4.2.6	Avaliação qualitativa por imunoistoquímica	88
4.3	Avaliação da influência do pico proteico F1 do látex natural nas ADSCs	92
4.3.1	Avaliação da viabilidade celular na presença do pico proteico F1.....	92

4.3.2	Avaliação da proliferação celular na presença do pico proteico F1	94
4.3.3	Avaliação da migração celular na presença do pico proteico F1	96
4.3.4	Diferenciação <i>in vitro</i> das ADSCs na presença do pico proteico F1	98
4.4	<i>Scaffolds</i> de policaprolactona incorporados com grafeno (PCL/grafeno) e bioativados com o pico proteico F1 do látex natural em cultura com ADSCs	100
4.4.1	Caracterização morfológica dos <i>scaffolds</i>	100
4.4.2	Avaliação da viabilidade/proliferação das ADSCs nos <i>scaffolds</i> de PCL/grafeno	102
4.4.3	Adesão das ADSCs nos <i>scaffolds</i> por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal.....	103
4.4.4	Incorporação e liberação do pico proteico F1 pelos <i>scaffolds</i>	106
4.4.5	Análise da viabilidade/proliferação das ADSCs nos <i>scaffolds</i> revestidos pelo pico proteico F1.....	108
4.4.6	Adesão e morfologia das ADSCs no <i>scaffold</i> de PCL/grafeno 0.75% revestido com F1 por microscopia eletrônica de varredura.....	110
4.4.7	Análise da atividade da fosfatase alcalina na diferenciação osteogênica das ADSCs nos <i>scaffolds</i> revestidos pelo pico proteico F1.....	111
4.4.8	Deposição de cálcio na matriz extracelular pelas ADSCs em <i>scaffolds</i> revestidos pelo pico proteico F1	113
4.4.9	Adesão e morfologia das ADSCs cultivadas em meio indutor osteogênico nos <i>scaffolds</i> por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal	114
5	<i>Discussão</i>	116
6	<i>Conclusões</i>	140
	<i>Referências</i>	142
	<i>Anexos</i>	162
	<i>Artigos publicados</i>	166

1 Introdução

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, resistente, mineralizado e vascular, que compõe os ossos, formando o sistema esquelético. O osso fornece suporte para o tecido muscular, proteção dos órgãos internos, contínuo provedor de novas células sanguíneas a partir da medula óssea e reservatório mineral de íons como cálcio e fosfato (CZEKANSKA et al., 2012). O sistema esquelético adulto é basicamente composto de 2 formas estruturais: trabecular, também chamado de osso esponjoso; e cortical ou osso compacto. O osso cortical é quase totalmente sólido, formado por lamelas ósseas paralelas e justapostas, aproximadamente 10% poroso, enquanto o osso trabecular apresenta elevada porosidade, variando de 50% a 90%. No entanto, sua resistência a tensão é aproximadamente 20 vezes menor. A proporção de ambas as formas ósseas estruturais diferem da localização no sistema esquelético (HAO; HARRIS, 2008).

O tecido ósseo é basicamente formado por 3 constituintes que compõem sua parte estrutural: (1) uma porção mineral inorgânica (65% - 70%), composta por fosfato de cálcio que interage com o hidróxido de cálcio, dando origem a hidroxiapatita e nanocristais de fosfato de cálcio que são envoltos por (2) uma fase orgânica (25% - 30%, principalmente colágeno tipo I); e (3) componente celular, tais como células osteoprogenitoras, também conhecidas como células mesenquimais, localizadas na camada celular do periósteo, no endósteo e na linha vascular de passagem da matriz medular (AI-AQL et al., 2008; KARNES et al., 2015; SANTO et al., 2013). Tanto o periósteo quanto o endósteo são membranas conjuntivas que revestem as superfícies ósseas em suas partes externa e interna, respectivamente. Estas membranas são ricamente vascularizadas e delas partem vasos que penetram pelos inúmeros forames da superfície óssea e, sendo ainda uma fonte de osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas, auxiliam no suprimento celular na reparação óssea (MALIZOS; PAPATHEODOROU, 2005; SCHINDELER et al., 2008).

Os osteoblastos, situados nas regiões periféricas do tecido ósseo, são responsáveis pela deposição de matriz extracelular (MEC) e formação óssea; os osteócitos, derivados dos osteoblastos após estes sintetizarem a matriz, ficam situados em lacunas da matriz. São células sem potencial de divisão responsáveis pela manutenção da massa e da estrutura óssea; os osteoclastos por sua vez são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção da matriz extracelular óssea e mobilização de íons de cálcio e fosfato da matriz extracelular óssea para a corrente sanguínea. A MEC é composta principalmente de proteínas fibrosas de colágeno com capacidade de mineralização, onde íons de cálcio e fosfato são ligados ao colágeno I e II, por ação das sialoproteínas ósseas e fosfatases alcalinas (AKERS; DENBOW, 2008; CHEN et al., 2012; OLSZTA et al., 2007; ROSS et al., 2012).

1.2 Regeneração óssea

O processo de reparo ósseo é complexo, multifatorial e contínuo, semelhante ao processo de cicatrização de úlceras cutâneas (TERHEYDEN et al., 2012). Há participação de elementos celulares e extracelulares específicos como citocinas e fatores de crescimento com função de coordenar todo processo regenerativo (LUI et al., 2010; STOJADINOVIC et al., 2008). O desenvolvimento ósseo pode ocorrer por dois principais mecanismos: ossificação endocondral ou intramembranosa.

O mecanismo de ossificação endocondral é o responsável pela formação da maioria dos ossos do esqueleto, principalmente nos ossos longos. Neste processo, células tronco mesenquimais (CTMs) são recrutadas para o local da lesão via fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), um agente quimiotático liberado principalmente por macrófagos durante o processo inflamatório. TNF- α ainda induz a proliferação e diferenciação de CTMs via indução à secreção da proteína óssea morfogenética tipo 2 (BMP-2) por osteoblastos do tecido ao redor à lesão (BORRELLI et al., 2012; KARNES et

al., 2015; LU et al., 2012; MOUNTZIARIS et al., 2010; ZHAO et al., 2013). No entanto, altos níveis de TNF- α podem aumentar a reabsorção óssea e inibir a osteogênese (ZHAO et al., 2013). Após o influxo celular, a diferenciação das CTMs, inicialmente em condrócitos, estimulada via fator transformador de crescimento beta (TGF- β), proporciona a produção de um suporte de cartilagem inicial e a melhora na força mecânica tecidual. Este suporte cartilaginoso atuará como molde para as fases subsequentes, preenchendo a lacuna da fratura para formação de calo cartilaginoso (osso primário), característico pela presença de condrócitos hipertróficos (AI-AQL et al., 2008; KARNES et al., 2015).

A transição do calo primário para o calo ósseo tem início com a degradação/absorção da matriz cartilaginosa inicial, mineralização, apoptose dos condrócitos (mediada via TNF- α), diferenciação osteogênica das CTMs e neo-vascularização nos espaços deixados pelos condrócitos hipertróficos (KARNES et al., 2015; KAYAL et al., 2010; STREET et al., 2002). A indução da formação de uma rede de capilar no início do processo da reparação é reconhecida como passo essencial na osteogênese. As células dos capilares possuem relação direta na formação óssea devido à proximidade com os osteoblastos e células osteoprogenitoras. Deste modo, conseguem formar uma rede vascular mínima que permite suprimento nutricional suficiente para seu desenvolvimento (AI-AQL et al., 2008; BARANOSKI; AYELLO, 2004; KAIGLER et al., 2005; SCHINDELER et al., 2008).

O recrutamento de células osteoprogenitoras e diferenciação das CTMs em osteoblastos possibilita a produção da matriz óssea no local da matriz cartilaginosa inicial, dando origem ao calo ósseo. Embora o calo ósseo seja uma estrutura que proporcione uma estabilidade biomecânica, ele não restaura completamente as propriedades biomecânicas do osso normal (KARNES et al., 2015; SANTO et al., 2013; SCHINDELER et al., 2008). O calo ósseo é então remodelado por meio de um controlado processo de reabsorção pelos osteoclastos e deposição de osso lamelar pelos osteoblastos, fase mais longa do processo de regeneração óssea (AI-AQL et al., 2008; KARNES et al., 2015).

Por outro lado, a ossificação intramembranosa ocorre na ausência de um molde cartilaginoso, onde o tecido ósseo se desenvolve diretamente pela ação de progenitores mesenquimais (SANTO et al., 2013. SCHINDELER et al., 2008). Este processo de formação óssea acontece no interior de membranas do tecido conjuntivo, mediado pela porção interna do periósteo. As células tronco mesenquimais se diferenciam em osteoblastos que, por sua vez, sintetizam a matriz, formando centros de ossificação primária. Vários desses centros de ossificação são formados simultaneamente dentro de uma membrana de tecido conjuntivo. Os osteoblastos ficam aprisionados nos espaços lacunares após sintetização da matriz e passam a ser chamados de osteócitos. Após síntese da matriz, os osteoclastos participam do processo na fase de remodelamento. Este é o processo formador da maioria dos ossos do crânio, tais como: frontal, parietal, occipital e temporal. Contribuem para o crescimento dos ossos curtos e o crescimento em espessura dos ossos longos (SHAPIRO, 2008; TETI, 2011).

A **Tabela 1** resume a sobreposição das fases da regeneração óssea, assim como a principal característica de cada uma delas.

Tabela 1 - Fases sobrepostas da regeneração óssea e principal função de cada fase. Adaptado de Karnes et al. (2015).

Tempo	Fase	Característica principal
1 – 3 dias	Inflamação aguda	Elevada migração de células tronco mesenquimais, proliferação e diferenciação
3 – 7 dias	Calo cartilaginoso (somente na endocondral)	Produção de matriz cartilaginosa
7 – 14 dias	calcificação e revascularização	Apoptose de condrócitos hipertróficos, Reabsorção da matriz e angiogênese
14 – 28 dias	Substituição tecidual para osso trabecular	Diferenciação de osteoblastos e ossificação
28 - > dias	Remodelamento	Intensa atividade de osteoclastos

Contudo, este potencial de cura não é adequado em casos de grande perda óssea, denominadas de defeitos críticos, decorrentes de traumas, defeitos genéticos, infecções, acidentes e tumores (GIANNOUDIS et al., 2005; SANTO et al., 2013). Nestes casos, ocorre uma invasão de tecido fibroso que pode preencher o espaço do defeito ósseo e impedir a formação da vascularização. Consequentemente, o processo de regeneração do osso é interrompido e não leva à união das estruturas, uma vez que o processo é dependente da formação de novos vasos sanguíneos (ZHANG et al., 2012). Estes representam uma causa significativa da morbidade crônica, não somente prejudicando a mobilidade de um paciente, mas também sua vida social e econômica. Assim, os casos de perda óssea significativa, sem potencial de regeneração, ainda representam um desafio para a comunidade médica (SAHAL et al., 2013).

1.3 Enxerto ósseo

Embora o campo da ortopedia tenha tido um importante desenvolvimento nas últimas décadas com o surgimento de novos produtos e técnicas cirúrgicas, o aumento da expectativa de vida e o rápido incremento da população idosa têm sido apontados como determinantes sociais da crescente prevalência de condições crônicas de saúde (ADACHI et al., 2010; HADJI et al., 2013; SEONG et al., 2010). A busca por padrões de vida superiores e maior longevidade tem gerado a necessidade de alternativas para o reparo ou substituição de tecidos vivos lesados por traumas ou patologias. Neste contexto, defeitos ósseos assumem importância visto que a prevalência de osteoporoses, fraturas osteoporóticas e defeitos críticos deverão aumentar conforme a população envelhece (HADJI et al., 2013; HUANG, S. T. et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015), 12.5% da população brasileira é considerada idosa e até a metade do século este número

chegará a 30%, duplicando até meados de 2050. Aproximadamente 2.2 milhões de transplantes ósseos são realizados em todo o mundo e um aumento na procura por cirurgias ortopédicas é esperado, principalmente para população de faixa etária mais avançada, onde estes buscam melhores padrão de vida (ADACHI et al., 2010; GIANNOUDIS et al., 2005; KONNOPKA et al., 2009; LAURENCIN; KHAN; EL-AMIN, 2014). Diante disso, torna-se relevante o estudo de enxertos ósseos para transplante de forma que estes estejam disponíveis e sejam mais acessíveis a população.

Um enxerto ósseo pode ser caracterizado de acordo com o modo de ação: osteocondução, osteoindução e osteogênese (MIRON; ZHANG, 2012). A osteocondução caracteriza-se pelo crescimento ósseo por meio da justaposição do osso circunjacente, ser biocompatível e permitir colonização celular. Contudo, um material osteocondutor inserido em um local ectópico (tecido celular subcutâneo, por exemplo), não tem a capacidade de promover o crescimento ósseo, permanecendo inalterado ou reabsorvido. A osteoindução permite o recrutamento celular e indução à diferenciação osteogênica para formação de novo tecido ósseo. Se tais materiais/agentes forem inseridos na região subcutânea sem resquícios ósseos presentes, estes têm potencial de indução à formação óssea no local ectópico. A proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) é um exemplo de um agente osteoindutor. A osteogênese refere-se ao crescimento ósseo derivado das células viáveis contidas dentro do enxerto a fim de produzir nova matriz óssea. O osso autógeno é o único material de enxerto disponível com propriedades de osteogênese. A sua forma mais eficaz é o osso esponjoso, que fornece a maior concentração de células ósseas.

Materiais considerados ideais para aplicação na enxertia devem possuir características como potencial de osteocondução, osteoindução e suportar e/ou promover a angiogênese. Além disso, estes materiais ainda precisam possuir segurança biológica, não ter restrições quanto ao tamanho, serem facilmente acessíveis a população e longo prazo de validade (HUANG, S. T. et al., 2016; HUANG, R. L. et al., 2016). A ausência de fonte de enxerto (força mecânica, microestrutura e função similares ao osso nativo) que não seja comprometido por rejeições e

infecções são os grandes problemas encontrados (ALHAG et al., 2012; CHAPEKAR, 2000; MASELLA; MEISTER, 2006).

Atualmente, o tratamento “padrão ouro” para defeitos ósseos críticos são os transplantes autólogos (autoenxertos), ou seja, células e/ou tecidos do próprio paciente, constituindo cerca de 58% dos transplantes. O transplante autólogo é considerado osteogênico, com capacidade de promover osteoindução, a osteocondução, não apresentam riscos de transmissão de doenças ou rejeições (JAMES et al., 2011; LICHTÉ et al., 2011). Contudo, pode-se mencionar algumas desvantagens como disponibilidade limitada, necessidade de cirurgia secundária para extração do tecido ósseo da parte do corpo doadora, prolongado tempo de internação hospitalar e risco de infecção local (LICHTÉ et al., 2011).

Uma alternativa à aplicação do autoenxerto é o transplante heterólogo (alotransplante/aloenxerto), ou seja, doação de tecido de outro paciente. Esta prática representa 34% dos transplantes ósseos e, embora previna de algumas desvantagens encontradas nos transplantes autólogos, ainda assim há limitações como disponibilidade, transmissão de doenças, infecções e rejeição. Neste sentido, encontra-se a possibilidade de utilização do banco de ossos, contudo, uma vez que os indivíduos são geneticamente diferentes, o tecido ósseo a ser doado e transplantado requer tratamento prévio para decelularização e assim reduzir a possibilidade de rejeição. Este tratamento impossibilita sua aplicação como característica de osteogênese, mas preserva as características osteocondutoras e osteoindutoras do enxerto. Com isso, a taxa de formação óssea proporcionada pelo aloenxerto é menor quando comparada ao autoenxerto (BASHA et al., 2015; JAMES et al., 2011; LICHTÉ et al., 2011).

O xenotransplante (ou xenoenxerto) é conhecido como transplante de células ou tecidos de um ser vivo para outro de outra espécie. Estes tem demonstrado poucos resultados concretos e pobre suporte da literatura para sua utilização no que diz respeito ao alto risco de transmissão de doenças e rejeição (ORYAN et al., 2014). As limitações encontradas nos três tipos de transplantes descritos acima (de acordo com

a origem do material a ser transplantado), como a necessidade de cirurgia secundária da área doadora (autólogo) ou riscos com transmissão de doenças e rejeições (heterólogo e xenotrasplante) podem ser superadas com a utilização de substitutos ósseos sintéticos.

De forma geral, os implantes sintéticos podem ser produzidos em laboratório de forma customizada de acordo com a necessidade do paciente (forma e tamanho do defeito ósseo). Esta abordagem alternativa para formação de um novo tecido ósseo *in vitro* veio à tona com a Engenharia de tecidos e/ou medicina regenerativa (CAMERON et al., 2015; LANGER; VACANTI, 1993).

1.4 Engenharia tecidual e *scaffolds*

A engenharia de tecidos, campo multidisciplinar da pesquisa que integra áreas da ciência e da engenharia, objetiva projetar, desenvolver e testar biomateriais, como possíveis substitutos teciduais, na tentativa de desenvolvimento e criação de uma forma alternativa para o reparo tecidual (CLARK et al., 2007; CORSI et al., 2007; SAHAI et al., 2013). Os biomateriais tem sido definido como "uma substância que tenha sido manipulada para assumir um formato para ser utilizada de forma direta, interagindo com os componentes do tecido vivo ao longo de qualquer procedimento diagnóstico ou terapêutico" (WILLIAMS, 2014).

Para o desenvolvimento e produção de substitutos ósseos ativos a engenharia tecidual baseia-se em três princípios: materiais de suporte para o influxo celular; células como elemento biológico para propiciar bioatividade; e fatores proteicos para estimulação e indução biológica (fatores de crescimento). Os biomateriais, preferencialmente com capacidade de osteocondução, são empregados para suportar a aderência celular e crescimento de um novo tecido. As células por sua vez contribuem para a osteoindução e a osteogênese, enquanto os fatores proteicos

estimulariam o recrutamento de diferentes tipos celulares, proliferação, diferenciação celular e osteoindução (EBERLI et al., 2011; MIRON, ZHANG et al., 2012).

Neste sentido, a biofabricação é definida como técnica de fabricação aditiva (camada a camada) por meio de materiais degradáveis, biocompatíveis, células, fatores de crescimento e proteínas para fabricação de suportes tridimensionais porosos (*scaffolds*), uma promissora ferramenta alternativa para transplantes e enxertia óssea (BARTOLO et al., 2012; CAETANO et al., 2016; ZONG et al., 2010). Esta proposta oferece as melhores perspectivas para a obtenção de tecidos complexos em laboratórios para serem empregados como uma matriz tridimensional para o crescimento celular de maneira organizada (BARTOLO et al., 2012; CAMERON et al., 2015; DIBA et al., 2012; DOMINGOS et al., 2009).

Scaffolds ideais devem possuir características estruturais capazes de garantir suficiente força mecânica e estrutural com adequado espaço interno para formação de novos vasos sanguíneos e ausência de qualquer reação adversa. Deste modo, os *scaffolds* têm o propósito de permitir a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de fornecer e manter fatores de crescimento, permitir a difusão de nutrientes e oxigênio para as células, estabelecendo assim um microambiente mecânico e biológico apropriado para a regeneração organizada de tecidos (BARTOLO et al., 2008; CAMERON et al., 2015; DOMINGOS et al., 2009; GLOTZBACH et al., 2011). A **Tabela 2** resume alguns dos requisitos esperados para um *scaffold* do ponto de vista biológico e mecânico.

Tabela 2 - Requisitos biológicos a mecânicos para o emprego de materiais como suporte celular (adaptada de Bartolo et al, 2009a).

Requisitos biológicos	Requisitos mecânicos
Biocompatibilidade. Materiais não tóxicos que permitam adesão, proliferação e diferenciação celular.	Resistência e durabilidade suficientes para suportar o estresse mecânico dentro do tecido do paciente.
Biodegradabilidade. Materiais devem degradar e formar bioprodutos não tóxicos. Controlada taxa de degradação para acompanhar a taxa de regeneração tecidual.	Facilmente esterilizáveis. Suportar altas temperaturas ou imersão em agentes de esterilização, mantendo-se íntegro em qualquer procedimento.
Porosidade, interconectividade e microestruturas adequadas para permitir o influxo celular, adesão e formação de novos vasos sanguíneos (vascularização).	Superfície e padrões adequados para suportar e garantir a ligação mecânica entre o <i>scaffold</i> e o tecido vivo do paciente.

Há diferentes polímeros naturais sendo utilizados na engenharia tecidual na tentativa de alcançar resultados ideais para um biomaterial, incluindo colágeno, alginato, ácido hialurônico, quitosana, entre outros (SEEHerman; WOZNEY, 2005). A maioria dos polímeros naturais pesquisados são biocompatíveis, porém possuem algumas desvantagens como imunogenicidade, dificuldade no processamento e estabilização química. Por outro lado, polímeros sintéticos podem fornecer excelente propriedade química e estrutural devido à flexibilidade de processamento do material desejado, monitorando peso molecular, grupos funcionais, conformações das cadeias químicas e porosidade. Estes possuem mínimos riscos a rejeição e podem ser produzidos de forma customizada com propriedades mecânicas otimizadas (KHAN et al, 2008). Contudo, uma desvantagem é a possibilidade de resposta inflamatória e ausência de bioatividade natural, limitando as funções biológicas (SASMAZEL, 2011).

A policaprolactona (PCL) é um biomaterial sintético, poliéster alifático linear reabsorvível semi-cristalino, com baixo ponto de fusão (60°C), fácil processamento e excelente candidato a ser utilizado na engenharia tecidual para regeneração óssea devido às vantagens de biocompatibilidade, bioreabsorção, estabilidade estrutural e mecânica, aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (BARTOLO et al., 2009b; KWEON et al., 2003; SASMAZEL, 2011; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Sua taxa de degradação é lenta quando implantado no corpo humano e gera menor quantidade de bioprodutos ácidos, por consequência menor inflamação comparado a outros materiais sintéticos, o que pode trazer vantagens quando o objetivo é que o material implantado permaneça por mais tempo integrando-se ao tecido (PARK et al., 2012; PARTEE et al., 2005; SCHANTZ et al., 2006; SMITH et al., 2007; WONG et al., 2007). No entanto, *scaffolds* de PCL não contém bioatividade e são caracterizados como de natureza hidrofóbica (WILLIAMS et al., 2005).

O grafeno é um material que tem recentemente recebido destaque com promissora utilização no campo da engenharia tecidual como suporte tridimensional eletro-ativo. Andre K. Geim e Konstantin S. Novoselov, ambos na Universidade de Manchester (Reino Unido), receberam o prêmio Nobel em Física (2010) por produzir, isolar, identificar e caracterizar o grafeno. Considerado como nanopartícula de carbono bi-dimensional, composto por camadas individuais de átomos de carbono em arranjos hexagonais, o que confere grande força e resistência em proporção ao seu peso, o grafeno conduz elétrons mais rápido do que qualquer outro material à temperatura ambiente (KUMAR; CHATTERJEE, 2016).

O grafeno pode desempenhar um papel importante para incrementar as propriedades dos materiais utilizados na produção de polímero, melhorando a solubilidade, a capacidade de processamento, as propriedades mecânicas e condutoras, e alterando significativamente suas propriedades como biomaterial, (GEIM; NOVOSELOV, 2007; KUILLA et al., 2010; WORSLEY et al., 2007). Alguns trabalhos têm apresentado compósitos à base de grafeno como materiais que podem apresentar potenciais riscos de toxicidade (KUMAR; CHATTERJEE, 2016; KUMAR et al,

2016.; WANG et al, 2011), enquanto outros estudos relatam sua boa compatibilidade e a capacidade de estimulação celular quando utilizado em associação com outros materiais para formar substratos para o crescimento celular (LI et al., 2011; KUMAR; CHATTERJEE, 2016; PARK et al, 2011; WANG et al., 2016a, 2016b).

A produção de implantes ósseos sintéticos requer complexa estrutura e estudos apurados para fabricação, pois necessita agregar tecnologia para construção adequada, levando-se em conta todos os parâmetros mecânicos e biológicos necessários, adequando-se à microestrutura tecidual, suportando o remodelamento tardio e forças de contração (BARTOLO et al., 2009a, 2009b; HAO; HARRIS, 2008).

Recentemente, diferentes métodos de fabricação automatizada têm sido empregados para fabricação de *scaffolds* com arquitetura bem definida (BARTOLO et al., 2009a; BROWN et al., 2011; PELTOLA et al., 2008; WOODRUFF; HUTMACHER 2010). Método de fabricação aditiva ou também conhecido como tecnologia de prototipagem oferecem potencial de fabricação de *scaffolds* camada a camada com extrema precisão e reprodutibilidade, auxiliados por imagem computacional combinado com técnicas de imagens médicas para impressão de implantes anatomicamente customizados (BALLYNS; BONASSAR, 2009; GIBBS et al., 2014; HOLLISTER, 2005).

Além disso, *scaffolds* altamente porosos e com tamanhos de poros adequados e interconectados faz-se necessário visando permitir influxo celular, suficiente suprimento de oxigênio e vascularização para promover a osteogênese (MALDA et al., 2005; KIM et al., 2010; ROUWKEMA et al., 2008). O crescimento ósseo é dependente de uma rede vascular para suprimento celular adequado. Assim, é fortemente proposto ser esta a razão do tecido ósseo ter a característica de regeneração sem formação de cicatriz (KIM et al., 2010).

Os *scaffolds* podem ser preenchidos com células vivas provenientes de biópsias ou de células estromais multipotentes, como as CTMs, que se proliferam na presença de fatores de crescimento e podem sofrer diferenciação na linhagem celular desejada,

criando um tecido vivo que poderá ser empregado como substituto tecidual (BARBANTI et al., 2005; LEVENBERG et al., 2003).

1.5 Células tronco

Células tronco são células indiferenciadas capazes de auto renovação, multiplicar-se por longo período de tempo permanecendo ao menos uma célula filha indiferenciada, enquanto a outra segue vias de diferenciação que formará células de reposição específicas de cada tecido. Este fenômeno é conhecido como replicação assimétrica. Desta forma as células tronco têm habilidade de divisão e geração de uma célula filha que retém o fenótipo que a originou, e uma célula de amplificação transitória, que sofre rápida proliferação e diferenciação (CHA; FALANGA, 2007; ROH; LYLE, 2006).

As células do estroma medular, conhecidas inicialmente como unidade formadora de colônias fibroblásticas, células tronco mesenquimais (CTMs) ou como células mesenquimais estromais multipotentes, proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006), são células tronco com propriedades de aderência ao plástico, formando colônias, de morfologia fibroblastóide e capacidade multipotencial de diferenciação. As CTMs são populações celulares raras que foram originalmente encontradas na medula óssea na década de 60 (FRIEDENSTEIN et al., 1966, 1974). Desde então, novas populações têm sido identificadas em outros tecidos, como tecido adiposo (GIMBLE; GUILAK, 2003; ZUK et al., 2001, 2002), cordão umbilical (KERN et al., 2006; WAGNER et al., 2005), músculos (JIANG et al., 2002), entre outros.

As CTMs são de fácil isolamento, expansão e cultivo *in vitro*. Uma variedade de marcadores de superfície celular pode ser empregada para se verificar a autenticidade e pureza das células após o isolamento e expansão. No entanto, não há marcadores específicos para as CTMs. Os mais conhecidos anticorpos utilizados são CD29

(integrina), CD44 (glicoproteína), CD49a (laminina e receptor de colágeno), CD73 (ecto-5' nucleotidase), CD90 (Thy-1, ancoragem celular), CD105 (endoglina, glicoproteína de membrana tipo I e CD271 (baixa afinidade para fator de crescimento de nervos). Há ainda ensaios imuno-negativos para as CTMs utilizando anticorpos de superfície característicos de células hematopoiéticas, como CD34, CD45, CD19, CD14, CD11b, CD79 α e HLA-DR (DAWSON et al., 2014).

As CTMs têm atraído a atenção de vários pesquisadores, pois são de grande interesse para o tratamento de diversas doenças humanas devido ao potencial regenerativo (multipotencialidade), podendo originar tipos celulares distintos de origem mesodérmica como osso, cartilagem, músculo, estroma da medula óssea, tendão, ligamento, gordura, entre outros tecidos conjuntivos (BITTENCOURT et al., 2006; DAI et al., 2016; DAI PRÈ et al., 2016). Além disso, as CTMs possuem habilidade de modular a função de diversas células do sistema imune, apresentam propriedades importantes de imunossupressão e imunorregulação (*in vitro* e *in vivo*), além de secretarem uma variada gama de moléculas e fatores proteicos com o intuito de equilibrar o microambiente de regiões lesadas (CAPLAN, 2007; da SILVA-MEIRELLES et al., 2009; LE BLANC; RINGDÉN, 2012; MURAGLIA; CANCEDDA; QUARTO, 2000).

Outra característica das CTMs é o efeito pleiotrópico que estas células exercem em células do sistema imune, pois são consideradas imuno-privilegiadas (não imunogênicas) devido ao fenótipo de MHC Classe I +, MHC Classe II -, CD40 -, CD80 - e CD86 -. Esta imunomodulação pelas CTMs é determinada pela liberação de citocinas imunossupressoras e anti-inflamatórias, como interleucinas e prostaglandinas, além de também regularem células T de forma antígeno-independente suprimindo a resposta de células T primárias e secundárias (ALMUBARAK et al., 2016; LE BLANC et al., 2004). Estas características favoreceriam a utilização das CTMs em alotransplantes pela capacidade de escapar da vigilância imunológica particular de cada paciente. No entanto, estudos tem sido conduzido no intuito de elucidar melhor o papel imunológico das CTMs antes de sua utilização para terapias (BERNARDO; FIBBE, 2013;

CAPLAN; CORREA, 2011; STAGG; GALIPEAU, 2013). A **Figura 1** resume as propriedades e o efeito parácrino da aplicação das CTMs.

Figura 1 - Efeito parácrino das células tronco mesenquimais multipotentes para aplicação na regeneração tecidual (adaptado de da Silva-Meirelles et al., 2009).

Em princípio, a terapia com CTMs poderia ser utilizada em clínicas para reparar uma variedade de defeitos ósseos sem morbidade do sítio doador (CAMERON et al., 2015; CHOI et al., 2012; HESLOP et al., 2015). Quando ocorre uma lesão, as CTMs têm a capacidade de estimular a proliferação e diferenciação de células tronco locais a fim de restabelecer o tecido perdido ou danificado por meio da cicatrização. Alguns fatores liberados pelas CTMs têm sido identificados, como TGF- β , SCF (fator de células tronco), IGF (fator de crescimento de insulina), EGF (fator de crescimento epidermal) e fatores de estimulação de macrófagos e granulócitos (ALMUBARAK et al., 2016; DI NICOLA et al., 2002).

No entanto, estudos sobre o potencial terapêutico destas células destacam uma diferença considerável entre o potencial experimental e a aplicação clínica. O grande interesse na utilização das CTMs contrasta com a escassez de entendimentos sobre sua atividade *in vivo*. Embora existam muitos trabalhos que descrevem as propriedades

das CTMs *in vitro*, poucos têm relatado suas características *in vivo*, tornando-se assim relevante o conhecimento da identidade e natureza destas células indiferenciadas e pós diferenciação (CHOI et al., 2012; HESLOP et al., 2015).

Assim, o emprego de CTMs humanas, mesmo que em modelos animais, pode favorecer um melhor entendimento do comportamento celular, sinalização e interação com tecido. Além da possibilidade de aquisição de resultados satisfatórios, podem ainda oferecer possibilidades importantes no fornecimento de células diferenciadas para medicina regenerativa (KASSEM et al., 2004).

Células tronco oriundas da medula óssea (BMSCs) são as mais comumente utilizadas na terapia celular. Inúmeros trabalhos descrevem a utilização destas células, *in vitro* e *in vivo*. Porém sua aplicação é limitada devido ao declínio do potencial de proliferação e diferenciação de acordo com a idade do doador e tempo de cultura celular, sendo assim um obstáculo à obtenção de quantidade celular suficiente para o emprego em terapia onde haja grande demanda (LEVI et al., 2011; MUELLER; GLOWACKI, 2001; STENDERUP et al., 2003).

Uma fonte alternativa interessante de CTMs para a engenharia tecidual são as derivadas de tecido adiposo (ADSCs – *Adipose-Derived mesenchymal Stem Cells*). As ADSCs compartilham características morfológicas, imunofenótípicas, multipotencialidade e imunomodulação das BMSCs (FRESE; DIJKMAN; HOERSTRUP, 2016; HASS et al., 2011; PUISSANT et al., 2005). Além disso, o tecido adiposo é uma fonte abundante e de fácil obtenção de ADSCs, o método de coleta utilizado é menos invasivo e apresenta menor custo em relação à aspiração da medula óssea, além de ser um material comumente desprezado em cirurgias de lipoaspiração ou abdominoplastias (BUTLER et al., 2010; FRESE; DIJKMAN; HOERSTRUP, 2016). Só nos EUA são realizadas mais de 400.000 lipoaspirações por ano (BUTLER et al., 2010).

Estas células têm a vantagem de ser obtida em grandes quantidades e possuir alta taxa de proliferação (GIROLAMO et al., 2008; LEE et al., 2008). De acordo com estudos de Jang et al. (2014), a população de BMSCs na medula óssea é de aproximadamente 0.42% e 4.28% na porção vascular estromal, enquanto as ADSCs

compõem 0.16% na medula óssea e 32% porção vascular estromal. Rider et al. (2008) demonstraram ainda que as ADSCs produzem maior quantidade de matriz extracelular quando cultivadas em meio indutor osteogênico, menor expressão de HLA e melhor potencial à diferenciação que as da medula óssea. Os autores sugerem que a habilidade de diferenciação elevada exibida é decorrente da maior taxa proliferativa.

O estudo de CTMs de diferentes fontes teciduais e o aprimoramento da cultura celular *in vitro* em suportes tridimensionais (3D) associados a agentes osteoindutores e angiogênicos tem se tornado promissor para futuros tratamentos de lesões ósseas (ALHAG et al., 2012; DÉGANO et al., 2007; KIM et al., 2010; TARE et al., 2012; YOON et al., 2007). Inúmeros são os fatores proteicos liberados por diversos números de células que estimulam a osteogênese e angiogênese. Dentre eles, destacam-se fatores de estimulação à angiogênese e a superfamília dos TGF, como BMP-2, BMP-7, BMP-9, TGF- β , etc (STEGEN et al., 2015).

Sugere-se que a incorporação e utilização de fatores de crescimento aceleraria a regeneração tecidual óssea (YUN et al., 2012). No entanto, o alto custo e a baixa meia-vida dos fatores de crescimento, principalmente a BMP-2, são limitações do emprego dos mesmos em terapias. A exploração e a utilização de CTMs em *scaffolds* em associação com fatores proteicos, para criar, de preferência, estratégias reprodutíveis e aprimoradas para reconstituir a formação vascular possibilitará a osteogênese funcional (CAMERON et al., 2015; STEGEN et al., 2015).

Diante disso, uma alternativa tem sido o estudo de diferentes moléculas bioativas naturais, de baixo custo com promissora interação celular para aplicação na engenharia tecidual, como as proteínas do látex natural (ARAVAMUDHAN et al., 2013; FRADE, 2003; HAN et al., 2013).

1.6 Pico proteico F1 do soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*

Diante da importância do estudo de novas proteínas com potencial angiogênico e osteoindutor, o látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, estudado desde 1994 pelo Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto (*in memoriam*) (Departamento de Bioquímica e Imunologia, FMRP-USP) e pelo Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade (Departamento de Clínica Médica, Divisão de Dermatologia, FMRP-USP), tem apresentado importante atividade cicatrizante e angiogênica com significativa formação de matriz extracelular (ANDRADE et al., 2011; BALABANIAN et al., 2006; ERENO et al., 2010; FRADE, 2003; FRADE et al., 2012; MRUÉ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003; VIOLANTE, 2006).

O látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* constitui-se um fluido orgânico composto de proteínas, carboidratos, componentes orgânicos e inorgânicos. Por meio de ultracentrifugação (aproximadamente 60000g), o látex natural pode ser separado em três fases: (1) parte superior composta de hidrocarbonos da borracha; (2) soro (C-serum) onde todas as partículas do látex estão suspensas; e (3) fração densa inferior constituída de partículas não borracha, particularmente, lutóides que contém outro soro (B-serum) (BANERJEE et al., 2000; LEE et al., 2012; YIP; CACIOLI, 2002).

As proteínas totais do látex correspondem aproximadamente apenas de 1 a 1.5% do látex, sendo que deste total, 48% encontra-se no soro do látex (C-serum) (BANERJEE et al., 2000; YIP; CACIOLI, 2002). A avaliação bioquímica do soro do látex natural sugere que seus componentes ativos são de fato classificados como proteicos, uma vez que foi relatado perda da atividade biológica quando o mesmo foi processado em temperaturas acima de 60°C. Ainda, após purificação do soro do látex por cromatografia em DEAE-celulose, eletroforese e espectrometria de massa, 3 picos de frações proteicas foram obtidos: F1, F2 e F3. Estes picos foram testados em diversas concentrações, sendo que a fração F1 a 0.01% apresentou maior atividade cicatrizante com aumento da permeabilidade vascular e importante atividade

angiogênica em modelo *in vitro* e *in vivo* (MENDONÇA, 2004; MENDONÇA, 2008; MENDONÇA et al. 2010; SAMPAIO et al., 2010).

Assim, este presente trabalho buscou associar os três princípios da engenharia tecidual: material de estrutura para influxo e crescimento de células (PCL e PCL/grafeno), células (ADSCs) e fator proteico (F1). As propriedades da fração F1 associada às das ADSCs cultivadas em *scaffolds* poliméricos 3D fabricados por manufatura aditiva podem favorecer o microambiente para regeneração óssea. O emprego do biomaterial para suportar a adesão e o crescimento celular/tecidual do hospedeiro; pré-semeados com ADSCs humanas como elemento biológico; e o revestimento com o pico proteico F1 como potencial estimulador celular e indução à angiogênese, tornam-se uma promissora ferramenta de aplicação na medicina regenerativa.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a segurança e a influência da fração proteica F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* em cultura de células mesenquimais estromais multipotentes humanas derivadas do tecido adiposo (ADSCs) aplicadas no *scaffold* de policaprolactona (PCL) e policaprolactona com diferentes concentrações de grafeno (PCL/grafeno) na osteogênese experimental e sua utilização como biomaterial na xenoenxertia óssea em calvárias de ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolamento, expansão e caracterização *in vitro* das ADSCs;
- Avaliar a adesão, proliferação e diferenciação das ADSCs no *scaffold* de PCL;
- Avaliar o potencial osteogênico das ADSCs cultivadas no *scaffold* de PCL *in vitro* e em modelo de *in vivo* de calvária de ratos (xenoenxerto);
- Avaliar a segurança e influência da fração proteica F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na proliferação e diferenciação das ADSCs;
- Avaliar a influência da adição do grafeno no *scaffold* de PCL em diferentes concentrações (PCL/grafeno);
- Avaliar influência da fração proteica F1 da seringueira *Hevea brasiliensis* associada aos *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno na proliferação e diferenciação osteogênica das ADSCs *in vitro*.

3 Material e Métodos

3.1 Isolamento e caracterização das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano (ADSCs)

O procedimento de coleta, isolamento e utilização das ADSCs teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP-FMRP-USP (Processo HCPR nº 2722/2014), assim como a proposta de Criação do Biorrepositório "Células-Tronco Mesenquimais" (Processo HCRP nº 5359/2014) (em anexo ambas aprovações pelo comitê de ética).

3.1.1 Isolamento das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano

As ADSCs foram obtidas a partir de tecido adiposo humano proveniente de cirurgias de lipoaspiração ou abdominoplastia realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto mediante assinatura do Termo de Consentimento pelo doador do material biológico. Todo procedimento de isolamento foi conduzido no Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Todo o procedimento de manuseio do tecido e isolamento celular foi conduzido em ambiente estéril (fluxo laminar), assim como todo material utilizado. O tecido adiposo proveniente da cirurgia foi mantido em solução-tampão salina (PBS) acrescida de penicilina/streptomicina 2% por 12 horas. O processo de isolamento das ADSCs consistiu na fragmentação e posterior digestão enzimática do tecido em solução de PBS contendo 30% de enzima collagenase tipo 1 por aproximadamente 30 minutos, com forte agitação manual a cada 10 minutos, conforme descrito por Zuk et al. (2001). A ação enzimática da collagenase foi inativada pela adição de igual volume (1:1) de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A

solução inativada foi filtrada para retirar os fragmentos do tecido adiposo restantes, distribuída em tubos estéreis de 50 mL e seguidos para centrifugação (1.200 rpm por 10 minutos). O corpo de fundo formado após centrifugação foi ressuspenso em 10 mL de meio de cultura α -MEM completo (15% SFB + 1% penicilina/estreptomicina + 1% L-glutamina) e plaqueado em garrafa de cultura de 25 cm² de área (TPP) e mantidas em condições padrão de cultivo celular (estufa com 5% de CO₂ à 37°C).

As ADSCs são células com potencial de aderência ao plástico. Após 48 horas, todo o sobrenadante da garrafa de cultura foi descartado, novo meio de cultura completo α -MEM 15% SFB foi adicionado para manter o cultivo das células aderentes, uma população heterogênea de células. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e as passagens, ou subcultivos, foram realizadas quando a cultura atingiu 80% de confluência. A partir da primeira passagem, o meio de cultura utilizado foi o α -MEM completo com apenas 10% de soro fetal bovino. Em todos os procedimentos experimentais com utilização das ADSCs, as células foram utilizadas em passagens igual ou superior a 3 até igual ou inferior a 6.

3.1.2 Imunofenotipagem das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano

As ADSCs foram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo para avaliar a expressão de marcadores de superfície para estas células. Alíquotas de 100 μ L de ADSCs com 1×10^5 células/mL foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente, com proteção à incidência de luz, com 5 μ L de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 200 μ L de PBS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton-Dickson). Foram adquiridos 10.000 eventos/amostra

com base nos parâmetros de tamanho e granularidade. As análises foram realizadas utilizando-se o software Cellquest (BD). Foram utilizadas amostras de 4 pacientes diferentes no ensaio de caracterização imunofenotípica.

3.1.3 Diferenciação *in vitro* das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano

Foi aplicado método de caracterização das ADSCs por meio da diferenciação *in vitro* em adipócitos e osteoblastos. Para isto, as células ($n = 4$ pacientes diferentes), expandidas em garrafas de cultura de 75 cm² (TPP), foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 células/poço. Nos poços destinados a diferenciação em adipócitos foi adicionado o meio indutor de adipogênese (meio α -MEM suplementado com 15% SFB, 1 μ M de dexametasona, 10 μ g/mL de insulina e 100 μ M de indometacina) e nos poços destinados a diferenciação em osteoblastos o meio indutor de osteogênese (meio α -MEM suplementado com 7,5% de soro fetal bovino, 0,1 μ M de dexametasona, 200 μ M de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerolfosfato). Ambos os meios foram ainda suplementados com 1% penicilina/estreptomicina + 1% L-glutamina. O meio de cultura de ambas as diferenciações foi trocado a cada 3 dias e mantidas em condições ambientais padrão (estufa 5% CO₂ a 37°).

Transcorridos 21 dias do início do processo de diferenciação *in vitro*, os poços da placa de cultura foram lavados com PBS e as células foram fixadas em formaldeído 3,7%. Os poços submetidos à diferenciação adipogênica foram corados com Sudan IV 2%, enquanto as células submetidas à diferenciação osteogênica foram coradas com vermelho de alizarina (ARS) 0.2%, baseado na coloração do cálcio durante o processo de mineralização (PEREZ et al., 2012; POH et al., 2013).

3.1.4 Diferenciação osteogênica pela atividade da fosfatase alcalina *in vitro*

A fosfatase alcalina é uma enzima utilizada como marcador precoce da diferenciação osteogênica (PEREZ et al., 2012; POH et al., 2013). Foi mensurada a fosfatase alcalina *in vitro* em cultura de ADSCs em meio de cultura basal e meio de diferenciação osteogênica nos tempos 3, 7, 14 e 21 dias para avaliar a diferenciação das células por meio da atividade enzimática. As células foram lisadas com tampão de lise 0.2% Triton X-100, retiradas do fundo dos poços por meio de raspagem e coletadas em micro tubos de 2 mL. As amostras foram deixadas a 4° C por 10 minutos, centrifugadas por 10 min a 2.500g e uma amostra de 50 µL do sobrenadante do lisado celular foi incubado com 50 µL do substrato da fosfatase alcalina contendo p-nitrofenil fosfato a 5 mM (*Sensolyte Assay Kit, Anaspec*), como descrito por Perez et al (2012). Foi ainda incluído o grupo branco, composto apenas pelo substrato da fosfatase alcalina contendo p-nitrofenil fosfato a 5 mM. A leitura a 405 nm por espectrofotometria foi feita 40 minutos após a adição do substrato. Os valores da densidade ótica foram obtidos para ambos os grupos e extraídos do valor do grupo branco.

3.2 Materiais para produção dos suportes poliméricos 3D

Policaprolactona (peso molecular 50.000, CAPA 6500, Perstorp Caprolactones, Cheshire, UK) é um material semicristalino com baixo ponto de fusão (60°C). Os fragmentos de PCL foram diretamente inseridos no compartimento de materiais com temperatura controlada do aparelho de impressão tridimensional. O processo de preparação e purificação do grafeno foi conduzido pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Taiwan. A mistura do PCL com os flocos de grafeno para obtenção do material PCL/grafeno para posterior impressão foi feito por agitação física a temperatura de 70°C, como descrito por Wang et al. (2016a).

Primeiramente, o PCL foi derretido sob constante agitação e em seguida adicionados os flocos de grafeno para alcançar as concentrações desejadas de 0.25%, 0.50% e 0.75% de grafeno. A mistura de cada concentração foi agitada por 15 minutos para garantir total dispersão do material antes de ser resfriado à temperatura ambiente e cortados em pequenos fragmentos para ser utilizados no aparelho de impressão de suportes poliméricos tridimensional (*scaffolds*). Todo este procedimento foi realizado na Universidade de Manchester, Instituto de Biotecnologia, supervisionado pelo Prof. Paulo Bártolo e seu grupo de pesquisa.

3.3 Fabricação dos suportes poliméricos 3D

Scaffolds de PCL e PCL/grafeno foram inicialmente projetados de forma virtual por meio de *softwares* computacionais (CAD) próprios do sistema de impressão nas dimensões 30mm x 30mm x 6mm, distância do filamento constante de 0.3 mm e padrão de arquitetura dos filamentos 0°/90. A **Figura 2A** representa virtualmente um *scaffold* completo, camada a camada, a ser impresso na arquitetura 0°/90. Os *scaffolds* foram produzidos por meio de um sistema de manufatura aditiva por extrusão, chamada 3D Discovery (RegenHU, Switerzland), demonstrado na **Figura 2B** (CAETANO et al., 2016; WANG et al., 2016a). As condições de processamento estão indicadas na **Tabela 3**. Os *scaffolds* produzidos foram: 100% PCL e a mistura PCL/grafeno (0.25% grafeno, 0.50% grafeno e 0.75% grafeno). Todo este procedimento foi realizado na Universidade de Manchester, supervisionado pelo Prof. Paulo Bártolo e seu grupo de pesquisa.

Figura 2 - (A) Representação virtual dos *scaffolds* para impressão. (B) Sistema de manufatura aditiva por extrusão 3D Discovery.

Tabela 3. Parâmetros utilizados para impressão de suportes poliméricos.

Temperatura de processamento	Pressão de extrusão	Velocidade de rotação da extrusão	Velocidade de deposição	Bico da agulho de extrusão
90° C	6 bar	22 rpm	20 mm/sec	300 µm

3.4 Selante de fibrina do plasma humano

Foi utilizada a técnica de precipitação com glicina para purificação do fibrinogênio e diluição em cloreto de cálcio (1:1) para purificação da trombina (FALANGA et al., 2007), conforme padronizado no Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e utilizado no Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da divisão de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. O fibrinogênio entra em contato com a trombina, na proporção padronizada *in vitro* de 4:1, formando a cola de fibrina conforme descrito por Frade

et al. (2011). O selante foi empregado para fixar os *scaffolds* no fundo do poço da placa de 24 poços (TPP) com a finalidade de evitar que os *scaffolds* movimentassem dentro do poço e comprometessem a viabilidade celular.

3.5 Inoculação das ADSCs nos *scaffolds*

Os *scaffolds* utilizados nos ensaios *in vitro* foram cortados com auxílio de uma lâmina afiada para obter as dimensões de 10 mm x 10 mm x 6 mm. Todos os *scaffolds* foram lavados 3 vezes com PBS pH 7.4 e desinfetados com álcool 70% por 4 horas. Em seguida foram novamente lavados com PBS estéril e deixados para secar à temperatura ambiente para evaporar qualquer eventual resíduo de álcool. Os materiais foram previamente umedecidos com 100 µL de meio de cultura completo de forma estéril dentro do fluxo laminar e mantidos em estufa em condições padrão (5% de CO₂ a 37°C) por pelo menos 3 horas antes do plaqueamento das células.

Foram inoculadas sobre os *scaffolds* 100 µL de suspensão celular contendo 5 x 10⁴ ADSCs e incubados por 4 horas em condições padrão de cultivo para promover a adesão das células nos *scaffolds* (CAETANO et al., 2016; DI LUCA et al., 2016; YU et al., 2015). Durante este período de incubação, 50 µL de meio de cultura completo foi adicionado em cada *scaffold* após 2 horas para prevenir o ressecamento do mesmo e por consequência a morte celular. Transcorrido o período de adesão, foi adicionado 800 µL de meio de cultura completo (10% SFB) e a placa de cultura foi mantida em incubadora em condições padrão. O meio foi trocado a cada 3 dias.

3.6 Avaliação da aderência e viabilidade celular pelo ensaio de MTT no *scaffold* de policaprolactona

Os *scaffolds* empregados neste ensaio foram inicialmente tratados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5M por 3h para diminuir a hidrofobicidade do material e assim promover melhor aderência celular inicial nos *scaffolds* (POH et al., 2016; RAI et al., 2010). Foi conduzido o protocolo de ensaio de citotoxicidade por MTT, método indireto para avaliar a viabilidade celular das ADSCs aderidas cultivadas no *scaffold* após 14 dias em cultura. Este ensaio é baseado na redução do MTT – 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (amarelo e solúvel em água) em cristais de formazan (púrpura e insolúvel em água), feita pelo NADH nas mitocôndrias das células viáveis. Sendo assim, a produção de cristais de formazan pode ser diretamente correlacionada com a viabilidade celular.

Foram preparados 3 grupos: i. *scaffolds* com ADSCs em meio de cultura para diferenciação osteogênica; ii. *scaffolds* com ADSCs em meio de cultura basal; iii. *scaffolds* sem células em meio basal. Ao término de 14 dias, os *scaffolds* foram removidos dos poços da placa de 24 poços, lavados com tampão PBS e adicionado novo meio de cultura completo, sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de solução estoque de MTT (5.0 mg/mL em PBS). As placas foram incubadas novamente por 3 horas, protegidas da luz. Após a incubação, retirou-se a solução com MTT dos poços e foi acrescentado em cada poço 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneizou-se com auxílio de uma micropipeta para dissolver os cristais formados, tornando as soluções de cor púrpura, lidos em leitor de placas a 570nm. Os valores foram expressos pelo valor da densidade ótica (D.O) obtidos.

3.7 Diferenciação osteogênica das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano no *scaffold* de policaprolactona

A fim de determinar a mineralização na osteogênese relacionada à deposição de cálcio 28 dias após o início do ensaio em meio de cultura para diferenciação osteogênica em poços da placa de 24 poços (TPP), foi empregado o método colorimétrico por meio do corante vermelho de alizarina (ARS), como descrito no item 3.1.3. Foram preparados 3 grupos: i. *scaffolds* com ADSCs em meio de cultura para diferenciação osteogênica; ii. *scaffolds* com ADSCs em meio de cultura basal; iii. *scaffolds* sem células em meio basal.

Após 28 dias, com trocas do meio de cultura a cada 3 dias, as amostras foram coletadas, lavadas cuidadosamente com PBS, fixadas em solução de paraformaldeído 3.7% por 30 minutos, lavadas novamente com PBS e então coradas com ARS 0.2% por 30 minutos à temperatura ambiente. Imagens em microscopia de campo claro foram adquiridas (Olympus IX 70, *software image pro-plus*) no intuito de visibilizar áreas ricas em cálcio, bem como grânulos ricos em cálcio. Para análise quantitativa, as amostras foram incubadas por 30 min em ácido acético 10% e posteriormente aquecidas a 60°C por 10 min para retirada do corante ligado ao cálcio, lido a 405 nm no leitor de placa, obtendo a densidade ótica das amostras. Grupo branco foi inserido apenas com o ácido acético 10% e os valores deste grupo foram extraídos dos valores dos grupos experimentais.

3.8 Avaliação da osteogênese experimental em modelo animal induzida por *scaffold* de policaprolactona associado a ADSCs

Para utilização no experimento em modelo animal (*in vivo*) os *scaffolds* de policaprolactona foram cortados por meio de uma broca trefina a 900 rpm (DForce

1000, DentFlex) obtendo amostras cilíndricas nas dimensões de 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Os *scaffolds* foram tratados quimicamente com solução de NaOH 5M por 3 horas, esterilizados com álcool 70% durante 12 horas, como já descrito anteriormente, e irradiados por luz ultravioleta por 2 horas. Os *scaffolds* foram semeados com aproximadamente 1×10^5 ADSCs em 50 μ L de meio de cultura em placa de 24 poços (TPP) e incubados por 4 horas para permitir a aderência celular previamente a adição de 1 mL de meio de cultura. Os tratamentos para os grupos experimentais delineados para o ensaio *in vivo* foram:

- i. **Grupo NBR.** Sem *scaffolds* – regeneração espontânea (n=4).
- ii. **Grupo SCA.** Somente *scaffold*; não semeados com células e mantidos em meio de cultura basal suplementado com 10% SFB (n=4);
- iii. **Grupo SUC.** *Scaffolds* semeados com ADSCs e cultivados em meio de cultura basal suplementado com 10% SFB (n=4);
- iv. **Grupo SDC.** *Scaffolds* semeados com ADSCs e cultivados com meio de cultura indutor osteogênico (n=4);

Os doze *scaffolds* designados para três dos quatro grupos (SCA, SUC, SDC) foram deixados em seus respectivos meios de cultura em incubadora 37°C e 5% CO₂ por 21 dias antes da implantação no modelo animal, trocando-se o meio de cultura a cada 3 dias.

3.8.1 Defeito ósseo crítico: modelo animal (calvária)

Todo procedimento e utilização dos animais foram previamente aprovados pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), número 024/2015-1 (em anexo), e seguido de acordo com Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 16 ratos Wistar machos (300g). Os animais utilizados foram criados no Biotério Central da Universidade de São Paulo e foram deixados por um período de 5 dias em aclimação em caixas grandes coletivas (4 animais por caixa) no Biotério do Departamento de Clínica Médica no Anexo B da FMRP-USP. Os animais tiveram acesso a água e ração *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas.

Após o período de aclimação, os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de Cetamina (80 mg/Kg) e Xilazina (15 mg/Kg). O pelo localizado na região superior do crânio dos animais foi tricotomizado com máquina elétrica. A cabeça do animal foi imobilizada com auxílio de um aparelho estereotáxico e anestésico local com vasoconstritor foi aplicado no local a ser confeccionado o defeito ósseo. Após assepsia com álcool 70%, foi feita uma incisão com bisturi na parte superior da cabeça do animal, cortados a fáscia muscular e o periósteo, expondo o osso da calvária. Um defeito ósseo circular de 5 mm de diâmetro foi criado na região parietal direita do osso da calvária de cada animal, lateralmente à sutura sagital, por meio de uma broca trefina a 1200 rpm (DForce 1000, DentFlex). Todo procedimento de criação do defeito ósseo foi feito com constante irrigação de solução salina estéril. De acordo com estudos anteriores, defeitos ósseos em ratos com dimensões circulares acima 5 mm são considerados defeitos críticos, ou seja, defeitos não regenerativos ao longo do tempo ou que regeneram de forma lenta (FURLANETO et al., 2007; SAWYER et al., 2009).

Após o procedimento cirúrgico, os 16 animais foram divididos em 4 grupos e tratados conforme tratamento citado acima (n = 4 animais por grupo). Após o tratamento referente a cada grupo, a pele do animal no local da lesão foi suturada com nylon 5-0 (Johnson&Johnson, Brazil) e todos os animais receberam dose única de antibiótico sistêmico (1mg/kg; Pentabiótico, FortDodge®) por via intramuscular. Ainda, os animais receberam Dipirona via administração oral (1 gota/kg; Biovet,

Brazil) de 8 em 8 horas durante 48 horas para prevenir a dor decorrente da cirurgia. Durante os primeiros 5 dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em caixas individuais com água e ração *ad libitum* para evitar que as suturas fossem retiradas pelos próprios animais. Passados os 5 dias, os animais foram recolocados em caixas coletivas com 4 animais em cada caixa e assim permaneceram por 8 semanas com água e ração *ad libitum*.

3.8.2 Estudo histológico e quantificação do novo tecido formado

Após 8 semanas, os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico, o osso da calvária de cada animal foi removido e fixados em tampão formaldeído 3.7% por 48 horas. Em seguida, as calvárias sofreram processo de desmineralização com 10% de ácido etileno diaminotetracético (EDTA) por 30 dias, como descrito por Machado et al., 2015. Após este período, as biópsias foram desidratadas, parafenizadas e cortadas em 5.0 µm de espessura, montadas em lâminas e coradas com dois corantes distintos: hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM).

Os cortes histológicos foram avaliados por microscopia de campo claro e as imagens foram adquiridas pelo microscópio LEICA DM 4000BVR, equipado com câmera LEICA DFCVR 280 (Leica Microsystems, Germany). As lâminas coradas com TM foram utilizadas apenas para avaliação qualitativa do tecido. A cor rósea representa o tecido ósseo, enquanto a cor azulada representa o colágeno do tecido conjuntivo.

Quanto as lâminas coradas com HE, as imagens de 50x foram utilizadas para montagem do defeito ósseo e quantificação do novo tecido formado. No *Photoshop*, as imagens adquiridas ao longo do defeito ósseo foram agrupadas para formar uma única imagem demonstrando o defeito total. De acordo com a coloração e característica do tecido observado, sob análise crítica do pesquisador, o tecido ósseo

e o tecido conjuntivo foram separadamente demarcados em camadas diferentes do *Photoshop*, seguindo um mesmo padrão de processamento e tamanho de imagem. Para análise histomorfométrica foi utilizado *plugin Colour Deconvolution* do *software ImageJ* para quantificação do tecido conjuntivo e do tecido ósseo em formação, em forma de percentagem em relação a área total, um procedimento adaptado ao descrito por Caetano et al., (2015) e Violante (2006). Áreas consideradas sem nenhum tecido (área branca) não foi considerada na quantificação tecidual, porém foram consideradas como parte da área total da imagem.

3.8.3 Imunoistoquímica

Os ensaios de imunoistoquímica foram realizados pela técnica Adriana Murashima do Laboratório de Fisiopatologia da Audição, Olfato e Visão do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os cortes foram histológicos foram desparafinizados e reidratados com banho inicial de xilol e série decrescente de álcool (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%) e água destilada por 10 minutos cada. Foi feita recuperação antigênica por meio de tampão citrato pH 6.0 em panela de pressão por 30 minutos. Após este tempo, os cortes foram lavados com tampão de lavagem (TBST, Spring) e a peroxidase endógena foi bloqueada por meio do reagente *Hydrogen Peroxidase Block* (Kit Spring), colocando a solução sobre os cortes teciduais seguido de incubação por 15 minutos. Os cortes foram novamente lavados com tampão de lavagem. Foi ainda adicionado solução de *Protein Block* (Kit Spring), por 10 minutos, para bloqueio de proteínas para evitar marcação inespecífica.

Foram utilizados para marcação os anticorpos primários anti-mitocondrial humano (MIT), anti-BMP-2 (proteína morfogenética óssea) e anti-CD31 (vasos sanguíneos) (ABCAM), conforme diluição recomendada pelo fabricante, por 40

minutos em temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 5x por 5 minutos em solução de PBS 0.1M e incubados com o anticorpo secundário de coelho anti-camundongo (Spring) para o anticorpo MIT e anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase (Spring) para anti-BMP-2 e anti-CD31 por 30 minutos cada. Novamente as lâminas foram lavadas em tampão PBS por 5x de 5 minutos.

Foi empregado o DAB líquido (Springer-DAB-125) como substrato-cromógeno por 5 minutos em temperatura ambiente para revelar as marcações. Os cortes foram então lavados em água corrente e contra-corados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, desidratados em banhos crescente de concentração de álcoois e montados em meio *Tissue Mounting* (Sakura). Os cortes finalizados e marcados separadamente com os três anticorpos descritos acima foram avaliados por microscopia de campo claro e imagens foram adquiridas em aumento 400x pelo microscópio LEICA DM 4000BVR, equipado com câmera LEICA DFCVR 280 (Leica Microsystems, Germany).

3.9 Estudo da interação do pico proteico F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* nas células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano

3.9.1 Análise da viabilidade /citotoxicidade celular

O pico proteico F1 do látex (liofilizado) foi adquirido comercialmente da empresa PeleNova Biotecnologia S.A, Brasil. Para avaliar a citotoxicidade da fração proteica F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* dissolvido em meio de cultura α -MEM 10% SFB em cultura com ADSCs utilizou-se o método MTT para avaliar a viabilidade, como descrito no item 3.6.

Foram plaqueadas aproximadamente 4×10^3 células/poço em microplaca de 96 poços (TPP) com 200 μ L de meio de cultura completo e incubou-se a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas para total aderência das células. Após o período de aderência celular na microplaca (confluência de aproximadamente 60-70%), foram preparadas 6 diluições em meio α -MEM 10% SFB completo, correspondendo aos seguintes grupos, em triplicada: **controle basal** (meio α -MEM completo); **controle negativo** (meio α -MEM 10% + 50% DMSO); **F1 0.1%** (0.1% da fração proteica F1 do látex em meio α -MEM completo); **F1 0.01%**; **F1 0.001%**, **F1 0.0001%**.

A microplaca de 96 poços foi incubada a 37°C, 5% de CO₂, por 24, 48 e 72 horas. Após estes períodos de tempo, o meio de cultura de todos os poços foi removido, lavados com tampão PBS e adicionado solução de MTT (5,0 mg/mL em PBS) 10% em meio de cultura DMEM completo (sem vermelho de fenol) e as placas foram incubadas novamente por 3 horas, protegidas da luz. Após a incubação, retirou-se a solução com MTT dos poços, acrescentou-se 200 μ L de DMSO em cada poço e homogeneizou-se com auxílio de uma micropipeta para dissolver os cristais formados, tornando as soluções de cor púrpura, lidos em leitor de placas a 570nm.

Os valores de porcentagem foram obtidos assumindo-se o valor da densidade ótica (D.O) do controle (meio de cultura completo) correspondendo a 100% de células viáveis e, a partir da equação abaixo, foi obtida a porcentagem de células viáveis presentes nos grupos experimentais em relação ao controle, obtendo a viabilidade celular. Este protocolo foi aplicado em 5 amostras celulares de pacientes diferentes e/ou em passagens diferentes (MOHAMMADI et al., 2015, QIAO et al., 2014). O mesmo protocolo foi aplicado também utilizando fibroblastos de camundongo NIH-3T3, uma linhagem celular bem estabelecida para utilização em protocolos de citotoxicidade/viabilidade celular, porém utilizando meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{D.O diferentes concentrações de F1} \times 100}{\text{D.O controle basal}}$$

3.9.2 Análise da proliferação celular

Com objetivo de avaliar a proliferação das ADSCs em cultura celular na presença da fração proteica F1 da seringueira *Hevea brasiliensis*, utilizou-se o ensaio de proliferação com timidina-tritiada, um ensaio radioativo para crescimento, proliferação e síntese de DNA. Neste método é adicionado junto ao meio de cultura a timidina-tritiada radioativamente marcada com isótopo de hidrogênio (H^3), análogo à timidina, incorporados ao DNA na fase S do ciclo celular.

Foram plaqueadas aproximadamente 4×10^3 células/poço em microplaca de 96 poços (TPP) com 200 μ L de meio de cultura α -MEM completo e incubou-se por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ para total aderência das células. Após o período de aderência das células, foram preparadas 7 diluições em meio α -MEM 10% SFB completo, correspondendo aos seguintes grupos, em triplicada: **controle basal** (meio α -MEM completo); **F1 0.1%** (0.1% da fração proteica F1 do látex em meio α -MEM completo); **F1 0.01%**; **F1 0.001%**; **F1 0.0001%**; **F1 0.00001%**; **F1 0.000001%**.

As microplacas de 96 poços foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂, por 24 e 48 horas. Após este período de tempo, adicionou-se 10 μ L de timidina-tritiada a concentração de 50 uCi/mL, ou seja, 0.5 Ci em cada poço, e incubou-se novamente, nas mesmas condições por 16 horas. Foi utilizado o equipamento *Cell Harvester* para aspirar o conteúdo (células e meio de cultura) de cada poço separadamente. As células ficaram retidas em papel de filtro e transferidos para frascos plásticos contendo 2,0 mL de líquido de cintilação. O efeito do pico F1, bem como o controle basal, sobre a proliferação celular foi avaliado pela incorporação da timidina-tritiada, baseada na radioatividade incorporada pelas amostras durante o ciclo celular, medida em CPM (Contagens Por Minuto) pelo equipamento Cintilador Beta.

Os valores foram expressos em percentagem de proliferação assumindo o resultado do controle basal como eixo y = 0 (proliferação basal esperada, sem F1, somente meio de cultura). Este protocolo foi aplicado em 5 amostras celulares de

pacientes diferentes e/ou em passagens diferentes. O mesmo protocolo foi aplicado também utilizando fibroblastos de camundongo NIH-3T3, utilizando os mesmos procedimentos, mesmo tempo, mesma concentração de células, porém utilizando meio de cultura DMEM com 10% de SFB.

3.9.3 Ensaio de migração/proliferação celular

Para avaliar a migração juntamente com estímulo proliferativo das ADSCs na presença do pico proteico F1 do soro do látex, empregou-se o método *in vitro* do arranhão (*Scratch Assay*), como relatado por Fronza et al. (2009). Para isto, foram plaqueadas aproximadamente 3×10^4 células/poço em uma placa de 24 poços com 1000 μ L de meio de cultura α -MEM completo (10% SBF) e incubou-se por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ para total aderência das células e confluência aproximada de 80%.

Com o auxílio de uma ponteira de 200 μ L, fez-se um "arranhão" no centro de cada poço, deixando um risco linear sem células no meio do poço confluyente. Todos os poços foram lavados com PBS e, em seguida, foram acrescentados as mesmas 7 diluições de F1 em meio α -MEM completo descrito no item acima, em triplicata, e incubou-se novamente a placa por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂.

Ao final da incubação, os poços foram novamente lavados com PBS 1x e as células foram fixadas com paraformaldeído 3.7% por 30 minutos. Após a fixação, os poços foram lavados e adicionou-se marcador nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (*Thermo Fisher Scientific Inc., Molecular Probes*), como descrito por Fronza et al. (2009). Foram feitas 4 imagens de cada poço (12 imagens de cada concentração) com auxílio do microscópio invertido com fluorescência (Olympus IX 70) e *software image pro-plus*. As células em migração no sentido de colonizar o espaço deixado pelo "arranhão" em cada imagem adquirida foram quantificadas por meio do *Software ImageJ*. Foi utilizada a média de células quantificadas nas 4 imagens de cada poço de

cada concentração para plotar os dados. Este ensaio também foi conduzido com fibroblastos 3T3, por meio do mesmo protocolo, nas mesmas condições.

3.9.4 Diferenciação osteogênica *in vitro* na presença da proteína F1

A diferenciação osteogênica das ADSCs pela atividade de enzima fosfatase alcalina em meio de cultura suplementado com o pico proteico F1 foi conduzido como descrito no item 3.1.4. Neste ensaio foram utilizadas duas concentrações do pico proteico F1 do látex: 0.00001% e 0.0001%. Ainda, a proteína F1 foi adicionada em duas situações: em uma primeira avaliação, a proteína F1 foi adicionada simultaneamente com o meio de diferenciação e, em uma segunda avaliação, as ADSCs foram previamente tratadas com F1 por 5 dias em meio de cultura basal antes do início da diferenciação com adição do meio osteogênico suplementado com F1 nas concentrações citadas acima. Ambos os ensaios foram conduzidos em triplicata e avaliados após 7, 14 e 21 dias.

3.10 Associação do pico proteico F1 nos *scaffolds* e ensaio de liberação de proteína *in vitro*

O método de adsorção foi utilizado para incorporação do pico proteico F1 do látex natural nos *scaffolds*, como descrito por Patel et al. (2015a, 2015b). O pico proteico F1 liofilizado foi solubilizado em 1 mL de PBS para preparar uma solução de concentração final de 1% (m/v), ou seja, 0.01 g/mL de proteína F1. Esta solução estoque foi diluída em PBS para resultar em uma solução 0.05%, a ser utilizada no ensaio de adsorção. O *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno, com concentrações de grafeno indicados no item 3.3, foram cortados com uma lâmina afiada sutilmente maiores

que os anteriores (dimensões 11 mm x 11 mm x 6 mm) para que ficassem presos dentro do poço da placa de 24 poços (Costar) sem a necessidade de utilização da cola de fibrina. Foi adicionado 1 mL da solução de F1 0.05% de modo que os *scaffolds* ficassem submersos. A placa foi deixada a 4 °C por 24 horas (n = 3 *scaffolds* por concentração).

Transcorrido o tempo de adsorção, a solução F1 de cada poço de cada concentração foi coletada para avaliar a concentração proteica restante (não adsorvida) e indiretamente a concentração adsorvida. Os *scaffolds* foram lavados 3 vezes com PBS para remover qualquer solução contida dentro dos materiais e 1 mL de novo PBS foi acrescentado nos poços com as amostras e a placa foi mantida em condições padrão de cultura celular (37° C, 5% CO₂, 95% umidade). Todo PBS (1 mL) foi coletado após 3 horas, 6 horas, 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias do início do ensaio de liberação de proteína. Imediatamente após cada coleta, 1 mL de PBS foi acrescentado para novamente serem coletados no período subsequente. As amostras coletadas foram guardadas em freezer -80° C até o momento da dosagem proteica.

A proteína liberada pelos *scaffolds* em cada ponto de tempo utilizado, a proteína restante na solução utilizada na adsorção após 24 horas (não adsorvida) e a solução proteica inicial (0.05%) foram utilizadas para mensurar a concentração proteica pelo kit Micro BCA™ (Thermo Scientific). Este ensaio foi conduzido duas vezes, em triplicata, realizado na Universidade de Manchester, sob supervisão do Prof. Paulo Bártolo.

3.11 Avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo *Alamar Blue* no *scaffold* de policaprolactona e policaprolactona/grafeno incubados com F1

Outro método bastante conhecido e utilizado para avaliar a viabilidade/proliferação celular é o composto químico resazurina (Sigma-Aldrich, UK),

também conhecido como *Alamar Blue* (BORRA et al., 2009; POH et al., 2016; ZHANG; DU; ZHANG, 2004). Células metabolicamente ativas são capazes de reduzir intracelularmente por meio enzimas mitocondriais o composto químico resazurina em resofurina, um composto fluorescente. *Scaffolds* de policaprolactona e policaprolactona/grafeno incubados e não incubados com proteína F1 foram utilizados neste ensaio.

As células foram semeadas nos *scaffolds* da mesma forma como já descrito no item 3.5 (n = 2 por grupo). No entanto, foram utilizadas ADSCs obtidas comercialmente (STEMPRO®, Invitrogen) cultivadas em meio de cultura basal *MesenPRO RS™* (Invitrogen). A avaliação da viabilidade/ proliferação celular foi mensurada nos tempos 3, 7 e 14 dias após as células serem semeadas. Antes da avaliação no dia 3, os *scaffolds* foram transferidos para uma nova placa de cultura de 24 poços para excluir a atividade das células que aderiram ao fundo da placa e não nos *scaffolds*. 1 mL de solução de resazurina 0.001% preparada em meio de cultura foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas em condições padrão. Após a incubação, 150 µL do meio de cultura com resazurina de cada poço foi coletado e transferido para uma placa de 96 poços. A intensidade da fluorescência foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm para excitação e 590 nm para emissão (Sunrise; Tecan, Männedorf, Zurich, Switzerland). Este ensaio foi realizado na Universidade de Manchester, sob supervisão do Prof. Paulo Bártolo.

3.12 Diferenciação celular osteogênica nos *scaffolds* de policaprolactona e policaprolactona/grafeno incubados com F1

ADSCs adquiridas comercialmente citadas no item 3.12 (STEMPRO®) foram empregadas neste ensaio. Para avaliar o potencial de diferenciação, *scaffolds* incubados com F1 e não incubados foram empregados. Ainda, parte dos *scaffolds* foram cultivados em meio de cultura basal (*MesenPRO RS™*) e parte cultivados em

meio de cultura para diferenciação osteogênica (*StemPro*® *Osteocyte/Chondrocyte* suplementado com *StemPro*® *Osteogenesis*, Invitrogen). Os *scaffolds* foram mantidos em condições padrão de cultura celular em seus respectivos meios de cultura por até 28 dias com trocas de meio a cada 3 dias.

Nos tempos 7, 14 e 21 dias após o início da cultura celular, a atividade da fosfatase alcalina foi mensurada, como descrito no item 3.1.4, com algumas alterações. Após lavar os *scaffolds* com PBS, os *scaffolds* contendo as células foram colocados em tubos cônicos de 25 mL, adicionado o tampão de lise e levados ao banho ultrassônico para total desprendimento das células e, em sequência, congelados e descongelamento, mantidas à 4° C. Para avaliar a deposição de cálcio 28 dias após o início do ensaio, as amostras foram coradas com ARS por 30 min, como descrito no item 3.7. Este ensaio foi realizado na Universidade de Manchester, sob supervisão do Prof. Paulo Bártolo.

3.13 Caracterização morfológica

Todo procedimento de caracterização morfológica dos *scaffolds* e/ou *scaffolds* associados à ADSCs foi realizado na Universidade de Manchester, sob supervisão do Prof. Paulo Bártolo.

3.13.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura foi realizada pelo sistema Quanta 200 com aceleração de voltagem de 3 Kv. O objetivo deste método foi observar a morfologia dos *scaffolds* (filamentos, tamanho e distribuição dos poros e interconectividade),

bem como avaliar a adesão e crescimento celular quando empregados *scaffolds* semeados *in vitro* com ADSCs. Para tal, os *scaffolds* cultivados com células por 21 dias foram lavados com PBS 3 vezes, fixados com solução de glutaraldeído 2.5% por 30 min à temperatura ambiente, lavados novamente 3 vezes com PBS e desidratados em série de etanol graduada 10 min em cada concentração (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%). Ao final da desidratação, as amostras foram incubadas por 10 min em solução de etanol: hexametildissilazano (1:1 v/v) e posteriormente 10 min em puro hexametildissilazano (HMDS) antes de secar à temperatura ambiente. Este procedimento final foi utilizado como maneira alternativa à secagem em ponto crítico, método considerado ideal para este tipo de ensaio celular e morfológico (POH et al., 2016).

Os *scaffolds* foram cuidadosamente cortados longitudinal e transversalmente em camadas (aproximadamente 2 mm) com auxílio de uma lâmina, para observação da camada superior e interior dos *scaffolds*, respectivamente. Em seguida, as amostras foram metalizadas através da deposição de uma fina camada de platina (Gatan Model 682 Precision Etching Coating System). Os *scaffolds* utilizados sem adição de ADSCs não sofreram processo de fixação e desidratação. Estes foram apenas cortados e metalizados. As imagens por microscopia de varredura foram obtidas por um microscópio Hitachi S300N (Japão).

3.13.2 Análise das células aderidas nos *scaffolds* por microscopia confocal

A morfologia celular foi também avaliada por meio de microscopia confocal em *scaffolds* cultivados por 28 dias em meio de cultura completo basal e meio de cultura para diferenciação osteogênica. As amostras foram lavadas por 3 vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 40 min à temperatura ambiente e por fim lavados novamente com PBS. As amostras foram imersas em tampão de bloqueio

(soro de cabra 2% e 1% de albumina de soro bovino em PBS) por 30 min. O núcleo celular foi marcado com *Hoescht 33342* (C62249, ThermoFisher), enquanto a membrana celular foi marcada com *CellMask™ Orange plasma membrane stain* (C10045, ThermoFisher) de acordo com recomendações do fabricante por 10 min (Ortiz et al., 2001). Ao término da incubação, as amostras foram lavadas com PBS e montadas utilizando *ProLong® Diamond Antifade* (P36962, ThermoFisher). Imagens de microscopia confocal foram obtidas pelo aparelho Leica TCS SP5 (UK).

3.13.3 Reconstrução do modelo de *scaffold* utilizado por tecnologia micro-CT (μ CT)

Reconstrução morfológica virtual camada a camada do *scaffold* utilizado nos ensaios *in vitro* foi conduzida por análise em micro-CT (μ CT, 320/225 Kv Nikon XTEC) para avaliar a morfologia e a interconectividade dos materiais utilizados. A amostra foi digitalizada camada a camada e os dados foram utilizados para reconstrução por um todo por meio do *software Mimics 11.1* (Materialise, Belgium) para criar uma imagem tridimensional.

3.14 Análise dos resultados

Inicialmente os dados encontrados foram avaliados pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk* ou *Kolmogorov-Smirnov* dependendo do número de valores em cada ensaio. Para análises de comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste *t-student*, enquanto para as comparações com mais de dois grupos

experimentais foi utilizado o teste de análise de variância *One-way ANOVA* com pós-teste de *Tukey* ou *Two-way ANOVA* com pós-teste de Bonferroni para determinar as diferenças existentes entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 5% ($\alpha=0.05$). Os testes estatísticos bem como a produção das figuras foram realizados pelo programa estatístico *Graphpad Prism 5.0* (EUA).

4 Resultados

4.1 Isolamento, expansão e caracterização das células mesenquimais estromais derivadas do tecido adiposo (ADSCs)

4.1.1 Isolamento das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano

As ADSCs foram obtidas a partir de tecido adiposo humano proveniente de cirurgias de lipoaspiração ou abdominoplastia realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O tecido adiposo foi manuseado em condições estéreis durante todo procedimento para isolamento das células. As ADSCs isoladas apresentaram formato fibroblastóide (células alongadas) quando cultivadas *in vitro* aderidas ao plástico da garrafa de cultura. A **Figura 3** demonstra as células isoladas do tecido adiposo em cultura a partir da 3ª passagem.

Figura 3 - Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) cultivadas em placa de cultura.

4.1.2 Caracterização das ADSCs por imunofenotipagem

Os resultados da caracterização por imunofenotipagem estão expressos em percentagem de expressão dos marcados utilizados pelas células. Pode ser observado que para todos os sete marcadores tiveram expressão celular abaixo de 4% e que cinco marcadores tiveram marcação acima de 80% (**Figura 4**). Como esperado, as ADSCs expressaram moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I (aproximadamente 30%), porém não expressaram moléculas de classe II, não apresentando, portanto, perfil imunogênico.

Figura 4 - Imunofenotipagem das células mesenquimais estromais multipotentes derivadas do tecido adiposo humano. Percentagem de expressão dos anticorpos de superfície celular.

4.1.3 Caracterização das ADSCs por diferenciação *in vitro*

Para diferenciação *in vitro*, as ADSCs foram submetidas ao processo de indução da diferenciação, sendo capazes de responder aos estímulos indutores de adipogênese e osteogênese, diferenciando-se em adipócitos e osteoblastos, respectivamente. Foram adicionados controle de células cultivados em meio e cultura basal para demonstrar a não diferenciação.

A **Figura 5** demonstra imagens obtidas por microscopia de campo claro das células coradas com os respectivos corantes após 21 dias do início da diferenciação adipogênica e osteogênica (n = 4 amostras celular de pacientes diferentes), cultivadas em meios de cultura específicos. Na diferenciação osteogênica, o vermelho de alizarina cora o cálcio depositado na matriz extracelular, enquanto na diferenciação adipogênica são coradas as gotículas de lipídio intracelular pelo Sudan IV. Pode se observar que tanto as células destinadas a diferenciação osteogênica, quanto as células destinadas a diferenciação adipogênica tiveram expressiva diferenciação quando comparadas com os respectivos controles.

Figura 5 - Diferenciação *in vitro* das células mesenquimais estromais derivadas do tecido adiposo humano em osteoblastos (Diferenciação osteogênica), em adipócitos (Diferenciação adipogênica) e respectivos controle (Sem diferenciação).

4.1.4 Avaliação da diferenciação osteogênica das ADSCs pela atividade da fosfatase alcalina

A diferenciação osteogênica pela atividade enzimática foi mensurada nos tempos 3, 7, 14 e 21 dias após o início da diferenciação, estimulada pela adição do meio de cultura indutor osteogênico. É possível observar que no tempo 3 dias, ambos os grupos tiveram semelhante atividade enzimática (aproximadamente 0.1 de densidade ótica). No tempo 7 dias, ambos tiveram a expressão aumentada, porém mantiveram-se semelhantes entre si. Nos dias 14 e 21 foi relatada diferença da atividade da fosfatase alcalina nas células cultivadas em meio indutor osteogênico em comparação com o grupo de células cultivadas em meio de cultura basal (**Figuras 6**).

Figura 6 - Quantificação *in vitro* da atividade da fosfatase alcalina em cultura de ADSCs em meio de cultura osteogênico e meio de cultura basal nos tempos 3, 7, 14 e 21 dias. Os valores estão expressos de acordo com a densidade ótica (D.O). Teste estatístico *Two-way ANOVA* com pós-teste de *Bonferroni*. * Evidência de diferença estatística entre os grupos.

4.1.5 Avaliação por imunofenotipagem das ADSCs pós-diferenciação osteogênica

As ADSCs foram avaliadas novamente por imunofenotipagem levando em consideração a adição de um grupo de células cultivado em meio de cultura indutor da diferenciação osteogênica por 28 dias. Para este ensaio, foram utilizados apenas três anticorpos de marcação superficial positivos (CD29, CD73, CD90), 2 negativos (CD14, CD45), HLA-ABC e HLA-DR, como descrito no item 3.1.2.

O perfil imunofenotípico das ADSCs indiferenciadas (cultivadas em meio basal) e das ADSCs osteo-diferenciadas (cultivadas em meio indutor osteogênico) foram parecidos entre si, porém com menor percentagem de expressão de marcação dos anticorpos positivos nas células cultivadas em meio indutor osteogênico (**Figura 7A**). Contudo, a percentagem do HLA DR, anticorpo para o complexo de histocompatibilidade classe II, permaneceu baixo, com padrão considerado negativo mesmo para as células osteo-diferenciadas. As **Figuras 7B e 7C** mostram a mineralização corada com vermelho de alizarina e a atividade da fosfatase alcalina respectivamente, após 28 dias em cultura, realizados como grupo controle positivo do ensaio, comprovando que as células utilizadas na imunofenotipagem tinham características da diferenciação osteogênica.

Figura 7 - Caracterização e avaliação das ADSCs cultivadas em meio de cultura basal e meio de cultura indutor osteogênico por 28 dias. (A) Perfil imunofenotípico expresso em percentagem de marcação dos anticorpos. (B) Coloração com vermelho de alizarina. (C) Atividade da fosfatase alcalina. Teste estatístico teste *t-student*. * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) entre os grupos.

4.2 Avaliação das ADSCs do *scaffold* de policaprolactona aplicados *in vitro* e *in vivo*

4.2.1 Avaliação da aderência e viabilidade das ADSCs no *scaffold* de PCL

A **Figura 8A** representa o *scaffold* de policaprolactona (PCL) produzido por meio da tecnologia de manufatura aditiva por extrusão nas dimensões de impressão. A **Figura 8B** representa a reconstrução do *scaffold* utilizado por micro-CT (μ -CT), demonstrando o padrão camada a camada, a arquitetura empregada de 0°/90° e a porosidade.

Figura 8 - (A) *Scaffold* de PCL utilizado nos ensaios com as dimensões de impressão. (B) Reconstrução virtual do *scaffold* utilizado por micro-CT.

Para avaliar inicialmente a aderência e viabilidade celular cultivada nos *scaffolds*, foi empregado o ensaio de MTT. Neste ensaio, as células viáveis são capazes de metabolizar e reduzir o sal MTT em cristais de formazan na cor púrpura. Como demonstrado nas **Figuras 9A e 9B**, os *scaffolds* de policaprolactona, que são brancos naturalmente, apresentam sua superfície corada com tom púrpura indicando a presença de células metabolicamente viáveis aderidas na estrutura de fibras 14 dias após serem semeadas sobre os *scaffolds*. Ainda, na **Figura 9B**, observa-se o exemplo de um *scaffold* não semeado com células e, portanto, não corados pelo MTT, indicado pela seta vermelha.

O ensaio de viabilidade foi conduzido após 14 dias do início da cultura de ADSCs nos *scaffolds* com células cultivadas em meio de cultura basal, meio de cultura indutor da diferenciação osteogênica e *scaffolds* sem células mantidos em meio basal. A **Figura 9C** demonstra imagens microscópicas em campo claro (aumento 100x) dos *scaffolds* após incubação com MTT nos três grupos acima citados. Nas imagens é possível identificar os cristais de formazan produzidos pelas células aderidas nas fibras dos *scaffolds* empregados nos ensaios, devido a redução do sal MTT feito pelas mitocôndrias nos dois primeiros grupos (*scaffolds* com células em meio indutor osteogênico e basal).

A relação da cor púrpura é diretamente proporcional a viabilidade celular. A cor púrpura foi extraída dos *scaffolds* por meio do solvente DMSO. A **Figura 9D** expressa a densidade ótica obtida das amostras por espectrofotometria. Observa-se que ambos os grupos com células tiveram maior densidade ótica quando comparado com o grupo controle (material sem células), demonstrando que os *scaffolds* tem potencial para adesão e crescimento das ADSCs.

Figura 9 - ADSCs associadas ao *scaffold* de policaprolactona pelo ensaio MTT após 14 dias em cultura. (A) Visão macroscópica da coloração púrpura dos cristais de formazan formados. (B) *Scaffolds* com células e um *scaffold* sem células (seta vermelha). (C) Imagem em microscopia de campo claro (aumento 100x) dos *scaffolds* após incubação com MTT. (D) Quantificação da cor púrpura nos *scaffolds* expressos de acordo com densidade ótica obtida (espectrofotômetro 570nm). Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao grupo sem células.

4.2.2 Avaliação da diferenciação osteogênica *in vitro* das ADSCs no *scaffold* de PCL

As ADSCs semeadas nos *scaffolds* foram mantidas por 28 dias em seus respectivos meios de cultura para avaliar a diferenciação por meio da deposição de cálcio pelo vermelho de alizarina. Como demonstrado na **Figura 10A**, os três *scaffolds* superiores estão totalmente corados com o corante ARS relativo a mineralização da matriz extracelular devido ao meio de diferenciação osteogênico. A linha de *scaffolds* inferior compõem o grupo controle (cultivados em meio basal), apontado pela seta amarela. Nestas amostras foi observada a presença do corante em sua porção que estava em contato com fundo da placa, fixado com o selante de fibrina, o que não era esperado pelo grupo de pesquisa, mas não foi relatado a presença do corante vermelho na sua porção interior e superior.

A **Figura 10B** demonstra imagens obtidas por microscopia de campo claro (aumento 100x) dos *scaffolds* após 28 dias e coloração com ARS nos três grupos. É possível notar a presença de células nos dois primeiros grupos, sendo que no primeiro há presença de cor vermelha mais pronunciada dentro dos poros, caracterizada pela deposição de cálcio na matriz extracelular. O corante foi extraído dos *scaffolds* por meio de uma solução de ácido acético 10% por 30 minutos e lido a 405 nm em espectrofotômetro para obter a densidade ótica. Observa-se maior densidade ótica para o grupo que recebeu meio de indutor da diferenciação osteogênica, diferente estatisticamente dos outros dois grupos, que tiveram densidade ótica semelhantes (sem formação de matriz mineralizada de cálcio), demonstrando que os *scaffolds* de PCL utilizados permitiram a adesão e diferenciação das ADSCs humanas (**Figura 10C**).

Figura 10 - Diferenciação osteogênica das ADSCs no *scaffold* de PCL e coloração com vermelho de alizarina após 28 dias em cultura com meio indutor osteogênico e meio de cultura basal. A cor vermelha demonstra a mineralização da matriz extracelular. (A) Visão macroscópica dos *scaffolds*. A seta amarela aponta um *scaffold* controle (sem diferenciação). (B) Imagem em microscopia de campo claro (aumento 100x) dos *scaffolds* após coloração. (C) Quantificação da cor vermelha. Os valores no gráfico estão expressos de acordo com densidade ótica obtida (espectrofotômetro 405 nm). Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste Tukey. * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) entre os grupos.

4.2.3 Aplicação do *scaffold* de PCL em modelo animal de regeneração óssea (calvária)

Os animais utilizados no ensaio *in vivo* em modelo de regeneração óssea de calvária receberam os tratamentos (enxertos) relatados no item 3.8 (n = 4 animais por tratamento) e assim permaneceram por 8 semanas. Ao término deste período, os animais foram sacrificados e o osso da calvária foi extraído, como mostra a **Figura 11**, onde é possível observar o osso da calvária extraída do grupo sem *scaffold* (**Figura 11A**) e o osso da calvária de um grupo que teve *scaffold* implantado no osso parietal direito (**Figuras 11B e 11 C**). De um total de 16 animais sacrificados, todos os animais estavam com comportamento normal, peso elevado, sem stress e não foi observado sinal de inflamação e/ou contaminação (odor e secreções purulentas).

Figura 11 - Osso da calvária extraído dos animais após o sacrifício. (A) Osso da calvária mostrando defeito no osso parietal direito do grupo sem *scaffold*. (B) Osso da calvária mostrando defeito no osso parietal direito do grupo com *scaffold*. (C) *Scaffold* implantado em aumento maior.

4.2.4 Avaliação histológica do novo tecido formado

Após o sacrifício dos animais e extração do osso da calvária, as amostras seguiram para rotina histológica, coloração com hematoxilina e eosina e aquisição das imagens em microscopia e campo claro. A **Figuras 12** apresenta imagens histológicas em aumento de 50x após 8 semanas do procedimento cirúrgico para os quatro grupos estudados. Como já relatado, não foram observados sinais de inflamação nem no momento do sacrifício e nem na análise histológica de acordo com o observador nos 4 grupos estudados. A cor rósea mais forte indica nova formação óssea (NB), semelhante a cor do osso intacto/antigo (OB) nas extremidades das lesões, enquanto cores menos prevalentes e mais claras indicam tecido conjuntivo (CT). O poro dos *scaffolds* está indicado pela letra P.

De acordo com avaliação histológica (**Figura 12**), no grupo NBR (grupo controle sem tratamento correspondendo a regeneração óssea espontânea), a porção central do defeito ósseo foi conferida apenas por uma fina camada de tecido conjuntivo. Somente foi observado formação óssea próxima às bordas. Nos grupos que receberam apenas o *scaffold* de PCL (grupo SCA), pode ser observado a presença de tecido conjuntivo ao longo do defeito ósseo, mas também de novo tecido ósseo em formação, principalmente em algumas porções centrais alocadas dentro do poro dos *scaffolds*, "ilhas" ósseas, e nas bordas, envoltas por tecido conjuntivo. O mesmo pode ser observado no grupo SDC, grupo que recebeu *scaffolds* semeados com ADSCs e mantidos em meio de cultura para indução osteogênica. No grupo SUC, *scaffolds* com ADSCs indiferenciadas, foi observado em algumas amostras grande porção de novo tecido ósseo em formação, nas bordas e ao longo de todo corte histológico unindo as extremidades ósseas.

Figura 12 - Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 50x) coradas com hematoxilina e eosina em cada grupo experimental. Nas imagens é possível observar o osso antigo (OB), novo osso em formação (NB), tecido conjuntivo (CT) e poro do *scaffold* (P). Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas).

A **Figura 13** apresenta, em porcentagem, a quantificação do tecido conjuntivo (CT) e do novo tecido ósseo (NB) a partir das imagens histológicas em aumento de 50x por meio do software *ImageJ*. Os três grupos que receberam como tratamento enxertos de *scaffolds* de PCL, independente da presença ou não de ADSCs, obtiveram mais tecido conjuntivo formado comparado ao grupo NBR ($p < 0.05$). A formação óssea observada no grupo SUC (*scaffold* com ADSCs indiferenciadas) foi significativamente maior comparada aos grupos NBR, SCA e SDC (22%; 14% e 15% maiores, respectivamente) e maior porcentagem de tecido ósseo formado comparado ao tecido conjuntivo ($p < 0,05$).

Figura 13 - Percentagem de novo osso (NB) e tecido conjuntivo (CT) formados quantificados pelo *ImageJ* a partir das imagens histológicas corados com hematoxilina e eosina em aumento de 50x. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em comparação aos outros grupos quanto a quantificação do NB; # Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação aos grupos SCA, SUC e SDC comparados ao NBR quanto a quantificação do CT. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas).

4.2.5 Avaliação qualitativa histológica (Tricrômio de Masson)

Os cortes histológicos abaixo (aumentos de 50x e 200x e tiradas do local da lesão óssea 8 semanas) foram corados com Tricrômio de Masson (**Figura 14**). A coloração com Tricrômio de Masson é capaz de revelar o grau da mineralização do novo tecido. A cor vermelha indica osso mineralizado, enquanto a cor azul indica a presença de colágeno, cartilagem e processo de mineralização, de acordo com a intensidade de tonalidade.

No grupo NBR é possível observar pouca formação tecidual, finas camadas de tecido entre as bordas ósseas da lesão e pouco novo osso formado, apresentando bastante tecido conjuntivo colagênico. Nos três grupos que receberam *scaffolds* como tratamento, é possível encontrar “ilhas” de formação óssea mineralizada. Estas “ilhas” estão bem prevalentes no grupo SCA, enquanto nos grupos SUC e SDC foram observados fragmentos ósseos maiores ao longo da lesão. Ainda, no grupo SUC foi encontrado tonalidades de cor azul mais intenso e compacto que no grupo SDC, indicando grau de mineralização mais avançado do tecido conjuntivo que no grupo SDC e SCA.

Figura 14 - Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 50x e 200x) coradas com Tricrômio de Masson. A cor vermelha indica mineralização óssea, enquanto a cor azul indica tecido conjuntivo de colágeno, cartilagem. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas).

4.2.6 Avaliação qualitativa por imunohistoquímica

A **Figura 15** representa os cortes marcados com anti-mitocondrial humano (MIT) nos quatro diferentes grupos. Foi possível encontrar presença de células humanas advindas do *scaffold* no tecido animal em formação nos grupos SUC e SDC, como pode ser observado pela coloração ocre (**Figura 15 A**). A **Figura 15 B** apresenta imagens também em aumento de 400x com ampliação da área onde encontra-se marcação, como pode ser observado pela coloração ocre forte e intensa intracelular, junto ao núcleo celular corado com a cor azul.

Figura 15 – Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas. Marcação anti-mitocondrial humano (MIT). (A) Imagens aumento 400x. (B) Imagens aumento 400x com ampliação dando destaque na marcação intra-citoplasmática. As marcações podem ser identificadas pela cor ocre intensa. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas).

A **Figura 16** representa os cortes marcados com anti-BMP-2 nos quatro diferentes grupos. Pode ser observado a presença de BMP-2 nas imagens de todos os grupos experimentais, representado pela cor ocre intensa. No grupo NBR, a marcação observada foi proporcional ao novo tecido formado, apresentando marcação inferior que os outros grupos. Nos grupos que receberam *scaffolds*, foi observado presença de BMP-2 mais evidente que o grupo controle (NBR). A maioria da marcação observada estava presente no tecido em formação dentro dos *scaffolds*, ao longo da lesão óssea, tanto na parte externa quanto na parte mais interna do novo tecido em formação.

Figura 16 - Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 400x). Marcação anti-BMP-2. As marcações podem ser identificadas pela cor ocre intensa. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas).

A **Figura 17** representa os cortes marcados com anti-CD31 nos quatro diferentes grupos. Similar ao observado nos cortes marcados com BMP-2, a marcação para vasos sanguíneos no tecido em formação foi superior nos grupos que receberam *scaffold* como tratamento. De forma parecida com o observado nos cortes marcados com BMP-2, pode ser encontrada marcação ao longo de todo corte.

Figura 17 - Fotomicrografias do defeito ósseo após 8 semanas (aumento 400x). Marcação anti-CD31. As marcações podem ser identificadas pela cor ocre intensa. Grupos: NBR (regeneração espontânea; controle); SCA (*scaffold* de PCL); SUC (*scaffold* de PCL com ADSCs); SDC (*scaffold* de PCL com ADSCs pré-diferenciadas).

4.3 Avaliação da influência do pico proteico F1 do látex natural nas ADSCs

4.3.1 Avaliação da viabilidade celular na presença do pico proteico F1

A viabilidade celular das ADSCs humanas e fibroblastos de camundongo NIH-3T3 cultivados *in vitro* foram aferidas pelo método colorimétrico MTT. A absorbância do grupo controle foi designada como 100% de células viáveis (cultivadas em meio de cultura basal sem adição do pico proteico F1).

Os resultados foram expressos como percentagem de viabilidade relativa de cada tratamento comparado ao grupo controle, representado como 100% viabilidade no gráfico. Pode ser observado que as variadas concentrações da fração proteica F1 do látex, em cultura celular por 24 horas, foram diferentes estatisticamente do grupo controle negativo e que não apresentaram citotoxicidade nas ADSCs e nem nos fibroblastos 3T3 (**Figura 18**). Após 48 e 72 horas em cultura com os tratamentos, o perfil de viabilidade manteve-se semelhante ao perfil de 24 horas, ou seja, sem citotoxicidade em ambos os tipos celulares utilizados no ensaio, como demonstrado nas **Figura 19 e 20**, respectivamente.

Figura 18 - Percentual de viabilidade celular em relação à cultura controle (100% células viáveis) após 24 horas. (A) ADSCs humanas. (B) fibroblastos 3T3. Controle Negativo (Contr. Negat.), pico proteico F1 do látex (F1 0.1% a 0.0001%). Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*: *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo.

Figura 19 - Percentual de viabilidade celular em relação à cultura controle (100% células viáveis) após 48 horas. (A) ADSCs humanas. (B) fibroblastos 3T3. Controle Negativo (Contr. Negat.), pico proteico F1 do látex (F1 0.1% a 0.0001%). Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*: *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo.

Figura 20 - Percentual de viabilidade celular em relação à cultura controle (100% células viáveis) após 72 horas. (A) ADSCs humanas. (B) fibroblastos 3T3. Controle Negativo (Contr. Negat.), pico proteico F1 do látex (F1 0.1% a 0.0001%). Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*: *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo.

4.3.2 Avaliação da proliferação celular na presença do pico proteico F1

Os resultados abaixo foram expressos pela percentagem de proliferação das células nos diferentes tratamentos em relação ao controle basal (meio de cultura basal, sem presença do pico proteico F1), correspondendo ao eixo $y = 0$, proliferação basal de acordo com contagem por minuto (CPM) de radioatividade nos diferentes grupos.

No ensaio onde empregou-se as ADSCs humanas, pode ser observada principalmente a evidência de diferença estatística nas concentrações 0.00001%, 0.0001% e 0.1% logo após 24 horas de tratamento em relação ao controle basal (**Figura 21A**). Com 48 horas de tratamento, observa-se que as concentrações de

0.00001% e 0.0001% continuaram diferente do controle basal, representando maior estímulo à proliferação celular (**Figura 21B**).

Nos fibroblastos 3T3, após 24 horas com adição do pico F1 do látex pode ser observado influência proliferativa do pico F1 nas concentrações 0.0001% em relação ao controle basal e que as concentrações 0.000001%, 0.01 e 0.1% foram inferiores ao controle basal, porém sem evidência de diferença (**Figura 22A**). Após 48 horas, pode ser observado que a concentração 0.0001% continuou sendo proliferativa superior às concentrações 0.000001%, 0.01 e 0.1%, porém neste tempo não foi encontrada diferença estatística para a proliferação basal, como observado no tempo de 24 horas para a células 3T3 (**Figura 22B**).

Figura 21 - Proliferação celular pela incorporação da Timidina- H^3 . Percentual de proliferação das ADSCs tratadas com pico proteico F1 do látex em relação ao meio de cultura controle. (A) 24 horas e (B) 48 horas. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle basal (proliferação basal).

Figura 22 - Proliferação celular pela incorporação da Timidina- H^3 . Percentual de proliferação de fibroblastos 3T3 tratados com pico proteico F1 do látex em relação ao meio de cultura controle. (A) 24 horas e (B) 48 horas. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*: * Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle basal (proliferação basal).

4.3.3 Avaliação da migração celular na presença do pico proteico F1

Foi empregado modelo do "arranhão" (*Scratch Assay*) para avaliação da migração em 24 horas. A **Figura 23** representa exemplos do "arranhão" com células em migração marcadas com DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência no momento da quantificação, demonstrando as bordas nas extremidades e as células em migração no centro. A **Figura 24** corresponde a percentagem de ADSCs (**Figura 24A**) e fibroblasto 3T3 (**Figura 24B**) em migração no sentido da borda para o centro da lesão em relação à migração celular no grupo tratado somente com meio de cultura basal (controle basal), nas mesmas seis concentrações do pico proteico F1 do látex utilizadas no ensaio de proliferação com timidina tritiada. Em ambos os tipos celulares (ADSCs e fibroblastos 3T3) foi observada maior percentagem de migração celular nos

grupos nas células tratadas com meio basal suplementado com o pico proteico F1 nas concentrações de 0.001, 0.0001% e 0.00001%.

Figura 23 - Imagem por microscopia de fluorescência do ensaio *scratch assay* de fibroblastos 3T3 e ADSCs. A lesão artificial foi tratada com meio de cultura basal, meio de cultura basal suplementado com F1 e DMSO (controle negativo). A migração celular foi avaliada após 24 horas em todos os grupos.

Figura 24 - Percentagem de migração celular em culturas tratadas com o pico proteico F1 em relação à cultura basal. (A) ADSCs humanas. (B) Fibroblastos 3T3. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. *Evidência de diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao controle basal (proliferação basal).

4.3.4 Diferenciação *in vitro* das ADSCs na presença do pico proteico F1

Como demonstrado nas **Figuras 25 e 26**, a atividade da fosfatase alcalina sugere que a presença do pico proteico F1 no meio de cultura não prejudicou e nem estimulou a diferenciação das ADSCs nos tempos estudados em comparação com o meio de cultura indutor osteogênico (controle) sem a presença do pico proteico F1. O processo de diferenciação novamente demonstrou alta atividade da enzima fosfatase alcalina a partir do 14º dia para os grupos cultivados com meio de cultura indutor osteogênico e meio indutor osteogênico suplementado com o pico proteico F1 quando comparados com ADSCs cultivadas em meio de cultura basal.

Figura 25 - Quantificação *in vitro* da atividade da fosfatase alcalina em cultura de ADSCs em meio de cultura basal, osteogênico (controle) e osteogênico suplementado com duas concentrações de F1 avaliados por 7, 14 e 21 dias. Valores expressos de acordo com a densidade ótica. Teste estatístico *Two-way ANOVA*, pós-teste *Bonferroni*. *Evidência de diferença estatística em comparação com grupo basal.

Figura 26 - Quantificação *in vitro* da atividade da fosfatase alcalina em cultura de ADSCs em meio de cultura basal, osteogênico (controle) e osteogênico suplementado com F1 avaliados por 7, 14 e 21 dias. As ADSCs foram previamente tratadas com F1 em meio basal por 5 dias antes do início da diferenciação. Valores expressos de acordo com a densidade ótica. Teste estatístico *Two-way ANOVA*, pós-teste *Bonferroni*. *Evidência de diferença estatística em comparação com grupo basal.

4.4 *Scaffolds* de policaprolactona incorporados com grafeno (PCL/grafeno) e bioativados com o pico proteico F1 do látex natural em cultura com ADSCs

4.4.1 Caracterização morfológica dos *scaffolds*

A **Figura 27** representa um *scaffold* de PCL/grafeno comparado com puro PCL produzidos por meio da tecnologia de manufatura aditiva, mostrados as dimensões de impressão (30 mm x 30 mm x 8 mm). *Scaffolds* com três concentrações de grafeno foram produzidos: 0.75%, 0.50% e 0.25%. Os *scaffolds* produzidos para os ensaios adiante não foram tratados quimicamente com NaOH 5M. As **Figuras 28 e 29**, apresentam imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno nas três concentrações produzidas. É possível observar a produção de *scaffolds* com extrema precisão, filamentos coesos e interligados nas camadas adjacentes, geometria interna bem definida, distribuição de poros uniforme e interconectados, independente do material e concentração utilizada. Estas características podem ser bem observadas nas imagens dos *scaffolds* em corte transversal (**Figura 28**). Não foi possível observar diferenças quanto a morfologia e deposição de filamentos entre os *scaffolds* estudados.

Figura 27 – *Scaffold* de PCL/grafeno 0.75% (negro) e *scaffold* de puro PCL (branco) produzidos por manufatura aditiva.

Figura 28 - Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura em corte transversal dos *scaffolds* de puro PCL e com diferentes concentrações de grafeno. (A) 0%; (B) 0.25%; (C) 0.50%; (D) 0.75%.

Figura 29 - Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura. Observação da camada superior e parte interna (corte transversal) dos *scaffolds* de PCL/grafeno (0.75%) e puro PCL.

4.4.2 Avaliação da viabilidade/proliferação das ADSCs nos *scaffolds* de PCL/grafeno

Valores da intensidade da fluorescência advindos da metabolização da resazurina é diretamente proporcional às células metabolicamente ativas. A intensidade da fluorescência obtida no ensaio nos pontos de tempo citado está expressa na **Figura 30**. É possível observar que ao longo do tempo a intensidade da fluorescência aumentou consideravelmente, indicando, indiretamente, viabilidade e proliferação celular para todos os grupos.

No primeiro ponto de tempo, 3 dias após o início, os valores da fluorescência foram semelhantes para todos os grupos (puro PCL e PCL/grafeno), com aproximadamente 6.000 de intensidade de fluorescência. No 7º dia, a intensidade da fluorescência aumentou proporcionalmente à concentração do grafeno nos *scaffolds* (9.000 para puro PCL e aproximadamente 15.000 para PCL/grafeno 0.75%). O PCL/grafeno 0.75% apresentou maiores valores com evidência de diferença para o grupo somente PCL. No 14º dia, o perfil do gráfico se manteve semelhante ao 7º dia, porém com valores sutilmente superiores ao dia anterior de análise e novamente apresentando evidência de diferença do PCL/grafeno 0.75% em comparação com o grupo somente PCL.

Figura 30 - Viabilidade/proliferação das ADSCs cultivadas nos *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno em diferentes concentrações após 3, 7 e 14 dias em cultura. Teste estatístico *Two-way ANOVA*, pós-teste *Bonferroni*. * Evidência de diferença estatística entre os grupos.

4.4.3 Adesão das ADSCs nos *scaffolds* por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal

A adesão e a difusão das ADSCs nos *scaffolds* foi avaliada qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal (**Figuras 31A e 31B**, respectivamente). Na análise por MEV, fixado e processado 21 dias após o início da cultura das ADSCs nos *scaffolds* em meio de cultura basal, pode ser observado inúmeras colônias e camadas celulares espalhadas pelas fibras dos materiais, formando "pontes" citoplasmática entre filamentos do biomaterial, apontadas com asterisco vermelho nas imagens em diferentes aumentos.

Na microscopia confocal, processado após 28 dias em cultura, o núcleo celular está representado pela cor azul, enquanto a membrana foi marcada na cor vermelha. As imagens, adquiridas em 2 aumentos diferentes, mostram em todos os biomateriais as células aderidas formando colônias e bem espalhadas por toda sua superfície. Embora não se possa afirmar com precisão, a morfologia celular parece não ter sido alterada de um material para outro, mantendo-se agrupadas com morfologia fusiforme em volta dos filamentos e entre os filamentos ("pontes"). As imagens ainda sugerem uma maior confluência celular nos *scaffolds* de PCL/grafeno 0.75%.

Figura 31 - Avaliação da adesão e morfologia das ADSCs nos *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno em três diferentes concentrações cultivadas em meio de cultura basal. (A) Imagens por microscopia eletrônica de varredura em diferentes regiões dos diferentes *scaffolds* cultivados por 21 dias. O asterisco vermelho indica a presença de células. (B) Imagens por microscopia confocal dos diferentes *scaffolds* cultivados por 28 dias.

4.4.4 Incorporação e liberação do pico proteico F1 pelos *scaffolds*

A adsorção do pico proteico F1 nos *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno foi feita à 4°C por 24 h com uma solução de proteína F1 diluída em PBS a 0.05%. O teste de liberação das proteínas foi avaliado por 3, 6, 24, 72 horas, 7 e 14 dias após o término da adsorção. A **Figura 32A** apresenta a quantificação proteica após o término da adsorção. Foram incluídos para quantificação a concentração proteica inicial utilizada no método (500 µg de F1 em 1 mL de tampão PBS - 0.05%), a solução proteica restante utilizada na adsorção após as 24 horas em cada *scaffold* (quantificar a proteína não adsorvida) e, indiretamente, a concentração proteica adsorvida em cada concentração de *scaffold*. Aproximadamente 80 µg de proteína foi adsorvida por cada concentração do material, de um total de aproximadamente 550 µg em solução utilizada. Ainda, pode-se observar que não houve diferença de adsorção entre as amostras utilizadas. Desta forma, concentrações de aproximadamente 470 µg não foi adsorvida e permaneceu em solução após as 24 horas.

A **Figura 32B** apresenta a concentração proteica de F1 liberada especificadamente em cada ponto de tempo mensurado, enquanto a **Figura 32C** apresenta a liberação proteica cumulativa (total) ao longo do tempo. A concentração proteica liberada inicialmente (após 3 horas) parece ter sido maior para PCL/grafeno 0.75% (aproximadamente 18 µg) em comparação com os outros grupos (entre 12 e 14 µg), porém não foi identificada evidência de diferença estatística. Esta maior liberação inicial proporcionou maior quantidade de proteína liberada ao longo do tempo para esta concentração, totalizando aproximadamente 23 µg de liberação total, enquanto os outros grupos parecem ter tido liberação semelhantes (aproximadamente 17 e 18 µg para os outros grupos).

Figura 32 - Adsorção e liberação do pico proteico F1 pelos *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno nas diferentes concentrações. (A) Quantificação da concentração inicial de F1 utilizada na adsorção, F1 não adsorvida e F1 adsorvida pelos *scaffolds*. (B) Curva da concentração proteica liberada pelos *scaffolds* em cada tempo de análise. (C) Curva da concentração proteica cumulativa liberada pelos *scaffolds*.

4.4.5 Análise da viabilidade/proliferação das ADSCs nos *scaffolds* revestidos pelo pico proteico F1.

A intensidade da fluorescência obtida no ensaio nos pontos de tempo citados em *scaffolds* não revestido e revestido com proteína F1 estão expressos na **Figura 33**. É possível observar que ao longo do tempo, a intensidade da fluorescência aumentou consideravelmente, indicando, indiretamente, viabilidade e atividade celular para todos os grupos, como já mostrado anteriormente no item 4.4.2.

Uma semana após o início do ensaio, no 7º dia, ambos os gráficos apresentaram intensidade de fluorescência semelhantes (aproximadamente 5.000). No dia 14, embora não tenha sido observada evidência de diferença estatística, o perfil do gráfico mostrou-se semelhante ao apresentado na Figura 31. Ainda, os *scaffolds* que sofreram processo de adsorção da proteína F1 parecem ter tido maior taxa de proliferação, indicado pela maior intensidade da fluorescência nos mesmos períodos de tempo comparados com *scaffolds* sem F1. O grupo PCL/grafeno 0.75% sem F1 apresentou intensidade de aproximadamente 10.000, enquanto *scaffolds* de grafeno, nas três concentrações, apresentaram aproximadamente 15.000. No dia 21, as diferenças foram observadas. Os três grupos de *scaffolds* revestidos com F1 apresentaram evidência de diferença quando comparados com seus respectivos sem F1. Ainda, *scaffolds* de PCL/grafeno 0.50% e 0.75% revestidos com F1 foram diferentes do grupo puro PCL também revestido com F1, apresentando intensidade aproximadamente de 20.000, 23.000 e 15.000, respectivamente.

Figura 33 - Viabilidade/proliferação celular pelo método *Alamar Blue* nos *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno em diferentes concentrações, revestidos e não revestidos com F1 nos tempos 7, 14 e 21 dias. Valores expressos pela intensidade da fluorescência obtida. Teste estatístico *Two-way ANOVA*, pós-teste *Bonferroni*. * Evidência de diferença estatística entre os grupos.

4.4.6 Adesão e morfologia das ADSCs no *scaffold* de PCL/grafeno 0.75% revestido com F1 por microscopia eletrônica de varredura

A **Figura 34** representa o *scaffold* de PCL/grafeno 0.75% revestido com o pico proteico F1 semeado com ADSCs 21 dias após o início do cultivo, sinalizadas com asterisco vermelho. É possível observar colônias celulares aderidas na estrutura de fibras do *scaffold*, bem como células bem espalhadas e com expansão citoplasmática formando “pontes” de um filamento para outro.

Figura 34 - Avaliação da adesão e morfologia das ADSCs por microscopia eletrônica de varredura nos *scaffolds* de PCL/grafeno 0.75% revestido com F1 cultivado em meio basal. O asterisco vermelho indica a presença de células.

4.4.7 Análise da atividade da fosfatase alcalina na diferenciação osteogênica das ADSCs nos *scaffolds* revestidos pelo pico proteico F1

A **Figura 35** apresenta a atividade da ALP nos tempos 7, 14 e 21 dias (**Figuras 35A, 35B e 35C**, respectivamente). No 7º dia, todos os *scaffolds* revestidos com a proteína F1 cultivados em meio indutor osteogênico (puro PCL e PCL/grafeno) apresentaram atividade da ALP mais elevada, diferente estatisticamente em comparação com os outros grupos (*scaffolds* não revestidos com F1 cultivados em meio indutor osteogênico e *scaffolds* revestidos e não revestidos cultivados em meio de cultura basal).

No 14º dia, o grupo de *scaffolds* revestidos com F1 cultivados em meio indutor osteogênico continuou apresentando maiores valores para atividade da ALP em comparação com os outros grupos. Entretanto, o grupo de *scaffolds* não revestidos com F1 cultivados em meio indutor osteogênico expressaram atividade de ALP maiores estatisticamente que todos os *scaffolds* cultivados em meio de cultura basal. No 21º dia, ambos os grupos cultivados em meio indutor osteogênico tiveram a atividade da ALP superior aos cultivados em meio basal. Ainda, o grupo revestido com F1 cultivado em meio indutor osteogênico apresentou valores superiores estatisticamente ao grupo de *scaffolds* não revestidos com F1, que apresentou valores de atividade de ALP semelhantes ao dia 14, enquanto os *scaffolds* revestidos com F1 apresentou valores duplicados de atividade da fosfatase alcalina. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações de *scaffolds* de um mesmo grupo.

Figura 35 - Atividade da fosfatase alcalina em *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno revestidos e não revestidos com o pico proteico F1. (A) Atividade da ALP após 7 dias. (B) 14 dias. (C) 21 dias. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. * Evidência de diferença estatística do grupo *scaffolds* + F1 em meio osteogênico em relação aos outros grupos. #Evidência de diferença estatística do grupo *scaffolds* em meio osteogênico em relação a ambos os grupos cultivados em meio basal.

4.4.8 Deposição de cálcio na matriz extracelular pelas ADSCs em *scaffolds* revestidos pelo pico proteico F1

A **Figura 36** expressa a quantificação do ARS em cada grupo e em cada concentração do biomaterial de acordo com a densidade ótica obtida após extração. Todos os grupos de *scaffolds* (revestidos e não revestidos com F1) cultivados em meio osteogênico foi encontrada diferença estatística para os *scaffolds* cultivados em meio de cultura basal, demonstrando deposição de cálcio para os grupos cultivados em meio indutor. No entanto, não foi observada diferença nem entre as concentrações e nem dos *scaffolds* revestidos com F1 em relação aos não revestidos.

Figura 36 - Quantificação da deposição de cálcio na matriz extracelular nos *scaffolds* puro PCL e PCL/grafeno em diferentes concentrações, revestidos e não revestidos com o pico proteico F1 cultivados em meio indutor osteogênico e meio basal. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey*. # Evidência de diferença estatística do grupo *scaffolds* em meio osteogênico em relação a ambos os grupos cultivados em meio basal.

4.4.9 Adesão e morfologia das ADSCs cultivadas em meio indutor osteogênico nos *scaffolds* por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal

As colônias de células aderidas nos biomateriais, nas imagens de microscopia eletrônica de varredura estão sinalizadas com asterisco vermelho (**Figura 37A**). É possível observar que a morfologia celular e a matriz extracelular produzida pelas ADSCs osteo-diferenciadas ou em processo de diferenciação nos diferentes *scaffolds* não são semelhantes ao que foi mostrado na **Figura 31** anteriormente, no item 4.4.3, onde as células nos *scaffolds* foram cultivadas em meio de cultura basal. É possível notar a formação de uma rede de matriz extracelular fibrilar e morfologia distinta do que já foi apresentado anteriormente.

As imagens adquiridas por microscopia confocal, em dois aumentos diferentes, também demonstram a presença das células por todo material (**Figura 37B**). Além disso, a morfologia celular novamente difere da morfologia observada na **Figura 31**. Após 28 em meio indutor osteogênico, a morfologia celular passou de fusiforme com extensões citoplasmáticas para morfologia quadrática com poucas extensões, principalmente nos *scaffolds* de PCL/grafeno 0.50% e 0.75%, resultado do processo de diferenciação.

Figura 37 - Avaliação da adesão e morfologia das ADSCs nos *scaffolds* revestidos com pico proteico F1 cultivadas em meio indutor osteogênico por 28 dias. (A) Imagens por microscopia eletrônica de varredura nos diferentes *scaffolds* em diferentes aumentos. O asterisco vermelho indica a presença de células. (B) Imagens por microscopia confocal dos diferentes *scaffolds* em 2 aumentos distintos.

5 Discussão

Desde os primeiros relatos de Friedenstein e colaboradores na década de 60, da descoberta de uma população celular diferenciada da medula óssea de camundongos, com capacidade de aderência ao plástico, contendo aspecto fibroblastóide, as CTMs derivadas da medula óssea têm sido extensivamente estudadas e suas propriedades terapêuticas descritas em diversos trabalhos experimentais e clínicos (CONGET; MINGUELL, 1999; HASTY; CHO, 2016; IKEBE; SUZUKI, 2014).

As CTMs podem ser encontradas e isoladas de diversas outras fontes. Em nosso trabalho foi optado por emprego das CTMs derivadas do tecido adiposo. Embora tenha sido sugerido por Al-Nbaheen et al. (2013) que as células tronco oriundas da medula óssea se diferenciam mais facilmente em osteoblastos, enquanto as do tecido adiposo em adipócitos, a quantidade de células disponíveis para isolamento no tecido adiposo não parece diminuir com a idade, tornando estas células vantajosas em relação as da medula (DAI et al., 2016; FRESE; DIJKMAN; HOERSTRUP, 2016; GRUBER et al., 2012; ZUTTON et al., 2013).

Frade et al. (2009) isolou, identificou e promoveu diferenciação de ADSCs em osteócitos, condrócitos e adipócitos. Em seus estudos, destacou-se o fato das ADSCs *in vitro* apresentarem um amplo citoplasma rico em constituintes da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina e vimentina, comprovado por imunocitoquímica. Por tais motivos, o tecido adiposo humano foi optado para ser utilizado neste trabalho como fonte de obtenção das CTMs, aqui referenciadas como ADSCs.

As ADSCs foram isoladas com sucesso do tecido adiposo humano, com ausência de contaminação bacteriana ou fúngica além de apresentarem, quando em cultura, propriedade de aderência ao plástico, aspecto fibroblastóide típico e painel imunofenotípico compatível, baseado na expressão de anticorpos positivos e negativos para essas células. Além disso, ao serem estimuladas as ADSCs se diferenciaram em adipócitos e osteoblastos *in vitro*, demonstrando a manutenção e preservação de sua multipotencialidade em cultura.

Juntos, os resultados de caracterização apresentados confirmam o sucesso do isolamento da cultura primária e a manutenção das ADSCs, compartilhando o perfil imunofenotípico e de multipotencialidade já descritos na literatura e preconizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (BUENO et al., 2009; DOMINICI et al., 2006; KERKIS & CAPLAN, 2012; KIM et al., 2014; RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2012).

O potencial de diferenciação osteogênico das ADSCs foi ainda avaliado pela atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP), enzima marcadora precoce da diferenciação osteogênica, o que fora constado já no 14º dia de cultura, tempo considerado precoce frente ao de mineralização da matriz extracelular, que ocorre em torno de 21 dias de cultura, como também demonstrado por alguns autores (PEREZ et al., 2012; RAI et al., 2010; SHIM et al., 2013).

Amostras de ADSCs osteogenicamente diferenciadas no 28º dia foram utilizadas para imunofenotipagem utilizando anticorpos positivos e negativos, incluindo HLA-ABC e HLA-DR, comparando-as às ADSCs indiferenciadas também mantidas por 28 dias em cultura em meio basal. Os resultados mostraram que, embora a percentagem de marcação dos anticorpos positivos tenha sido sutilmente reduzida em comparação com ADSCs indiferenciadas, o perfil imunofenotípico foram semelhantes. Mais importante, a expressão do HLA-DR manteve-se reduzida, abaixo de 1%, mostrando que mesmo em processo de diferenciação *in vitro*, as ADSCs ainda apresentavam baixo perfil imunogênico.

Ao manter o cultivo celular *in vitro* com meio de cultura apropriado, fazendo os subcultivos (ou passagens) quando a população celular atinge a confluência (aproximadamente 80%), as passagens aumentam e, consecutivamente, a população celular torna-se mais homogênea. Por este motivo, as ADSCs empregadas neste trabalho foram utilizadas, no mínimo, em sua 3ª passagem e no máximo na 5ª, buscando a utilização de população celular mais pura e não senescentes (FRESHNEY, 2010; GRUBER et al., 2012).

Com as ADSCs caracterizadas e suas propriedades já estabelecidas, buscou-se avaliar sua aderência e sua viabilidade quando semeadas em *scaffolds* poliméricos

tridimensionais, associando dois dos três princípios da engenharia tecidual: *scaffolds* como matriz/estrutura para o crescimento celular e células como elemento biológico.

Foi utilizada a técnica de fabricação aditiva por extrusão, camada a camada, por meio da impressora *3D Discovery* (RegenHU, Switserzland) do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Manchester (Reino Unido), sob supervisão do Professor Paulo Bártolo. Os *scaffolds* foram impressos com polímeros de policaprolactona segundo parâmetros considerados como ideal do ponto de vista mecânico (arquitetura, elasticidade, resistência, rigidez) e biológico (tamanhos de poros, porosidade, interconectividade), conforme já estudado e relatado pelo grupo (BARTOLO et al., 2011; DOMINGOS et al., 2012; DOMINGOS et al. 2013).

A policaprolactona é um material bem conhecido e utilizado na confecção de dispositivos biomédicos e/ou implantes pelas boas propriedades mecânicas e de biocompatibilidade, estando também associada a outros materiais por meio diferentes técnicas de produção (DIBA et al., 2012; DOMINGOS et al., 2013; KWEON et al., 2003; RAI et al., 2010). Com a desvantagem de ser considerado um material de superfície hidrofóbica, os *scaffolds* de policaprolactona foram submersos em banho de NaOH por 3 horas previamente aos ensaios *in vitro* com intuito de aumentar o número de células no *scaffold*, como já relatado por outros autores (POH et al., 2016; RAI et al., 2010; ZHOU et al., 2007). Este método químico não provocou danos ou micro-fissuras aparentes na estrutura filamentosa dos *scaffolds* e nem proporcionou qualquer dano às células, não influenciando os ensaios de toxicidade e diferenciação, como demonstrado por Wang et al. (2016b).

A fabricação aditiva por extrusão permitiu a produção de *scaffolds* com extrema precisão, com filamentos coesos e interligados nas camadas adjacentes, geometria interna bem definida, distribuição de poros uniforme e interconectados, características demonstradas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), independente do material e concentração utilizados (puro PCL e PCL/grafeno), resultados morfológicos estes que corroboram com os obtidos por Bartolo et al. (2009a, 2009b) e Domingos et al. (2013).

Requisitos importantes dos materiais para utilização na engenharia tecidual para regeneração óssea é a capacidade de suportar a aderência celular e permitir a diferenciação. Conforme suscitado na literatura, foram inoculadas 5×10^4 ADSCs sobre cada *scaffold*, concentração celular apropriada para ensaios *in vitro* de acordo com o tamanho de material empregado (CAETANO et al., 2016; DI LUCA et al., 2016; YU et al., 2015). O *scaffold* de PCL foi capaz de promover aderência e viabilidade celular em ambos os meios de cultura (meio basal e meio indutor osteogênico), demonstrado pela presença dos cristais de formazan em células metabolicamente ativas. Em paralelo, as ADSCs foram induzidas pelo meio de cultura à diferenciação osteogênica no *scaffold* de PCL avaliadas pelo vermelho de alizarina (ARS) quanto a mineralização da matriz, corroborando com outros autores que conduziram testes *in vitro* em diferentes *scaffolds* e também demonstraram este potencial (PEREZ et al., 2012; POH et al., 2016; RAI et al., 2010; SHIM et al., 2013). Embora não tenha sido feito testes que mostrassem a taxa de proliferação das células durante o seguimento, os *scaffolds* mostraram-se eficazes como arcabouço, uma vez que foram encontradas células após 14 dias e mineralização da matriz extracelular após 28 dias.

A análise morfológica por MEV e microscopia confocal ainda demonstrou pontualmente que os *scaffolds* foram capazes de fornecer um microambiente adequado para suportar a aderência celular, crescimento em colônias, bem como expansões celulares entre os filamentos dos *scaffolds* criando-se “pontes” celulares. O método empregado para a secagem dos materiais previamente à aquisição das imagens por MEV foi com o reagente químico hexametildissilazano (HMDS) no intuito de preservar a estrutura morfológica celular. Este procedimento foi utilizado como método alternativo à secagem em ponto crítico, como também relatado por Poh et al., (2016). Embora a estrutura e morfologia celular não tenha sido preservada como o esperado, foi possível observar a presença das células nos *scaffolds*. As imagens adquiridas por MEV e microscopia confocal das ADSCs aderidas ao *scaffold* de PCL, avaliadas qualitativamente, corroboram com os resultados *in vitro* encontrados no

ensaio de citotoxicidade quanto ao potencial de adesão celular e ausência de citotoxicidade por parte do material.

O sucesso na associação das ADSCs humanas nos *scaffolds* de PCL e os resultados *in vitro* demonstrando ausência de citotoxicidade e promoção da diferenciação osteogênica foram importantes para os ensaios de utilização dos biomateriais como implante xenogênico no modelo de defeito crítico de calvária. A escolha da calvária como modelo para mimetizar grandes perdas ósseas deve-se ao fato dela ser composta por osso membranoso (não há tecido cartilaginoso que sirva de base para formação óssea, mas apenas um tecido de natureza conjuntiva) e o suplemento sanguíneo é relativamente limitado, conferindo poucas propriedades para se regenerar espontaneamente. Além disto é uma área anatomicamente livre de estresse mecânico, de fácil implante de enxertos e estabilidade relativa das estruturas que circundam o defeito (GOTHARD et al., 2014; MANKANI et al., 2006).

O transplante autólogo é ainda considerado o padrão ouro como enxerto para reparo ósseo. No entanto, transplante alogênico e/ou xenogênico poderá ter um impacto prático em futuras aplicações clínicas, especialmente no tratamento ósseo de pacientes idosos, uma vez que a capacidade de proliferação e diferenciação das CTMs do paciente são idade-dependente, diminuindo com o envelhecimento (GUAN et al., 2012; HERMANN et al., 2010; ZONG et al., 2010). Abuna et al. (2016) compararam o potencial proliferativo e de diferenciação *in vitro* das CTMs da medula óssea extraídas de ratos de 1 mês de idade com as de ratos de 21 meses. Os autores observaram que as CTMs de 1 mês tiveram taxa proliferativa superior às de 21 meses, bem como maior atividade da fosfatase alcalina, confirmando que a proliferação e diferenciação osteogênica são idade-dependentes.

O grande problema relacionado aos transplantes alogênicos e/ou xenogênicos é a possibilidade de rejeição. As ADSCs utilizadas nesse trabalho apresentaram baixo perfil imunogênico por não expressarem moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II. Embora na literatura poucos são os estudos envolvendo transplante xenogênico celularizado para o reparo ósseo, alguns autores

defendem a ideia de que o xenotransplante possa vir a ser futuramente um método alternativo do ponto de vista econômico e de disponibilidade de amostras, porém destacam a necessidade de mais estudos para aumentar a segurança e eficácia de sua utilização a longo prazo (JANG et al., 2014; JANG et al., 2015; ZONG et al., 2010).

Visando o futuro emprego de transplantes alogênicos e/ou xenogênicos celularizados, este trabalho buscou avaliar o emprego de *scaffolds* pré-colonizados por ADSCs humanas, estimuladas ou não à pré-diferenciação osteogênica *in vitro* em modelo animal de calvária. O emprego dos *scaffolds* de PCL como arcabouço fabricados por manufatura aditiva mostrou ser benéfico para o influxo celular, visto que a produção tecidual foi superior nos três grupos com *scaffolds* comparados com o grupo controle (regeneração espontânea). A presença do marcador anti-mitocondrial humano no tecido dos animais que receberam implante de *scaffolds* colonizados com células humanas sugere que estas interagiram diretamente com o tecido animal, participando da restauração óssea por meio das suas propriedades regenerativas e imunossupressoras.

Os resultados de imunofenotipagem pós-diferenciação suportam esta teoria, visto que não foi observado expressão do marcador HLA-DR mesmo após 28 dias em cultura. Contudo, ainda há uma lacuna para extrapolação dos resultados observados *in vitro* para conclusões *in vivo* no que diz respeito ao comportamento das ADSCs (HASTY; CHO, 2016; IKEBE; SUZUKI, 2014).

Os efeitos benéficos das CTMs não ficam restritos à restauração celular, mas também relacionados aos efeitos parácrinos exercidos por elas (ALMUBARAK et al., 2016). Os resultados fortemente sugerem que os *scaffolds* semeados com ADSCs e implantados no modelo de calvária apresentou bioatividade, integração tecidual e favorecimento à osteoindução, como demonstrado pelas imagens de imunoistoquímicas, também relatado por Chuang et al. (2009) em modelo animal imunocompetente. Embora não tenha sido feito uma avaliação quantitativa, os animais que receberam *scaffolds* colonizados com células parece ter apresentado superior

expressão de proteínas morfogenética óssea 2 (BMP-2) comparado aos 2 grupos que não receberam células humana.

Durante o processo de regeneração, BMPs são produzidas pelas CTMs do próprio tecido, osteoblastos, condroblastos e células endoteliais, o que estimula a proliferação e diferenciação das próprias CTMs, angiogênese e produção de matriz. A BMP-2 atua na mobilização celular durante todo processo e também na osteogênese e condrogênese, sendo esta considerada um dos mais importantes fatores de crescimento relacionado a restauração óssea (NAIR et al., 2011; SANTO et al., 2013; SCHINDELER et al., 2008). Inúmeros trabalhos demonstram a aplicação e influência da BMP-2 na diferenciação osteogênica (ISSA et al., 2010, 2012; MACHADO et al., 2015; NGUYEN; LEE, 2013; PATEL 2015a, 2015b; SHIM et al., 2014; YONG et al., 2014; ZHAO et al., 2006, 2013).

Além disso, sabe-se que a BMP-2 influencia também na estimulação de formação de novos vasos para o suprimento de oxigênio e nutrientes ao tecido. A formação óssea é dependente de novos vasos sanguíneos (ALMUBARAK et al., 2016). Uma vascularização prejudicada leva ao interrompimento do processo regenerativo (ZHANG et al., 2012). Como proposto por Cai et al. (2014), uma sugestão promissora e interessante seria a criação de um substituto ósseo envolto por novos vasos sanguíneos com controlada ação de fatores de crescimento como VEGF e BMP-2 para modular a regeneração tecidual. Ainda, o desenvolvimento de uma terapia objetivando o crescimento vascular poderia auxiliar na aplicação de substitutos ósseos customizado.

Sartori et al. (2017) implantaram *scaffolds* semeados com CTMs humanas em modelo de implantes subcutâneos em animais imunocompetentes. Foi observado maior presença de VEGF no tecido animal e que este advinha das células humanas. Embora em nosso trabalho não tenha sido avaliada a presença de VEGF no tecido, as propriedades das ADSCs juntamente com maior presença de BMP-2 parecem ter favorecido a formação de novos vasos sanguíneos, como demonstrado por

imunoistoquímica com anticorpo anti-CD31 no tecido em formação, e também relatado por Huang et al. (2016).

Estudos pré-clínicos de implantes ósseos associados a CTMs têm demonstrado resultados promissores, porém ainda suscitam dúvidas quanto ao tipo de material do *scaffold* produzido, às diferentes técnicas de produção, à presença de CTMs (diferenciadas ou indiferenciadas) para transplantes (IZQUIERDO et al., 2007; MEINEL et al., 2006; PEISTER et al., 2009). Em nosso estudo, o transplante xenogênico de ADSCs humanas associadas ao *scaffold* de PCL em modelo animal demonstrou presença das células humanas no tecido após 8 semanas, bem como intensa expressão de BMP-2 e vasos sanguíneos.

Pela quantificação histológica do novo tecido ósseo formado, observou-se maior presença de tecido mineralizado no grupo SUC (implante de *scaffold* com ADSCs indiferenciadas), podendo ser explicado pela ação conjunta dos fatores descritos acima. Além disso, os achados da coloração com Tricrômio de Masson sinalizaram maior mineralização (cor vermelha) e fibras colágenas maduras (cor azul) no grupo SUC, como proposto por Lv et al. (2014) e Yu et al. (2015).

Roh et al. (2010) reportou que as CTMs humanas associadas a *scaffolds* poliméricos de ácido polilático e policaprolactona não eram mais detectáveis dentro de alguns dias pós-implantação. Os *scaffolds* foram intensamente colonizados por células animais, como monócitos, fibroblastos e células endoteliais. Os autores foram os primeiros a hipotetizar que *scaffolds* pré-semeados com células quando implantados *in vivo* secretariam fatores de quimioatração de monócitos, o que aumentou o recrutamento destas células para o local. Os resultados reportados pelos autores sugerem que o processo de restauração ocorre via processo inflamatório. Entretanto, a hipótese ainda não está elucidada, pois poderia prejudicar o estabelecimento de células humanas no tecido animal, mesmo estas apresentando baixo perfil imunogênico.

Zong et al. (2010) empregou células tronco humanas isoladas da medula óssea em *scaffolds* de ácido polilático glicólico poroso e demonstrou resultados promissores

na regeneração óssea em modelo de calvária após 20 semanas. Corroborando com nossos achados, os autores observaram que o grupo de animais que recebeu como tratamento *scaffolds* semeados com CTMs tiveram melhor regeneração comparado com *scaffolds* com CTMs pré-diferenciados *in vitro* (osteoblastos). Em ambos os grupos que receberam CTMs humanas foram encontradas células humanas no tecido do animal 10 semanas após o início do estudo.

Nos estudos citados acima, a técnica empregada para fabricação dos biomateriais não permite o controle na produção do formato dos poros, tamanho dos poros e interconectividade, parâmetros críticos para fabricação de implantes otimizados. Rai et al. (2010) investigaram a produção de *scaffolds* de tri-cálcio fosfato associado a policaprolactona (PCL/TCP) por extrusão dos filamentos camada a camada, método de manufatura aditiva semelhante ao utilizado em nosso trabalho. Os *scaffolds* foram colonizados por CTMs humanas, avaliados por meio de métodos *in vitro* e implantados *in vivo* em modelo animal. Os autores reportaram melhores propriedades dos materiais nos ensaios *in vitro*, porém nos ensaios *in vivo* não foram observados resultados promissores devido às dificuldades encontradas na transição do *in vitro* para o modelo *in vivo*.

Kim et al. (2010) cultivaram ADSCs e também células endoteliais de cordão umbilical (HUVEC) sobre *scaffolds* de PCL associados a outros materiais sintéticos e demonstraram uma melhor regeneração óssea em modelo animal, sugerindo papel importante do *scaffold* e dos fatores liberados pelas células endoteliais e CTMs, não somente para angiogênese, mas também como moduladores para o desenvolvimento ósseo, como também mencionado por Almubarak et al. (2016).

Kaigler et al. (2005) já havia relatado que células endoteliais produzem BMP-2. A BMP-2 tem sido utilizada em procedimentos experimentais e clínicos, entretanto, representam um material de alto custo e processo de difusão rápida, sendo assim impraticável para utilizar em grandes quantidades (NGUYEN; LEE, 2013; ZHAO et al., 2006, 2013). Muitos produtos naturais são conhecidos por apresentar propriedades cicatrizantes, indução celular a diferenciação e formação de novos vasos, baseadas no

conhecimento popular e evidências científicas (RANZATO et al., 2011). Dentre esses produtos naturais destaca-se o látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* estudado inicialmente na forma de uma membrana como curativo oclusivo de úlceras de pele. O processo de reparo ósseo é complexo, multifatorial e contínuo, semelhante ao processo de cicatrização de úlceras cutâneas (TERHEYDEN et al., 2012). Destacam-se inúmeros relatos de que a membrana de látex atuou nas fases da cicatrização, como na fase inflamatória, removendo tecido necrótico (desbridamento), mas também na proliferação e granulação teciduais, com evidente angiogênese (FRADE 2003, 2012).

O aumento da vascularização tem demonstrado melhor cicatrização de tecidos como pele e fraturas óssea (ALMUBARAK et al., 2016; MARTIN et al., 2010; SHEN et al., 2009). Kim et al. (2010) defende que a propriedade de regeneração óssea sem a formação de cicatriz é proporcionada pela rica e densa vascularização formada no processo de reparo ósseo, visto que o crescimento ósseo é dependente de uma rede vascular para suprimento celular adequado. Ainda, apesar das BMPs serem os fatores de crescimento responsáveis pela diferenciação de CTMs em condroblastos e osteoblastos, a presença de vasos sanguíneos, nutrientes e oxigenação é que conduz estas células a se diferenciarem em osteoblastos e não em condroblastos.

Diante das propriedades do látex, principalmente sua angiogenicidade, aliado aos dados da literatura que demonstram claro e evidente papel da neoformação vascular na formação óssea, buscou-se estudar potencial de utilização das proteínas naturais na engenharia tecidual e regeneração óssea. Balabanian et al. (2006) estudaram a aplicação do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* como potencializador da regeneração óssea em alvéolos dentários de ratos. Por meio de avaliação histológica e histomorfométrica, os autores relataram que o material teve biocompatibilidade com tecido ósseo e tecidos adjacentes, podendo este ser um candidato a ser empregado na formação óssea.

Ereno et al. (2010) avaliaram a ação da membrana de látex como curativo oclusivo na regeneração óssea em modelo de calvaria em coelhos. Os autores

relataram melhoria do reparo ósseo quando tratado com membrana de látex. Neste sentido, Issa et al. (2010; 2012) empregaram apenas a fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* em comparação com a BMP-2 em modelo de calvária. Ambas as proteínas foram aplicadas isoladamente ou carregadas por meio de géis na concentração de 5 µg. Os autores demonstraram maior atividade osteogênica nos grupos tratados com BMP-2 e satisfatória produção de fibras colágenas no grupo tratado com F1, como também reportado por Iyomasa et al. (2012). No entanto, não foram observados resultados satisfatórios com a utilização da fração F1 do látex, associado ou não ao colágeno, visando a regeneração óssea.

Machado et al. (2015) associaram o pico proteico F1 do látex e proteína recombinante BMP-2, separadamente, em selante de fibrina derivado de veneno de cobra em modelo animal de lesão na tibia. Ao encontro com os resultados observados por Issa et al. (2010; 2012), os autores reportaram melhores resultados no grupo tratado com selante de fibrina associado com BMP-2 e resultados satisfatórios no grupo que recebeu somente selante de fibrina. A formação óssea observada nos grupos que receberam o selante de fibrina está diretamente relacionada com sua estrutura espacial, capaz de proporcionar uma rede de fibras porosa. Estas características são essenciais para adesão e crescimento celular, como já demonstrado por Gasparotto et al. (2012, 2014) por meio de cultivo de CTMs.

Em nosso ensaio de diferenciação osteogênica das ADSCs no *scaffold* de PCL foi observado pequena coloração de vermelho de alizarina no grupo de *scaffolds* cultivados com ADSCs mantidos em meio basal. Estes *scaffolds* foram mantidos fixados no fundo da placa de cultura por meio do selante de fibrina derivado do plasma sanguíneo humano produzido em nosso laboratório. A parte inferior do *scaffolds* em contato com o selante de fibrina pode ter proporcionado diferenciação das ADSCs, mesmo em meio de cultura basal, o que corroboraria com os resultados encontrados por Machado et al. (2015).

Santos et al. (2015) estudaram comparativamente, por meio histológico, a utilização de uma esponja de colágeno e selante de fibrina derivada do plasma

humano para promover nova formação óssea em defeitos ósseos de calvária de rato. Os autores relataram ligeira vantagem do selante de fibrina em relação a esponja de colágena, apontando os efeitos benéficos deste material, porém novos estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

Em perdas ósseas, a restauração do tecido tem sido um desafio devido a perda da porção do periósteo, região rica em vasos sanguíneos, e, por consequência, grande responsável pelo aporte sanguíneo. Portanto, o aumento ao estímulo vascular por meio de fatores proteicos, naturais, acessível à população, poderia propiciar a cicatrização do tecido lesado (ALMUBARAK et al., 2016; GARCIA et al., 2008). Neste sentido, frente às propriedades do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* já descritas e, como mostrado por Mendonça (2004, 2010), após identificação, purificação e isolamento de três picos proteicos do látex, o pico proteico F1 apresentou estímulo à angiogênese e cicatrização na concentração de 0.01%, proporcionando fechamento das úlceras em menor tempo.

Inicialmente, antes do início de testes piloto utilizando o pico proteico F1 do látex em cultura de células, amostras de diferentes concentrações de F1 foram analisadas por meio do *Limulus Amebocyte Lysate* (LONZA), pelo Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, um ensaio padrão para detecção de endotoxina (lipopolissacarídeo) bacteriana Gram-negativas (LPS). Estas endotoxinas, um contaminante facilmente encontrado em produtos naturais, são capazes de alterar o metabolismo celular, promover excessiva resposta inflamatória e estimular a proliferação (DING; HO, 2010; SCHADICH et al., 2013). Os níveis de LPS encontrados foram inferiores a 0.1 EU/ μ g, considerado abaixo do ponto limite, de acordo com o fabricante e também relatado por Pereira et al. (2015), sendo considerado não contaminado por LPS.

O pico proteico F1 do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* foi utilizado em testes de citotoxicidade para avaliar a viabilidade das células pelo MTT, em

concentrações variando de 1 a 1000 µg/mL de F1 de meio de cultura. Todas as concentrações testadas não apresentaram citotoxicidade no período de 24, 48 e 72 horas estudados neste presente trabalho, como também relatado por Andrade (2012) em estudo semelhante utilizando outras concentrações de F1.

Lönnroth (2005) realizou estudos de citotoxicidade de um extrato de luva de látex em cultura de fibroblastos L929 por meio do método MTT. Os resultados apontaram citotoxicidade severa do extrato testado (viabilidade de até 30% em relação ao controle positivo). Assim, considerando o percentual de viabilidade proposto por Lönnroth (2005), a fração F1 mostrou-se sem citotoxicidade (viabilidade acima de 90% em relação ao controle positivo) em culturas de ADSCs e fibroblastos 3T3 nas variadas concentrações de F1 utilizadas.

O soro do látex pode ser separado em três fases: a fase intermediária é onde é encontrada o pico proteico F1 (C-serum), enquanto na fase densa inferior encontra-se um soro constituído de lutóides e partículas não relacionados a borracha (B-serum). Indo ao encontro com o relatado por Choedon et al. (2006), Lee et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade de B-serum em concentrações variando de 0 a 10 µg/mL em 3 diferentes linhagens celulares e observaram que células de origem cancerígenas foram afetadas pelo B-serum, demonstrando efeito anti-proliferativo. Os autores sugeriram sua utilização em terapias anti-câncer, com a hipótese de utilização no controle da proliferação de nichos celulares.

Os achados apresentados neste trabalho quanto a citotoxicidade do pico proteico F1 encontrado na porção C-serum diferem dos relatados por Choedon et al., (2006) e Lee et al. (2012), demonstrando maior segurança para seu uso em cultura de ADSCs. O ensaio de MTT, além de avaliar indiretamente a viabilidade celular, é também utilizada para hipotetizar a ação proliferativa (ou anti-proliferativa), como já mencionado e utilizado por outros autores. Os resultados do ensaio de citotoxicidade apresentou, na maioria das concentrações de F1, percentagem igual ou superior ao controle basal (células cultivadas em meio de cultura basal 10% SBF sem adição de

F1). Estes achados nos indicaram que o pico proteico F1 poderia estar atuando como estimulador da proliferação de ADSCs e fibroblastos 3T3.

O teste de incorporação da timidina tritiada, um teste de proliferação celular, demonstrou que as concentrações de 1 µg/mL e 0.1 µg/mL de F1 estimulou a proliferação das ADSCs estatisticamente superior à proliferação basal, enquanto para fibroblastos 3T3 apenas a concentração de 1 µg/mL foi proliferativa. Visando corroborar e melhor entender os efeitos do pico F1 em cultura de ADSCs, foi avaliada a migração celular *in vitro* no sentido das bordas para o centro na tentativa de fechar o “arranhão” (lesão) feito na camada de células aderentes no fundo do poço, por meio do modelo de migração celular *in vitro* (*Scratch Assay*). Os resultados apontaram que as concentrações de 1 µg/mL e 0.1 µg/mL de F1, entre outras, também estimularam a migração celular *in vitro*.

Diante da segurança e estímulo proliferativo observada pela proteína F1, aliada às constatações *in vitro*, pré-clínicas e clínicas já anteriormente relatadas quanto ao látex da seringueira *Hevea brasiliensis* (membrana de látex e F1), o pico proteico F1 torna-se um promissor candidato para utilização na medicina regenerativa. Diante dos resultados encontrados e da bioatividade proporcionado pelo F1, duas concentrações foram escolhidas para avaliação *in vitro* quanto ao potencial de diferenciação osteogênica das ADSCs, sendo elas de 1 µg/mL e 0.1 µg/mL. Em testes piloto empregando estas e outras 2 concentrações de F1 (uma concentração superior e outra inferior) em meio de cultura basal por 7, 14 e 21 dias, o pico proteico F1 não estimulou a diferenciação osteogênica por meio da mensuração da atividade da fosfatase alcalina (ALP). Em meio de cultura indutor osteogênico, foi observado aumento da ALP tanto para o grupo controle positivo (meio de cultura indutor sem F1) como para ambas as concentrações de F1 nos dois modelos de testes abordados.

Diante disso, em testes *in vitro* em cultura de ADSCs, o pico proteico F1 foi viável, proliferativo, estimulou a migração celular, porém não foi capaz de promover e/ou potencializar a diferenciação osteogênica. Estes achados corroboram com os trabalhos já citados onde foi empregado o látex em modelo de regeneração óssea *in*

vivo. Uma hipótese para tal fato é que o pico proteico F1 estimularia a proliferação celular, evento oposto à diferenciação. A taxa proliferativa é inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular. Com isso, conforme as CTMs comprometem-se com uma linhagem celular, sua taxa proliferativa decresce (FRESHNEY 2010). O pico proteico F1 sendo capaz de estimular a proliferação não estimularia a diferenciação celular em meio de cultura basal e nem potencializaria em meio de cultura indutor. Contudo, o pico proteico F1 não prejudicou a expressão da ALP, pois ambas as concentrações de F1 mostraram-se similares ao controle positivo.

Após os testes em células aderidas a placa de cultura (cultura 2D), o pico proteico F1 foi associado aos *scaffolds* (adsorção). O intuito foi acrescentar o terceiro princípio da engenharia tecidual, um fator proteico estimulador. Além disso, os *scaffolds* de PCL foram acrescidos de grafeno, em baixas concentrações, material de atual estudo pelo grupo do Prof. Paulo Bartolo da Universidade de Manchester, da Escola de Engenharia Mecânica, Aeroespacial e Civil e Diretor do Centro de Biomanufatura Aditiva de Manchester.

Previamente aos ensaios de associação do F1 e *scaffolds* (PCL/grafeno), os mesmos foram testados em cultura de células quanto a sua viabilidade sem a presença do F1 para primeiramente entender a influência do grafeno em baixas concentrações. O rápido aumento na divulgação de informações sobre dispositivos biomédicos a base de grafeno nos últimos anos sugere o potencial que este material possui para ser utilizado na área de medicina regenerativa. Entretanto, seu uso em ensaios clínicos ainda é limitado devido às questões de segurança e toxicidade. Há inúmeros relatos que revisam sua toxicidade e não biocompatibilidade, porém não há relatos consistentes de segurança quanto ao tempo e concentração de grafeno quando estes são empregados como substratos na regeneração tecidual associados a células (KUMAR; CHATTERJEE, 2016; KUMAR et al., 2016).

Os *scaffolds* de PCL/grafeno (0.25%, 0.50% e 0.75%), padronizados e produzidos por sistema de manufatura aditiva, propiciaram aumento na proliferação celular proporcionalmente à sua concentração ao longo do tempo, principalmente na

concentração de 0.75% em comparação com puro PCL. Conforme descrito por Kumar e Chatterjee (2016), reforço de grafeno em polímeros sintéticos tem demonstrado aumento das propriedades mecânicas, elétricas, hidrofílicas e nanotopográficas, resultando em adesão celular e adsorção de proteínas e/ou fatores de crescimento mais eficiente. Assim buscou-se a associação do pico proteico F1 com os *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno por meio do método de adsorção.

De acordo com Patel et al. (2015a, 2015b), o tempo de adsorção *in vitro* e a temperatura empregados no método não causariam diferenças significativas no procedimento. Os autores observaram leve superioridade nas condições de processamento em baixa temperatura (4°C), no entanto não foi relatado diferenças quanto ao tempo de adsorção. Desta forma, neste trabalho foi empregado o tempo de adsorção de 24 horas à 4°C. A concentração inicial de solução de F1 de 0.05% (500 µg/mL) para adsorção foi escolhida após alguns ensaios piloto em diferentes concentrações. O grupo de pesquisa buscou a utilização de uma dose de F1 onde a concentração proteica liberada pudesse ser semelhante à utilizada nos ensaios *in vitro* em cultura 2D na presença do F1 (0.1 µg/mL a 10 µg/mL). Foi liberada aproximadamente de 12 a 18 µg de F1 inicialmente, e um total de aproximadamente 17 a 23 µg ao longo do tempo.

É importante notar que a maior parte das proteínas foi liberada rapidamente, dentro do período de 24 horas. Esta rápida liberação observada não é apropriada quando o objetivo é uma liberação controlada por longo período de tempo. Em modelos de cultura celular *in vitro*, o meio de cultura geralmente é trocado a cada 72 horas para prevenir a morte celular por falta de nutrientes e mudança drástica do pH. Diante disso, a dose inicial de F1 em contato com as células no *scaffold* foi de 12 a 18 µg. Após a primeira troca do meio e cultura, aproximadamente 5 µg foi liberada pelos *scaffolds* do tempo 3 a 14 dias. Neste período, pelo menos outras 3 trocas de meio de cultura foram feitas. Contudo, todas as concentrações liberadas estão dentro do intervalo considerado estimulador estudado *in vitro*.

Os resultados obtidos após a adsorção demonstram que a concentração proteica adsorvida pelos *scaffolds* não foi significativa, visto que apenas 15% do total de proteínas da solução de 0.05% foi adsorvida (aproximadamente 80 µg de proteína foi adsorvida por cada *scaffold*, de um total de aproximadamente 550 µg em solução utilizada). Ainda, pode-se observar que não houve diferença de adsorção entre as amostras utilizadas.

Embora a adição de grafeno a dispositivos biomédicos tem sido sugerida por alguns autores para aumentar a adsorção de proteínas (AKHAVAN et al., 2013; LEE et al., 2011), este não foi observado em nossos resultados. Isto pode ser explicado pela natureza hidrofóbica da policaprolactona, visto que a adsorção foi baixa e semelhante entre todos os *scaffolds* ou ainda pela baixa concentração de grafeno empregada, sendo a maior delas de 0.75%, o que provavelmente não seria o suficiente para promover uma adsorção mais eficaz.

Os *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno revestidos com pico proteico F1 foram utilizados no ensaio de proliferação celular. O aumento progressivo da intensidade da fluorescência ao longo do tempo sinaliza, indiretamente, viabilidade e proliferação celular para todos os grupos. A concentração proteica liberada foi capaz de estimular as células à proliferação celular, obtendo valores de fluorescência superiores aos *scaffolds* sem F1. No último ponto de tempo mensurado (dia 21), a diferença de proliferação foi de aproximadamente 35% superior para o grupo PCL/grafeno 0.75% com F1. Desta forma, pode-se observar que ambos, *scaffolds* com adição de grafeno e revestimento de F1, tiveram impacto positivo quanto a proliferação celular. Ainda, os resultados encontrados para os *scaffolds* adsorvidos com F1 corroboram com os ensaios de proliferação celular em monocamada por meio da incorporação da timidina tritiada na presença do F1.

O efeito físico-biológico do grafeno sobre o comportamento celular ainda não está bem elucidado. Como as propriedades superficiais do grafeno podem ser facilmente modificados/adaptados, estes oferecem oportunidades de estimulação celular para maximizar a resposta biológica desejada (DUBEY et al., 2015; GOENKA et

al., 2014). De acordo com Kumar e Chatterjee (2016), a multifuncional natureza dos substratos de grafeno tem demonstrado influenciar o comportamento de diferentes tipos celulares, devido ao aumento das propriedades mecânicas, elétricas, hidrofílicas e nanotopográficas. Em nosso estudo, o PCL/grafeno 0.75% se mostrou como o melhor candidato para utilização na engenharia tecidual quanto ao estímulo proliferativo. A padronização da geometria dos *scaffolds*, estrutura, porosidade e interconectividade, conduzida pelo grupo do Prof. Paulo Bartolo, somada à adição de grafeno, combinados com o efeito ativo-biológico proporcionado pelo pico proteico F1 do látex foram capazes de suportar o crescimento celular de forma significativa.

No ensaio de diferenciação osteogênica avaliado pela ALP utilizando ADSCs em *scaffolds* de puro PCL e PCL/grafeno revestidos com F1, interessante, os *scaffolds* revestidos com F1 cultivados em meio indutor osteogênico expressaram ALP superiores estatisticamente ao grupo de *scaffolds* sem F1 cultivados também em meio indutor osteogênico logo no 7º dia de análise. Os ensaios de ALP feitos anteriormente em monocamada de células (2D) não tinha sido observado indução a diferenciação logo no 7º dia, como foi observado nos *scaffolds* com F1. No 14º e 21º dias, o grupo cultivado com F1 expressaram valores ainda superiores que o grupo sem F1, sendo ambos superiores aos grupos cultivados em meio basal (com e sem F1). Este ensaio em *scaffolds* 3D demonstrou que o pico proteico F1 foi capaz de acelerar o processo de diferenciação osteogênica, dado não evidenciado nos ensaios em cultura 2D.

Corroborando com a avaliação da ALP, *scaffolds* semeados com ADSCs cultivados em meio indutor osteogênico foi observada presença de matriz mineralizada de cálcio, avaliada pela quantificação da ARS. Os resultados mostram que as ADSCs aderidas nos *scaffolds* foram capazes de sofrer diferenciação osteogênica e produzir cálcio na matriz extracelular. Embora a atividade da fosfatase alcalina tenha sido mais intensa nos *scaffolds* revestidos com F1 cultivados em meio indutor, a formação de cálcio não apresentou o mesmo perfil. Todos os grupos cultivados em meio indutor apresentaram-se semelhantes entre si.

Como observado pelas imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal, os *scaffolds* foram capazes de permitir que as ADSCs aderissem, difundissem pelo material e sofressem processo de osteodiferenciação. Foi possível notar a formação de uma rede de matriz extracelular fibrilar, composta por deposição de cálcio e morfologia distinta do que já foi apresentado anteriormente.

Ensaio com *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno, nas concentrações e parâmetros utilizados neste trabalho, associado ao pico proteico F1 constituem-se como resultados inéditos por nosso grupo. Uma hipótese para a expressão superior de ALP nos grupos com F1 pode ser explicada pelo estímulo proteico em cultura 3D empregada. A cultura 3D em *scaffolds* torna-se uma ferramenta para mimetizar a real conformação celular/tecidual, proporcionando um melhor ambiente biológico. Desta forma, a cultura 3D e a ação do pico proteico F1 do látex podem ter influenciado na diferenciação osteogênica.

Akhavan et al. (2013) mostraram que um padrão de nano-estruturas de grafeno proporcionou a diferenciação osteogênica de CTMs. O padrão de nano-estruturas fornece características de rede nano-topográfica para adsorção aumentada de biomoléculas. A combinação de biomoléculas adsorvidas e o padrão superficial físico induzido guiou as células à diferenciação. De acordo com Lee et al. (2011), a natureza do grafeno proporciona melhor adsorção de biomoléculas. Os autores demonstraram maior produção de matriz extracelular mineralizada por CTMs cultivadas em biofilmes de grafeno preparados a 0.1%. Os autores sugerem que o biofilme proporcionou maior adsorção de dexametasona proveniente do meio de cultura indutor, o que interagiu com as CTMs, resultando em diferenciação osteogênica superior. O mesmo pode ter ocorrido no processo de diferenciação osteogênica dos *scaffolds* revestidos com pico proteico F1. Contudo, o *scaffolds* de puro PCL também expressaram valores superiores de ALP, semelhante ao PCL/grafeno. Assim, sugere-se que a maior influência para os significantes resultados de diferenciação encontrados pode ter vindo do pico proteico F1 em cultura 3D.

O uso de substratos padronizados para orientar o destino das CTMs está atraindo interesse na área de engenharia de tecidos. Alguns autores têm relatado que a rigidez e rugosidade do substrato proporcionada pelas propriedades do grafeno podem alterar o comportamento celular (ARYAEI et al., 2014; KUMAR; CHATTERJEE, 2016). Nayak et al. (2011) relatou que materiais a base de grafeno com diferentes níveis de rigidez não são promissores quanto a ancoragem celular, porém podem guiar a diferenciação osteogênica mediada pelo estresse concedido pelo material. Em um estudo semelhante, Balikov et al. (2016) relataram associação de estímulo elétrico com padrão superficial físico de substrato de grafeno para regular o comportamento de CTMs.

Os *scaffolds*, empregados como arcabouços para suporte e crescimento celular 3D, mimetizando o tecido ósseo verdadeiro, providenciaram arquitetura e espaço físico adequados para crescimento celular e as baixas concentrações de grafeno empregadas na fabricação de *scaffolds* foram capazes de estimular maior taxa de proliferação celular. Sabe-se da importância da conformação arquitetural dos *scaffolds* na engenharia tecidual, no entanto, informações detalhadas sobre a influência dos poros internos na osteogênese ainda não está bem elucidada.

A fabricação de *scaffolds* para utilização na área de implante ósseo deve ser baseada na porosidade e no tamanho de poros adequados na tentativa de mimetizar um osso biológico. Considerando que o osso trabecular típico tem porosidade na faixa de 50% - 90% e tamanhos de poros variando de aproximadamente 1.5 μm a algumas centenas, Correia et al. (2012) observaram que poros de 400 μm – 600 μm promoveram melhor diferenciação de ADSCs, enquanto Kim et al. (2013) alcançaram melhores resultados com poros de 300 μm . Por outro lado, Phipps et al. (2012) apresentaram hipótese de que poros de aproximadamente 900 μm suportariam melhor a infiltração celular devido ao maior espaço interno e consequentes efeitos benéficos para osteogênese.

Com intuito de fabricar e testar *scaffolds* que mimetizassem os variados tamanhos de poros encontrados no osso trabecular, Huri et al. (2014) produziram três

diferentes *scaffolds* de PCL quanto ao tamanho dos poros: 200 μm , 500 μm e 1000 μm . Os autores relataram que poros menores tiveram melhor dispersão celular pelo *scaffold* e formação de “pontes” celulares entre filamentos, enquanto em poros maiores as células não se expandiram entre filamentos, porém cobriram maior espaço físico-estrutural. A taxa de proliferação foi proporcional ao tamanho dos poros, com maior número de células em *scaffolds* com poros de 1000 μm e que a osteogênese foi semelhante para 500 μm e 1000 μm , ambos com melhores resultados dos encontrados em 200 μm . Contudo, quanto maior o tamanho dos poros, menores são as propriedades mecânicas, tornando-se menos resistentes.

O tamanho dos poros dos *scaffolds* fabricados para este trabalho foi de aproximadamente 350 μm com otimizada propriedade mecânica, do ponto de vista físico-estrutural (WANG et al., 2016a). De acordo com os resultados encontrados na literatura, nossos *scaffolds* possuem tamanho de poros adequados para suportar infiltração celular, proliferação e diferenciação. Como hipotetizado por Habibovic et al. (2006) a porosidade também é uma propriedade com potencial de influenciar a osteoindução, pois os autores observaram maior crescimento ósseo em *scaffolds* com maior grau de porosidade. Suportado por Aarvold et al. (2013) e Karageorgiou e Kaplan (2005), os *scaffolds* produzidos por nosso grupo pelo sistema e manufatura aditiva contem poros interconectados, o que proporciona maior grau de porosidade, reprodutibilidade, interação/comunicação célula-célula, fácil passagem de nutrientes em seu interior e principalmente espaço para vascularização. Os resultados *in vitro* e *in vivo* encontrados mostram que o padrão de *scaffold* utilizado foi benéfico tanto para proliferação celular quanto para diferenciação.

Recentemente, Di Luca et al. (2016) demonstraram que *scaffolds* fabricados com um gradiente de tamanho de poros no mesmo material ao longo do eixo Z pode influenciar a diferenciação osteogênica. As células residentes em diferentes áreas do gradiente dos poros exibiram tendências diferentes quanto a sua diferenciação osteogênica conforme o aumento do tamanho dos poros (500 μm a 1100 μm),

provavelmente devido a um melhor suprimento de nutrientes e oxigênio nos compartimentos com maiores poros.

Nos últimos anos tem tido um rápido aumento no interesse de fabricação de biomateriais que podem proporcionar estabilidade e resistência mecânica, além de fornecer bioatividade e integração *in vivo* sem qualquer relato de toxicidade. Diante disso, um material que parece bastante promissor quanto a essas propriedades é o grafeno, no entanto, estudos mais aprofundados são ainda necessários para validar o material, assim como as características dos *scaffolds* do ponto de vista físico, químico, morfológico e biológico.

Embora os resultados *in vitro* sejam promissores, demonstrando que os materiais reforçados com grafeno possam ser bons candidatos para aplicação na engenharia tecidual, sua performance como substrato em modelo *in vivo* ainda não está bem compreendida. Os poucos estudos *in vivo* com implantes de grafeno relatam pouco tempo de implantação e, embora tenham sido favoráveis à sua utilização, os dados ainda são inconsistentes (KUMAR; CHATTERJEE, 2016; KUMAR et al., 2016).

Os ensaios conduzidos neste trabalho demonstraram que os *scaffolds* sintéticos fabricados por impressão tridimensional atuou como um ambiente adequado para suportar o crescimento e diferenciação das ADSCs humanas. O grafeno, em baixa concentração, mostrou-se estimulador da proliferação celular. A adsorção e posterior liberação do pico proteico F1 dos *scaffolds* apresentou resultados interessantes, com proliferação celular ainda mais evidente, assim como potencializou a diferenciação osteogênica no modelo de cultivo celular tridimensional. Estes achados mostram uma otimização do processo de crescimento celular e formação óssea *in vitro*.

Contudo, devido a oportunidade de estudar por 12 meses no Centro de Biomanufatura Aditiva da Escola de Engenharia Mecânica, Aeroespacial e Civil da Universidade de Manchester, sob supervisão e direção do Prof. Paulo Bártolo, não tivemos tempo hábil para conduzir os testes *in vivo* em modelo animal de calvária empregando *scaffolds* de PCL e PCL/grafeno semeados com ADSCs e revestidos com pico proteico F1 do látex (bioativos). No entanto, a partir dos estudos iniciais

realizados na Universidade de Manchester, somados aos resultados obtidos com o pico proteico F1, novos *scaffolds* poderão ser empregados nos estudos *in vivo* associados com a proteína F1 e assim obtermos informações suficientes para pressupor sua utilização.

6 Conclusões

- ✓ Células tronco mesenquimais foram isoladas com sucesso do tecido adiposo humano (ADSCs), caracterizadas e expandidas *in vitro* mantendo seu potencial de proliferação e multipotencialidade.
- ✓ *Scaffolds* com apropriado controle sobre sua fabricação e topologia (tamanhos de poros, porosidade, arquitetura, interconectividade) foram produzidos com extrema precisão por meio de um sistema de manufatura aditiva por extrusão.
- ✓ *Scaffolds* de policaprolactona proporcionaram adesão, crescimento e diferenciação das ADSCs humanas *in vitro*. Ainda, quando colonizados com ADSCs humanas apresentaram osteointegração e osteoindução com o tecido animal em defeito crítico de calvária (transplante xenogênico celularizado *in vivo*), proporcionando formação óssea mineralizada mais evidente.
- ✓ A adição de baixas concentrações de grafeno ao *scaffold* de policaprolactona não exibiu citotoxicidade *in vitro* e estimulou a proliferação de ADSCs humanas em comparação com *scaffold* de pura policaprolactona.
- ✓ *Scaffolds* de policaprolactona e policaprolactona associada ao grafeno em baixas concentrações fabricados por extrusão revestidos com o pico proteico F1 do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* foram capazes de proporcionar crescimento tridimensional das ADSCs humanas e estimular a proliferação e diferenciação osteogênica em comparação com *scaffolds* não revestidos com F1, abrindo perspectivas de sua utilização futura na engenharia tecidual.

Referências

AARVOLD, A. et al. The effect of porosity of a biphasic ceramic scaffold on human skeletal stem cell growth and differentiation in vivo. **J Biomed Mater Res Part A**, v. 101A, p.3431–3437, 2013.

ABUNA, R.P. et al. Aging impairs osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells grown on titanium by favoring adipogenesis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 4, p.376-82, 2016.

ADACHI, J. D. et al. Impact of prevalent fractures on quality of life: baseline results from the global longitudinal study of osteoporosis in women. **Clinic Proceedings**, v. 85, n. 9, p. 806-813, 2010.

AI-AQL, Z. S. et al. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **Journal of dental research**, v. 87, n. 2, p.107-118, 2008.

AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. Bones and Skeletal System. **Anatomy & Physiology of Domestic Animals**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.131-168.

AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; SHAHSAVAR, M. Graphene Nanogrids for Selective and Fast Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Carbon**, v. 59, p. 200–211, 2013.

ALHAG, M. et al. Evaluation of the ability of collagen–glycosaminoglycan scaffolds with or without mesenchymal stem cells to heal bone defects in Wistar rats. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 16, n. 1, p. 47–55, 2012.

ALMUBARAK, S. et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. **Bone**, v. 29, n. 83, p. 197-209, 2016.

AL-NBAHEEN, M. et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 9, n. 1, p. 32-43, 2013.

ANDRADE, T. A. **Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**. 2012. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ANDRADE, T. A.; IYER, A.; DAS, P. K. et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011.

ARAVAMUDHAN, A. M. et al. Osteoinductive small molecules: growth factor alternatives for bone tissue engineering. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 19, p. 3420-8, 2013.

ARYAEI, A.; JAYATISSA, A. H.; JAYASURIYA, A. C. The Effect of Graphene Substrate on Osteoblast Cell Adhesion and Proliferation. **J. Biomed. Mater. Res., Part A**, v. 102, p. 3282–3290, 2014.

BALABANIAN, C. A.; COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 201–205, 2006.

BALIKOV, D. A.; et al. Directing Lineage Specification of Human Mesenchymal Stem Cells by Decoupling Electrical Stimulation and Physical Patterning on Unmodified Graphene. **Nanoscale**, v. 8, p. 13730–13739, 2016.

BALLYNS, J. J.; BONASSAR, L. J. Image-guided tissue engineering. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 8a, p. 1428–1436, 2009.

BANERJEE, B. et al. Unique and shared IgE epitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex allergy. **Molecular immunology**, v. 37, n. 12, p. 789–98, 2000.

BARANOSKI, S.; AYELLO, E. A. **Wound Care Essentials**. 1o Ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 487 p.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.

BARTOLO, P. J. et al. BioCell printing: integrated automated assembly system for tissue engineering constructs. **CIRP Annals-Manufacturing Technology**, v. 60, n. 1, p. 271–4, 2011.

BARTOLO, P. J.; ALMEIDA, H.; LAOUI, T. Rapid prototyping and manufacturing for tissue engineering scaffolds. **International Journal of Computer Applications in Technology**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2009a.

BARTOLO, P. J. et al. Biomanufacturing for tissue engineering: present and future trends. **Virtual and Physical Prototyping**, v. 4, n. 4, p. 203–16, 2009b.

BARTOLO, P. J. et al. **Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering**. In BIDANDA, B.; BARTOLO, P. J. *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications*, New York, USA, 2008, cap. 8, p. 149–170. Ed Springer.

BARTOLO, P. J. et al. Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes. **CIRP Annals-Manufacturing Technology**, v. 61, n. 2, p. 635–655, 2012.

- BASHA, R. Y.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 57, p. 452-63, 2015.
- BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. **Cell Stem Cell**, v. 13, p. 392-402, 2013.
- BITTENCOURT, R. A. C.; et al. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.1, p.22-24, 2006.
- BORRA, R. C. et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 255-262, 2009.
- BORRELLI, J. et al. Physiological challenges of bone repair. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 26, n. 12, p. 708-11, 2012.
- BROWN, T. D.; DALTON, P. D.; HUTMACHER, D. W. Direct writing by way of melt electrospinning. **Advanced Materials**, v. 23, n. 47, p. 5651-5657, 2011.
- BUENO, D. F. et al. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 2, p. 427-35, 2008.
- BUTLER, K. L. et al. Stem cells and burns: review and therapeutic implications. **Journal of Burn Care & Research**, v. 31, n. 6, p. 874-81, 2010.
- CAETANO, G. F. et al. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 5, p. 1013-22, 2015.
- CAETANO, G. F. et al. Cellularized versus decellularized scaffolds for bone regeneration. **Materials Letter**, v. 182, p. 318-322, 2016.
- CAI, W. X. et al. Effect of different rhBMP-2 and TG-VEGF ratios on the formation of heterotopic bone and neovessels. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- CAMERON R. M. et al. Bone Tissue Engineering. **Curr Mol Bio Rep**, v. 1, p. 132-140, 2015.
- CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

- CAPLAN, A. I.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Cell Stem Cell**, v. 9, p. 11–5, 2011.
- CHA, J.; FALANGA, V. Stem cells in cutaneous wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 73–78, 2007.
- CHAPEKAR, M. S. Tissue engineering: challenges and opportunities. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, n. 6, p. 617–620, 2000.
- CHEN, K. et al. Osteochondral interface generation by rabbit bone marrow stromal cells and osteoblasts coculture. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 17-18, p. 1902-11, 2012.
- CHOEDON, T. et al. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 16, p. 2517-22, 2006.
- CHOI, E. W. et al. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 1, p. 243-53, 2012.
- CHUANG, C. K. et al. Xenotransplantation of human mesenchymal stem cells into immunocompetent rats for calvarial bone repair. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 2, p. 479-88, 2009.
- CLARK, R. A.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1018–1029, 2007.
- CONGET, P. A.; MINGUELL, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **J Cell Physiol**, v. 181, p. 67-73, 1999.
- CORREIA, C. et al. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells **Acta Biomater**, v. 8, p. 2483–92, 2012.
- CORSI, K. A. et al. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 10, p. 1261-8, 2007.
- CZEKANSKA, E. M. et al. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. **European Cells and Materials**, v. 24, p. 1-17, 2012.
- DAI PRÈ, E. et al. Hyaluronic Acid (HA) Scaffolds and Multipotent Stromal Cells (MSCs) in Regenerative Medicine. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 12, n. 6, p. 664-81, 2016.

DAI, R. et al. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Stem Cells International**, n. 8, p. 1-15, 2016.

DAWSON, J. I. et al. Concise review: bridging the gap: bone regeneration using skeletal stem cell-based strategies—where are we now? **Stem Cells**, v. 32, p. 35–44, 2014.

DÉGANO, I. R. et al. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 29, n. 4, p. 427–437, 2008.

DI LUCA A, et al. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. **Scientific reports**, v. 6, p.1-13, 2016.

DI NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838-43, 2002.

DIBA, M.; et al. Preparation and characterization of polycaprolactone/forsterite nanocomposite porous scaffolds designed for bone tissue regeneration. **Composites Science and Technology**, v. 72, p. 716–723, 2012.

DING, J. L.; HO, B. **Endotoxin detection—from limulus amebocyte lysate to recombinant factor C**. In *Endotoxins: Structure, Function and Recognition 2010* (pp. 187-208). Springer Netherlands.

DOMINGOS, M. et al. Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D bioextruded poly (ε-caprolactone) scaffolds. **Rapid Prototyping Journal**, v. 18, n. 1, p. 56-67, 2012.

DOMINGOS, M. et al. The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly (ε-caprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and in vitro hMSC viability. **Biofabrication**, v. 5, n. 4, p. 045004, 2013.

DOMINGOS, M. et al. Polycaprolactone Scaffolds Fabricated via Bioextrusion for Tissue Engineering Applications. **International Journal of Biomaterials**, v. 8, p. 1-9, 2009.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DUBEY, N.; et al. Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering. **Stem Cells Int**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

EBERLI, D.; et al. One and four-layer acellular bladder matrix for fascial tissue reconstruction. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 22, n. 3, p. 741-51, 2011.

ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95, n. 3, p. 932-9, 2010.

FALANGA, V. et al. Autologous Bone Marrow-Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells Delivered in a Fibrin Spray Accelerate Healing in Murine and Human Cutaneous Wounds. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 6, p. 1299- 1312, 2007.

FRADE, M. A. C. et al. Fibrin glue scaffold for autologous keratinocytes to treat diabetic ulcers. In: II International Conference on Tissue Engineering. Lisboa-Portugal, 2 a 4 de Junho, 2011. **Proceedings ICTE 2011**.

FRADE, M. A. C. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 164 f. Tese (Doutorado em Medicina; Área: Dermatologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FRADE, M. A. C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 1, p. 45-51, 2012.

FRADE, M. A. C. et al. Células-tronco mesenquimais derivadas de adipócitos (ADSCs): eficiência de isolamento, caracterização e diferenciação pré e pós-transdução viral para expressão de proteína verde GFP. In: 64º Congresso da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Belém-Pará, 5 a 9 de setembro, 2009. **Anais em CD-ROM**, Belém, 2009.

FRESE, L.; DIJKMAN, P. E.; HOERSTRUP, S. P. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 268-74, 2016.

FRESHNEY R. I. **Culture of animal cells**. 6th Ed. Cell Proliferation. 2010, 717p. Wiley-Blackwell.

FRIEDENSTEIN, A. J.; et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Experimental Hematology**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, p. 381-390, 1966.

FRONZA, M., et al. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 463-467, 2009.

FURLANETO, F.A. et al. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, p. 311-318, 2007.

GARCIA, P. et al. Development of a reliable non-union model in mice. **J Surg Res.**, v. 147, p. 84–91, 2008.

GASPAROTTO, V.P. et al. Viability of Fibrin Sealant from Snake Venom as Scaffold to Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Toxicon**, v. 60, n. 2, p. 108, 2012.

GASPAROTTO, V.P. et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 3, p.1-12, 2014.

GEIM AK, NOVOSELOV KS. The rise of graphene. **Nat Mater**, v. 6, p. 183–91, 2007.

GIANNOUDIS, P. V. et al. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36, n. 3,p.S20-27, 2005.

GIBBS, D. M. et al. Hope versus hype: what can additive manufacturing realistically offer trauma and orthopedic surgery? **Regen Med**, v. 9, n. 4, p. 535–49, 2014.

GIMBLE, J.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v. 5, p. 362–369, 2003.

GIROLAMO, L. D. et al. Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 31, n. 6, p. 467-479 2008.

GLOTZBACH, J. P. et al. Regenerative medicine. **Current problems in surgery**, v. 48, n. 3, p. 148-212, 2011.

GOENKA, S. et al. Graphene-Based Nanomaterials For Drug Delivery and Tissue Engineering. **Journal Controlled Release**, v. 173, p. 75–88., 2014.

GOTHARD, D. et al. Tissue engineered bone using select growth factors: a comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. **European Cells and Materials**, v. 28, p. 166-208, 2014.

GRUBER, H. E. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 4, p. 303-11, 2012.

GUAN, M. et al. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass. **Nature medicine**, v. 18, n. 3, p. 456-62, 2012.

HABIBOVIC, P. et al. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical- sized orthotopic defect. **J Orthop Res**, v. 24, p. 867–876, 2006.

HADJI, P. et al. The epidemiology of osteoporosis-Bone Evaluation Study: an analysis of routine health insurance data. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 110, n. 4, p. 52–7, 2013.

HAN, Q. Q.; DU, Y.; YANG, P. S. The role of small molecules in bone regeneration. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 14, p. 1671-84, 2013.

HAO, I.; HARRIS, R. **Customised Implants for Bone Replacement and Growth**. In BÁRTOLO, P.; BIRANDA, B. Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine. New York: Springer; 2008. p. 79–107.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, p.12, 2011.

HASTY, K. A.; CHO, H. Stem Cell Considerations for the Clinician. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 855-70, 2016.

HERMANN, A. et al. Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies. **Cytotherapy**, v. 12, p. 17-30, 2010.

HESLOP, J. A. et al. Concise review: workshop review: understanding and assessing the risks of stem cell-based therapies. **Stem cells translational medicine**, v. 4, n. 4, p. 389-400, 2015.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature materials**, v. 4, n. 7, p. 518-524, 2005.

HUANG, S. T. et al. Phyllanthus urinaria's Inhibition of Human Osteosarcoma Xenografts Growth in Mice is Associated with Modulation of Mitochondrial Fission/Fusion Machinery. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 44, n. 7, p. 1507-1523, 2016.

HUANG, R. L. et al. Bone Graft Prefabrication Following the In Vivo Bioreactor Principle. **EBioMedicine**, 2016 (no prelo).

HURI, P. Y. et al. Scaffold pore size modulates in vitro osteogenesis of human adipose-derived stem/stromal cells. **Biomedical Materials**, v. 9, n. 4, p.045003, 2014.

IKEBE, C.; SUZUKI, K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

ISSA, J. P. M. et al. Biological evaluation of the bone healing process after application of two potentially osteogenic proteins: an animal experimental model. **Gerodontology**, v. 29, n. 4, p. 258-264. 2012.

ISSA, J. P. M. et al. Evaluation of rhBMP-2 and natural latex as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. **Anat Rec (Hoboken)** v. 293, p. 794-801, 2010.

IYOMASA, M. M. et al. Influence of low-level laser associated with osteogenic proteins recombinant human BMP-2 and Hevea brasiliensis on bone repair in Wistar rats. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 2, p. 117-25, 2012.

IZQUIERDO, H. C. et al. Preculture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. **J Biomed Mater Res A**, v. 82, p. 129-138, 2007.

JAMES, R. et al. Nanocomposites and bone regeneration. **Frontiers of Materials Science**, v. 5, n. 4, p. 342-57, 2011.

JANG, K. M. et al. Xenotransplantation of human mesenchymal stem cells for repair of osteochondral defects in rabbits using osteochondral biphasic composite constructs. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 22, n. 6, p. 1434-44, 2014.

JANG, Y. et al. Characterization of adipose tissue-derived stromal vascular fraction for clinical application to cartilage regeneration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. ;51, n. 2, p. 142-50, 2015.

JIANG, Y. et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 8, p. 896 -904, 2002.

KAIGLER, D. et al. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. **FASEB Journal**, v. 19, n. 6, p. 665-667, 2005.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-91, 2005.

KARNES, J. M. et al. Multiple roles of tumor necrosis factor-alpha in fracture healing. **Bone**, v. 78, p. 87-93, 2015.

KASSEM, M. et al. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 95, p. 209–214, 2004.

KAYAL, R. A. et al. TNF-alpha mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 7, p. 1604–15, 2010.

KERKIS, I.; CAPLAN, A. I. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 18, n. 2, p. 129–38, 2012.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294 –1301, 2006.

KHAN, Y. et al. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 90, n. 1, p. 36–42, 2008.

KIM, K. I. et al. Osteogenic differentiation and angiogenesis with cocultured adipose-derived stromal cells and bone marrow stromal cells. **Biomaterial**, v. 35, n. 17, p. 4792–804, 2014.

KIM, T. H. et al. In vitro evaluation of osteogenesis and myogenesis from adipose-derived stem cells in a pore size gradient scaffold. **Macromolecular Research**, v. 21, n. 8, p. 878–85, 2013.

KIM, J. Y. et al. Evaluation of solid free-form fabrication-based scaffolds seeded with osteoblasts and human umbilical vein endothelial cells for use in vivo osteogenesis. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 7, p. 2229–2236, 2010.

KONNOPKA, A. et al. The health and economic consequences of osteopenia- and osteoporosis-attributable hip fractures in Germany: estimation for 2002 and projection until 2050. **Osteoporosis International**, v. 20, n. 7, p. 1117–1129, 2009.

KUILLA, T. et al.. Recent advances in graphene based polymer composites. **Progress in polymer science**, v. 35, n. 11, p. 1350–75, 2010.

KUMAR, S. et al. 3D scaffold alters cellular response to graphene in a polymer composite for orthopedic applications. **J Biomed Mater Res Part B**, v. 104B, p. 732–749, 2016.

KUMAR, S.; CHATTERJEE, K. Comprehensive Review on the Use of Graphene Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 40, p. 26431–57, 2016.

- KWEON, H. et al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 5, p. 801–808, 2003.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.
- LAURENCIN, C.; KHAN, Y.; EL-AMIN, S. F. Bone graft substitutes. **Expert review of medical devices**, v. 3, p. 49-67, 2014.
- LE BLANC, K. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **The Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439-41, 2004.
- LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 5, p. 321-34, 2012.
- LEE, W. C. et al. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. **ACS nano**, v. 5, n. 9, p. 7334-41, 2011.
- LEE Y. K. et al. Anti-proliferation effect of Hevea brasiliensis latex B-serum on human breast epithelial cells. **Pak. J. Pharm. Sci**, v. 25, n. 3, p. 645-50, 2012.
- LEE, J. H. et al. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 370, n. 3, p. 456-460, 2008.
- LEVENBERG, S. et al. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 22, p. 12741-12746, 2003.
- LEVI, B. et al. Differences in Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells from Murine, Canine, and Human Sources In Vitro and In Vivo. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 128, n. 2, p. 373-386, 2011.
- LICHTE, P. et al. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 569-73, 2011.
- LI N. et al. The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. **Biomaterials**, v. 32, n. 35, p. 9374-82, 2011.
- LÖNNROTH, E. C. Toxicity of medical glove materials: a pilot study. **Int J Occup Saf Ergon**, v. 11, n. 2, p. 131-139, 2005.

LU, Z. et al. Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha enables human osteoblasts to direct adipose tissue-derived mesenchymal stemcells into osteogenic differentiation. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 13, p. 2420–9, 2012.

LUI, P. et al. Biology and augmentation of tendon-bone insertion repair. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, n. 59, p. 1-14, 2010.

LV, L. et al. Healing of periodontal defects and calcitonin gene related peptide expression following inferior alveolar nerve transection in rats. **Journal of molecular histology**, v. 45, n. 3, p. 311-20, 2014.

MALDA, J. et al. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 1, p. 63-72, 2005.

MALIZOS, K. N.; PAPATHEODOROU, L.K. The healing potential of the periosteum: molecular aspects. **Injury**, v. 36, n. 3, p. S13-9, 2005.

MANKANI, M. H. et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 9, p. 2140-9, 2006.

MARTIN, D.; SEMPLE, J.; SEFTON, M. Poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) beads promote vascularization and wound repair in diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 93, n. 2, p. 484-92, 2010.

MASELLA, R. S.; MEISTER, M. Current concepts in tissue engineering: cell, matrices, and genes. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 129, n. 4, p. 458-468, 2006.

MEINEL, L. et al. Silk-based biomaterials to heal critical-sized femur defects. **Bone**, v. 39, p. 922 – 931, 2006.

da SILVA-MEIRELLES, L. S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 5-6, October–December, p. 419–427, 2009.

MENDONÇA, R. J. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do latex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*** [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; 2004.

MENDONÇA, R. J. et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 764-8, 2010.

MENDONÇA, R.J. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis***. 2008. 147 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MIRON, R. J.; ZHANG, Y. F. Osteoinduction a review of old concepts with new standards. **Journal of dental research**, v. 91, n. 8, p. 736-744, 2012.

MOHAMMADI, E. et al. Immunomodulatory effects of bee venom in human synovial fibroblast cell line. **Iran J Pharm Res**, v. 14, n. 1, p. 313-320, 2015.

MOUNTZIARIS, P. M. et al. Dose effect of tumor necrosis factor- α on in vitro osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on biodegradable polymeric microfiber scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1666-75, 2010.

MRUÉ, F. et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.

MUELLER, S. M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 583-590, 2001.

MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science**, v. 113, pt 7, p. 1161-1166, 2000.

NAIR, M. B. et al. Infection and tissue engineering in segmental bone defects—a mini review. **Curr Opin Biotechnol**, v. 22, p. 721, 2011.

NAYAK, T. R. et al. Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **ACS Nano**, v. 5, p. 4670-4678, 2011.

NGUYEN, T. H.; LEE, B. T. In vitro and in vivo studies of rhBMP2-coated PS/PCL fibrous scaffolds for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 3, p. 797-808, 2013

OLIVEIRA, J. S. et al. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1563-73, 2007.

OLIVEIRA, J. A. A. et al. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, p. 649-655, 2003.

OLSZTA, M. J. et al. Bone structure and formation: a new perspective. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 58, n. 3, p. 77-116, 2007.

ORYAN, A. et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 9, n. 1, p. 1, 2014.

PARK, S. H. et al. Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 11, p. 2671-8, 2012.

PARK, S. Y. et al. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. **Advanced Materials**, v. 23, n. 36, 2011.

PARTEE, B. et al. Selective laser sintering process optimization for layered manufacturing of CAPA_6501 polycaprolactone bone tissue engineering scaffolds. **J Manuf Sci Eng**, v. 128, p. 531, 2005.

PATEL, J. J. et al. Bone Morphogenetic Protein-2 Adsorption onto Poly- ϵ -caprolactone Better Preserves Bioactivity In Vitro and Produces More Bone In Vivo than Conjugation Under Clinically Relevant Loading Scenarios. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 21, n. 5, p. 489-98, 2015a.

PATEL, J. J. et al. Dual Delivery of EPO and BMP2 from a Novel Modular Poly- ϵ -Caprolactone Construct to Increase the Bone Formation in Prefabricated Bone Flaps. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 21, n. 9, p. 889-97, 2015b.

PEISTER, A. et al. Amniotic fluid stem cells produce robust mineral deposits on biodegradable scaffolds. **Tissue Eng Part A**, v. 15, p. 3129 - 38, 2009.

PELTOLA, S.M. et al. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. **Annals of medicine**, v. 40, n. 4, p. 268-280, 2008.

PEREIRA, P. A. et al. Prostaglandin D₂-loaded microspheres effectively activate macrophage effector functions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 78, p. 132-9, 2015.

PEREZ, M. A. A.; GUARINO, V.; CIRILLO, V.; AMBROSIO, L. In vitro mineralization and bone osteogenesis in poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 100, n. 11, pt A, p. 3008-3019, 2012.

PHIPPS, M. et al. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration. **Biomaterials**, v.33, p. 524-34, 2012.

POH, P. S. et al. In vitro and in vivo bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds. **Acta biomaterialia**, v. 30, p. 319-33, 2016.

POH, P. S. et al. Fabrication and in vitro characterization of bioactive glass composite scaffolds for bone regeneration. **Biofabrication**, v. 5, n. 4, p. 045005, 2013.

PUISSANT, B. et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 1, p. 118-29, 2005.

QIAO, J. et al. Photodynamic effects on human periodontal-related cells in vitro. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 11, n. 3, p. 290-9, 2014.

RAI, B. et al. Differences between in vitro viability and differentiation and in vivo bone-forming efficacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL/TCP scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, p. 7960-7970, 2010.

RIDER, D. A. et al. Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Increases the Multipotentiality of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 6, p. 1598-1608, 2008.

RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J. et al. Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 23, n. 6, p. 571-5, 2012.

ROH, J.D. et al. Tissueengineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 4669-4674, 2010.

ROH, C.; LYLE, S. Cutaneous Stem Cells and Wound Healing. **Pediatric Research**, v. 59, p. 100-103, 2006.

ROSS, M. H. et al. **Histologia: Texto e Atlas: em Correlação Com Biologia Celular e Molecular**. Guanabara Koogan, 6. ed, Rio de Janeiro, 2012, 1008p.

ROUWKEMA, J. et al. Vascularization in tissue engineering. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 434-441, 2008.

SAHAI, S. et al. Osteogenic Differentiation of Adipose-derived Stem Cells is HIF-1 Independent. **Tissue Engineering: A**, v. 19, n. 13-14, p. 1583-91, 2013.

SAMPAIO, R. B. et al. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. **Current eye research**, v. 35, n. 1, p. 56-62, 2010.

SANTO, V. E. et al. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering—part I: recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n.4, p. 308-326, 2013.

SANTOS, T. D. et al. Effect of collagen sponge and fibrin glue on bone repair. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 6, p. 623-8, 2015.

SARTORI, M. et al. A new bi-layered scaffold for osteochondral tissue regeneration: In vitro and in vivo preclinical investigations. **Materials Science and Engineering: C**, v.70, p. 101-11, 2017.

SASMAZEL, H. T. Novel hybrid scaffolds for the cultivation of osteoblast cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 838– 846, 2011.

SAWYER, A. A. et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. **Biomaterials**, v. 30, p. 2479–2488, 2009.

SCHADICH, E. et al. Neutralization of bacterial endotoxins by frog antimicrobial peptides. **Microbiology and immunology**, v. 57, n. 2, p. 159-61, 2013.

SCHANTZ, J.T. et al. Cranioplasty after trephination using a novel biodegradable burr hole cover: technical case report. **Neurosurgery**, v. 58, p. E176, 2006.

SCHINDELER, A. et al. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars in cell & developmental biology (Academic Press)**, v. 19, n 5, p. 459-466, 2008.

SEEHERRMAN, H.; WOZNEY, J. M. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 3, p. 329–345, 2005.

SEONG, J.M. et al. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 5, n. 6, p. 062001, 2010.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European cells & materials**, v. 15, p. 53-76, 2008.

SHEN, X. et al. Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. **Journal of orthopaedic research**, v. 27, n. 10, p. 1298-305, 2009.

SHIM, J. H. et al. Three-dimensional printing of rhBMP-2-loaded scaffolds with long-term delivery for enhanced bone regeneration in a rabbit diaphyseal defect. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 13-14, p. 1980-92, 2014.

SHIM, J.; HUH, J.; PARK, J. et al. Fabrication of Blended Polycaprolactone/Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid)/b-Tricalcium Phosphate Thin Membrane Using Solid Freeform Fabrication Technology for Guided Bone Regeneration. **Tissue Engineering**, v. 19, n. 3-4, p.317-328, pt. A, 2013.

SMITH, M. H. et al. Computed tomographybased tissue-engineered scaffolds in craniomaxillofacial surgery. **Int J Med Robot**, v. 3, p. 207-216, 2007.

STAGG, J.; GALIPEAU, J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. **Curr Mol Med**, v. 13, p. 856-67, 2013.

STEGEN, S. et al. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. **Bone**, v. 70, p. 19 – 27, 2015.

STENDERUP, K. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, n. 6, p. 919-926, 2003.

STOJADINOVIC, A. et al. Topical advances in wound care. **Gynecologic Oncology**, v. 111, n. 2, p. S70–S80, 2008.

STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 9656–61, 2002.

TARE, R. S. et al. Isolation, differentiation, and characterisation of skeletal stem cells from human bone marrow in vitro and in vivo. **Bone Research Protocols**, v. 816, p. 83-99, 2012.

TERHEYDEN, H. et al. Osseointegration - communication of cells. **Clinical Oral Implants Research**, v.23, n. 10, p. 1127-1135, 2012.

TETI, A. Bone development: overview of bone cells and signaling. **Current osteoporosis reports**, v. 9, n. 4, p. 264-73, 2011.

VIOLANTE, R. S. **Regeneração óssea guiada pela biomembrana de látex natural e sua propriedade angiogênica**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p. 1402–1416, 2005.

WANG W, CAETANO GF, CHIANG WH, BLAKER JJ, FRADE MA, BARTOLO PJ. Morphological, mechanical and biological assessment of PCL/pristine graphene scaffolds for bone regeneration. **International Journal of Bioprinting**, v. 2, n. 2, p. 95-104, 2016a.

WANG W, CAETANO GF, AMBLER WS.; BLAKER JJ, FRADE MA, MANDAL P.; DIVER C.; BARTOLO PJ. Enhancing the hydrophilicity and cell attachment of 3d printed pcl/graphene scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**, 2016b (no prelo).

WILLIAMS DF. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, v. 35, n. 38, p. 10009–14, 2014.

WILLIAMS, J. M. et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4817-27, 2005.

WONG, D.Y. et al. Poly (ϵ -Caprolactone) and Poly (L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Degradable Polymer Sponges Attenuate Astrocyte Response and Lesion Growth in Acute Traumatic Brain Injury. **Tissue engineering**, v. 13, n. 10, p. 2515-23, 2007.

WOODRUFF, A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 2010.

WORSLEY, K. A, et al. Soluble graphene derived from graphite fluoride. **Chem Phys Lett**, v. 445, p. 51–6, 2007.

YIP, E.; CACIOLI, P. The manufacture of gloves from natural rubber latex. **J. Allergy Immunol**, v. 110, n. 2, p. S1-S14, 2002.

YONG, M. R. et al. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold plus recombinant human morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in an ovine thoracic interbody fusion model. **European Spine Journal**, v. 23, n. 3, p. 650-7, 2014.

YOON, E.; DHAR, S.; CHUN, D. E. et al. In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 3, p. 619-627, 2007.

YU, X. et al. Overexpression of PLAP-1 in bone marrow stromal cells inhibits the rat critical-size skull defect repair. **Journal of molecular histology**, v. 46, n. 3, p. 251-61, 2015.

YU, D. A. et al. Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **International journal of stem cells**, v. 5, n. 1, p. 16, 2012.

YUN, Y. R. et al. Administration of growth factors for bone regeneration. **Regenerative medicine**, v. 7, n.3, p. 369-85, 2012.

ZHANG, H. X.; DU, G. H.; ZHANG, J. T. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 3, p. 385–389, 2004.

ZHAO, B. et al. Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 23246–23253, 2006.

ZHAO, Y.P. et al. The promotion of bone healing by progranulin, a downstream molecule of BMP-2, through interacting with TNF/TNFR signaling. **Biomaterials**, v. 34, n. 27, p. 6412-6421, 2013.

ZHOU, Y. et al. Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts **Biomaterials**, v. 28, p. 814–24, 2007.

ZONG, C. et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. **Eur Cell Mater**, v. 20, n. 9, p.109-120, 2010.

ZUK, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279–4295, 2002.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 211-228, 2001.

ZUTTON, M. S. et al. Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v.21, n. 3, p. 281-7, 2013.

Anexos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CÓPIA

Ribeirão Preto, 24 de julho de 2014

Ofício nº 2517/2014
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 2722/2014

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS SOBRE SCAFFOLD DE POLICAPROLACTINA E ÁCIDO POLILÁCTICO (PCL/PLA)” – Versão 3 de 02/07/2014**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 390ª Reunião Ordinária realizada em 21/07/2014, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 3 de 02/07/2014.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

GUILHERME FERREIRA CAETANO

PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE (Orientador)

Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 30 de junho de 2014

Ofício nº 2226/2014
CEP/MGV

Processo HCRP nº 5359/2014

Prezado Senhor,

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou "AD REFERENDUM" a proposta para criação do biorrepositório denominado "**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**" e enquadrou na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos.

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor

PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE

Depto. de Clínica Médica

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 024/2015-1, sobre o projeto intitulado “*Osteodiferenciação das células-tronco mesenquimais humanas associadas às proteínas do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis sobre scaffold de policaprolactona (PCL) para xenoenxertia óssea*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 02 de dezembro de 2015.

We certify that the protocol nº 024/2015-1, entitled “*Osteo-differentiation of human mesenchymal stem cells attached to natural latex proteins from the rubber tree Hevea brasiliensis on polycaprolactone (PCL) scaffold to bone xenografting*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 12/02/2015.

Ribeirão Preto, 02 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Artigos publicados

Cellularized versus decellularized scaffolds for bone regeneration

Guilherme Caetano^a, Ricardo Violante^a, Ana Beatriz Sant'Ana^b,
Adriana Batista Murashima^c, Marco Domingos^d, Andrew Gibson^d, Paulo Bártolo^{d,*},
Marco Andrey Frade^a

^a Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Head and Neck Surgery, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d School of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester, Manchester, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2016

Received in revised form

3 May 2016

Accepted 28 May 2016

Available online 30 May 2016

Keywords:

Adipose-derived mesenchymal stem cells

Biomaterials

Bone regeneration

Polymers

Scaffold

ABSTRACT

An optimal scaffold based strategy for *in vivo* repair of large bone defects and its associated problems is presented in this work. Three polymeric scaffolds produced by using an extrusion-based additive manufacturing system were examined in a rat critical bone defect model: scaffolds without cells, with undifferentiated Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and differentiated ADSCs (osteoblasts). Scaffolds with undifferentiated cells seem to be the best strategy as they exhibited around 22% more bone formation than natural bone healing, and around 15% more than the two other cases. Authors observed that scaffolds enabled cell migration and tissue formation. Results suggest that undifferentiated ADSCs strongly contribute to new bone formation with no rejection if scaffolds are used to support cell migration, proliferation and differentiation. Our long-term goal is to engineer high-quality cell seeded-scaffolds (autograft and allograft) for bone regeneration, mainly in elderly patients.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Bone is able to heal and remodel without leaving any scar in cases of very limited damage or fracture. However, in pathological fractures, traumatic bone loss or primary tumour resection, when the defect exceeds a critical size, the bone is no longer able to heal itself [1,2]. In these cases, the clinical approach is the use of bone grafts, defined as an implanted material that promotes healing on its own or in combination with other materials, through osteogenesis, osteoinduction and osteoconduction [3]. Bone grafts can be divided into autografts, allografts and xenografts [1–6]. Autografts, harvested from one site and implanted into another site within the same individual, are osteogenic, osteoinductive and osteoconductive, and do not present risk of disease transmission or immune system rejection [2]. It is considered to be the most effective approach for bone regeneration, however it presents some major drawbacks such as site morbidity and pain, prolonged hospitalization, increased risk of deep infection and haematoma [2]. Allografts are harvested from one individual and implanted into another one of the same species. Its limitations are associated with rejection, transmission of diseases and infection. Additionally,

the healing rate is generally lower than autografts [2]. Xenografts are harvested from one individual and transplanted into another one of a different species. They produce poor clinical outcomes and present high risk of disease transmission [3]. However, mesenchymal stem cells xenografts using different biomaterials could be an alternative method for defect repair, especially for aged patients [7,8]. Thus, biofabrication, defined as the combined use of additive manufacturing techniques, biocompatible and biodegradable materials, cells, growth factors, etc. for the fabrication of scaffolds, is becoming a promising alternative for grafting [9]. Several studies reported the use of polymeric (poly(caprolactone), poly(lactic-co-glycolic acid), etc.), ceramic (hydroxyapatite, bio-glass, etc.) and polymer-ceramic scaffolds with different porosities and architectures [10–12]. However, none of these research works were able to identify the best route for bone regeneration. Chuang and co-workers investigated the *in vivo* osteogenic potential of Human Mesenchymal Stem Cells/Poly Lactide Co-Glycolic Acid (PLGA) constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. Scaffolds were produced by dissolving PLGA in a medium containing chloroform and sodium chloride. After the vaporization of chloroform, the scaffolds were immersed in double-distilled water to dissolve the sodium chloride [13]. A similar study was performed by Yoon and co-workers [14]. In these cases, the techniques used to produce the scaffolds do not allow to control pore shape, pore size and pore interconnectivity

* Corresponding author.

E-mail address: paulojorge.dasilvabartolo@manchester.ac.uk (P. Bártolo).

Table 1.

Processing conditions used to produce the PCL scaffolds.

Processing temperature	Air pressure	Screw rotational velocity	Deposition velocity	Nozzle tip size
90 °C	6 bar	22 rpm	20 mm/s	300 µm

of the scaffolds, critical parameters to design optimised constructs. To circumvent these limitations, Rai and co-workers [15] investigated the use of a filament-based extrusion additive manufacturing system to produce polycaprolactone (PCL)/tricalcium phosphate scaffolds seeded with Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs). However, none of these research studies were able to identify the best strategy for bone regeneration.

In previous studies, we extensively investigated the design and fabrication of PCL scaffolds for tissue engineering [16–18]. The effect of processing conditions (temperature, deposition velocity, screw-rotational velocity and slice thickness) on the morphological and mechanical properties of extruded scaffolds was investigated and optimal processing conditions determined [16]. Experimental results reveal that deposition velocity and screw-rotational velocity have the highest influence in terms of porosity and mechanical properties. The *in vitro* biological behavior was also assessed using scaffolds with different architectures (0°/90°, 0°/60°/120° and 0°/45°/90°/135°) seeded with hMSCs [17,18]. After 21 days of static culture viability/proliferation appeared to be strongly influenced by the pore size and pore shape. Results also showed that large quadrangular pores enhance hMSC viability and proliferation and cell morphology was not affected by pore topology. This research work investigates the use of polymeric scaffolds with controlled architecture and three biofabrication routes for bone regeneration: scaffolds without cells, scaffolds seeded with differentiated cells and scaffolds seeded with undifferentiated cells.

2. Materials and methods

2.1. Scaffold fabrication

PCL (Mw 50,000 Da, CAPA 6500, Perstorp Caprolactones, Cheshire, UK) scaffolds were produced through a screw-assisted additive biomanufacturing system named 3D Discovery (RegenHU, Switzerland). 3D cylindrical scaffolds were designed with dimensions of 30 mm (diameter) × 5 mm (height), a constant filament distance of 650 µm and a lay-down pattern of 0°/90°. The

operating conditions are indicated in Table 1. After the fabrication, produced scaffolds were cut using trephine drill according to the dimensions of the created bone defect (5 mm (diameter) × 2 mm (height)), and they were surface treated in 5 M NaOH for 3 h to enhance their hydrophilicity. After rinsing with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), the scaffolds were sterilized in 70% ethanol for 24 h and 12h under UV light. The scaffolds were then rinsed again with PBS, air-dried and soaked for at least 3 h in basal media prior to cell seeding.

2.2. Cell source and culture

ADSCs were isolated from liposuction of patients from Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School (Brazil), after obtaining informed consent from all patients and approval from the hospital ethical committee (number 2722/2014). The cell isolation method is based on extracellular matrix (ECM) digestion in 0.075% collagenase (SIGMA) during 30 min, at 37 °C, according to a method previously reported [19]. ADSCs were cultured and expanded at 37 °C, under 5% of CO₂, using basic culture medium (α-MEM, 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic-antimycotic, 1% L-Glutamine 200 mM; Invitrogen, Brazil). The medium was changed twice a week. After reaching 80–90% confluence, cells were detached by the use of 0.25% trypsin-EDTA solution (from Invitrogen) and resuspended in 10 mL of culture medium. Only passages 3 up to 5 were considered in this present work.

2.3. Cell seeding

scaffolds were seeded with 5×10^4 cells in 50 µL of α-MEM medium. The cell-seeded scaffolds were incubated at standard conditions during 2 h allowing cells to diffuse and adhere to the scaffold, before the addition of 1 mL of fresh basic or osteo-differentiating culture medium, as previously reported [20]. All cell-seeded scaffolds were maintained in a humidified incubator, at 37 °C and 5% CO₂, with medium changes every 3 days for 21 days prior implantation.

2.4. Calvarial defects

Defects were induced in male Wistar rats (weight of 250–300 g), according to the ethical guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation, approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation from Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (number 024/2015-1). The animals were anesthetized by intraperitoneal administration of a mixture of ketamine hydrochloride (80 mg/Kg) and xylazine hydrochloride

Fig. 1. PCL scaffold. a) Scaffold after printing and b) scaffold implanted in the calvarial defect after 8 post-operative weeks.

Fig. 2. Photomicrography of the defect area for all groups after 8 weeks, stained with hematoxylin and eosin. a) 50 × magnification showing the entire bone defect; b) 200 × magnification showing closer captions of the new tissue. In these images, it is possible to observe the original bone (OB), new bone (NB) and connective tissue (CT).

Fig. 3. Percentage of new bone formation (BF) and connective tissue (CT) quantified by ImageJ software at 50 $\times$ magnification (hematoxylin and eosin staining). *Statistical evidence ($p < 0.05$) was analyzed by one-way-ANOVA show difference to all other groups regarding to BF; #Statistical evidence ($p < 0.05$) regarding to CT from SCA, SUC and SDC groups compared to NBR group.

(15 mg/Kg). The hair over the calvarium was shaved and, after asepsis with 70% ethanol, a circular bone defect (5 mm in diameter) was created on the right side of the calvarial bone using trephine drill at 1200 rpm with constant PBS irrigation. According to previous studies, 5 mm calvarial defect is considered a critical-sized, non-healing defect along the length of the study [21,22].

Sixteen animals were divided into four testing groups as follows: NBR group or control – New Bone Regeneration without scaffold; SCA group – Scaffold without cells; SUC group – Scaffolds with human ADSCs; SDC group – Scaffolds with human ADSCs differentiated to osteoblast *in vitro*. After the scaffold implantation, wounds were sutured with nylon 5–0 sutures (Johnson&Johnson, Brazil). During the immediate postoperative period, one dose of a systemic antibiotic (1 mg/kg; Pentabiotic, FortDodge®) was administered. Postoperative pain was also controlled by oral administration of Dipyrone (1 drop/kg; Biovet, Brazil), three times a day for 2 days. The animals were euthanized after 8 weeks with excessive anesthetic dose, and all calvarial bones were collected for further analysis.

2.5. Histology

The calvarial bones biopsies were fixed in 3.7% buffered formaldehyde solution (pH 7.4) for 48 h, and demineralized with 10% ethylenediaminetetraacetic acid for 30 days [23]. After this period, biopsies were dehydrated and embedded in paraffin, and cross-sections of 5.0 μ m thick were cut with a micrometer, mounted on glass slides, dewaxed, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin. Biopsies were analyzed using a LEICA DM 4000BVR microscope equipped with a LEICA camera (Leica Microsystems, Germany) and images were captured at 50 $\times$ and 200 $\times$ magnification. Color Deconvolution ImageJ software was used to evaluate the percentage of new bone and connective tissue formation on 50 $\times$ magnification images. The morphometric analysis, corresponding to red color, was measured as the percentage of the total number of pixels in each original image, as described elsewhere [24].

3. Results and discussion

The scaffold implanted in the calvarial defect is indicated in Fig. 1.

Fig. 2 shows histological images at 50 $\times$ and 200 $\times$ magnifications considering new bone and connective tissue formation after 8 post-operative weeks for all four groups. No inflammatory

effects were observed in all groups neither before the sacrifice of the animals nor in histological images. In the control group (NBR group) case, where scaffolds were not used to fill the bone defect, the central part of the defect healed through the formation of a thin connective tissue layer. In this case, only a small portion of new bone is observed, mostly close to the edges of the defect. In the other three cases, where PCL scaffolds were used to fill the bone defect, it is possible to observe the presence of new bone and more connective tissue between the defect edges. For the SCA group, it is clear the presence of areas of new bone at the defect edges and also “islands” of bone spread along the defect embedded in a connective tissue, which seems to be inside the scaffold pores. Similarly, it is also possible to observe identical “islands” of new bone embedded in connective tissue in the SDC testing group. In the case of the SUC group, most of the new tissue corresponds to areas of new bone close to the edge, and also towards and along the center of the defect.

Fig. 3 shows the percentage of new bone and connective tissue formation in all considered cases. As expected, all three groups that received scaffold in the bone defect had higher tissue connective formation ($p < 0.05$) compared to NBR group as the PCL scaffold enables cell influx and tissue formation. The bone formation observed in SUC group is significantly higher compared to NBR, SCA and SDC groups (22%; 14% and 15% higher, respectively) and higher than its tissue connective formation ($p < 0.05$). Based on these findings, it seems that human ADSCs participate in the new bone formation process, probably due their regenerative and immunosuppressive properties. Results strongly suggest that PCL scaffolds seeded with ADSCs present high osteoinduction properties. It is also possible that growth factors released by human ADSCs stimulate animal cells to produce new bone. This effect was not observed in the SDC group, where ADSCs were previously *in vitro* differentiated to osteoblasts. However, contrary to other studies using bone marrow stem cells, where transplanted cell-scaffold implants were rejected one week after implantation [13], the obtained results seem to confirm that ADSCs xenotransplanted are able to evade the immune surveillance and contribute to healing. This can also be related to the fact that ADSCs express less human leukocyte antigen (HLA-ABC) than bone marrow stem cells, indicating they may have more potential in transplantation [25].

4. Conclusion

The design of an ideal scaffold-based strategy for *in vivo* bone regeneration is critical to repair large bone defects and treat bone problems in aged patients, who may already have compromised cellular function. This work investigated the regenerative performance of PCL scaffolds seeded with ADSCs, showing a better performance compared to PCL scaffolds without cells or seeded with differentiated cells. Results suggest that undifferentiated cells, even in a xenotransplantation case, strongly contribute to new bone formation. It was also possible to observe that xenotransplanted cells are able to evade the immune surveillance, not only immediately after implantation but also for a longer period. ADSCs in a xenograft model were also considered in attempting to extrapolate the construct behavior for future autograft and allograft treatments.

Acknowledgments

This work was partially performed within the framework of the SKELGEN project – Establishment of a cross continent consortium for enhancing regenerative medicine in skeletal tissues (Marie

Curie Action, International Research Staff Exchange Scheme (IRSES) – Project reference: 318553). Authors are also grateful for the financial support received from FAPESP (Process 2013/09055-2 and 2013/20554-0), CAPES and CNPq and all support given by Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School.

References

- [1] J. Lee, M.M. Farag, E.K. Park, J. Lim, H.S. Jun, A simultaneous process of 3D magnesium phosphate scaffold fabrication and bioactive substance loading for hard tissue regeneration, *Mater. Sci. Eng. C* 36 (2014) 252–260.
- [2] P. Lichte, H.C. Pape, T. Pufe, P. Kobbe, H. Fischer, Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence, *Injury* 42 (2011) 569–573.
- [3] A. Oryan, S. Alidati, A. Moshiri, N. Maffulli, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions, *J. Orthop. Surg. Res.* 9 (2014) 18–45.
- [4] K. Arvidson, B.M. Abdallah, L.A. Applegate, N. Baldini, E. Cenni, E. Gomez-Barrena, D. Granchi, M. Kassem, Y.T. Kottinen, K. Mustafa, D.P. Pioletti, T. Sillat, A. Finne-Wistrand, Bone regeneration and stem cells, *J. Cell. Mol. Med.* 15 (2011) 718–746.
- [5] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, P.V. Giannoudis, Bone regeneration: current concepts and future directions, *BMC Med.* 9 (2011) 66–76.
- [6] W.S. Khan, D. Marsh, Tissue engineering approaches for bone repair: cells, scaffolds, growth factors and gene therapy, *Stem Cell Res. J.* 2 (2010) 21–32.
- [7] C. Zong, D. Xue, W. Yuan, W. Wang, D. Shen, X. Tong, D. Shi, L. Liu, Q. Zheng, C. Gao, J. Wang, Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds, *Cells Mater.* (2010) 10 9–12 0.
- [8] K.M. Jang, J.H. Lee, C.M. Park, H.R. Song, J.H. Wang, Xenotransplantation of human mesenchymal stem cells for repair of osteochondral defects in rabbits using osteochondral biphasic composite constructs, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 22 (2014) 1434–1444.
- [9] P.J. Bartolo, J.P. Kruth, J. Silva, G. Levy, A. Malshe, K. Rajurkar, M. Mitsuishi, M. Leu, Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes, *CIRP Ann. – Manuf. Technol.* 61 (2012) 635–655.
- [10] T. Fielder, A.C. Videira, P.J. Bartolo, G.E. Strauch, J.M.F. Ferreira, On the mechanical properties of PLC-bioactive glass scaffolds fabricated via BioExtrusion, *Mater. Sci. Eng. C* 57 (2015) 288–293.
- [11] I. Sousa, A. Mendes, R. Pereira, P.J. Bartolo, Collagen surface modified poly(ϵ -caprolactone)scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties, *Mater. Lett.* 134 (2014) 263–267.
- [12] P.S.P. Poh, D.W. Hutmacher, M.M. Stevens, M.A. Woodruff, Fabrication and in vitro characterization of bioactive glass composite scaffolds for bone regeneration, *Biofabrication* 5 (2013) 045005.
- [13] C.K. Chuang, K.J. Lin, C.Y. Lin, Y.H. Chang, T.C. Yen, S.M. Hwang, L.Y. Sung, H. C. Chen, Y.C. Hu, Xenotransplantation of human mesenchymal stem cells into immunocompetent rats for calvarial bone repair, *Tissue Eng. Part A* 16 (2010) 479–488.
- [14] E. Yoon, S. Dhar, D.E. Chun, N.A. Gharibjanian, G.R.D. Evans, In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model, *Tissue Eng.* 13 (2007) 619–627.
- [15] B. Rai, J.L. Lin, Z.X.H. Lim, R.E. Gulberg, D.W. Hutmacher, S.M. Cool, Differences between in vitro viability and differentiation and in vivo bone-forming efficacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL/TCP scaffolds, *Biomaterials* 31 (2010) 7960–7970.
- [16] M. Domingos, F. Chiellini, A. Gloria, L. Ambrosio, P. Bartolo, E. Chiellini, Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D bioextruded poly(ϵ -caprolactone) scaffolds, *Rapid Prototyp. J.* 18 (2012) 56–67.
- [17] M. Domingos, F. Intranuovo, T. Russo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, J. Ciurana, P. Bartolo, The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly(ϵ -caprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behavior and in vitro hMSC viability, *Biofabrication* 5 (2013) 045004.
- [18] P. Bartolo, M. Domingos, A. Gloria, J. Ciurana, BioCell printing: integrated automated assembly system for tissue engineering constructs, *CIRP Ann. – Manuf. Technol.* 60 (2011) 271–274.
- [19] P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, P. Lorenz, M.H. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.* 7 (2001) 211–228.
- [20] G.F. Caetano, P.J. Bartolo, M. Domingos, C.C. Oliveira, M.N. Leite, M.A. Frade, Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold, *Procedia Eng.* 110 (2015) 59–66.
- [21] F.A. Furlaneto, M.J. Nagata, S.E. Fucini, T.M. Deliberador, T. Okamoto, M. R. Messora, Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria, *Clin. Oral Implants Res.* 18 (2007) 311–318.
- [22] A.A. Sawyer, S.J. Song, E. Susanto, P. Chuan, C.X. Lam, M.A. Woodruff, D. W. Hutmacher, S.M. Cool, The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2, *Biomaterials* 30 (2009) 2479–2488.
- [23] E.G. Machado, J.P.M. Issa, F.A.T. Figueiredo, G.R. Santos, E.A. Galdeano, M. C. Alves, E.L. Chacon, R.S. Ferreira Junior, B. Barraviera, M.R. Cunha, A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects, *Acta Histochem.* 117 (2015) 288–296.
- [24] G.F. Caetano, M.A.C. Frade, T.A.M. Andrade, M.N. Leite, C.Z. Bueno, A.M. Moraes, J.T. Ribeiro-Paes, Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 103 (2015) 1013–1022.
- [25] D.A. Rider, C. Dombrowski, A.A. Sawyer, G.H.B. Ng, D. Leong, D.W. Hutmacher, V. Nurcombe, S.M. Cool, Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 26 (2008) 1598–1608.

Morphological, mechanical and biological assessment of PCL/pristine graphene scaffolds for bone regeneration

Weiguang Wang¹, Guilherme Ferreira Caetano^{1,2}, Wei-Hung Chiang³, Ana Letícia Braz⁴, Jonny James Blaker⁴, Marco Andrey Cipriani Frade² and Paulo Jorge Bártolo^{1*}

¹ Manchester Biomufacturing Centre, School of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester, Manchester, M13 9PL, UK

² Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

³ Department of Chemical Engineering, National Taiwan University of Science and Technology, Taipei, E2-514, Taiwan

⁴ Bio-Active Materials Group, School of Materials, The University of Manchester, Manchester, M13 9PL, UK

Abstract: Scaffolds are physical substrates for cell attachment, proliferation, and differentiation, ultimately leading to the regeneration of tissues. They must be designed according to specific biomechanical requirements such as mechanical properties, surface characteristics, biodegradability, biocompatibility, and porosity. The optimal design of a scaffold for a specific tissue strongly depends on both materials and manufacturing processes. Polymeric scaffolds reinforced with electro-active particles could play a key role in tissue engineering by modulating cell proliferation and differentiation. This paper investigates the use of an extrusion additive manufacturing system to produce PCL/pristine graphene scaffolds for bone tissue applications. PCL/pristine graphene blends were prepared using a melt blending process. Scaffolds with regular and reproducible architecture were produced with different concentrations of pristine graphene. Scaffolds were evaluated from morphological, mechanical, and biological view. The results suggest that the addition of pristine graphene improves the mechanical performance of the scaffolds, reduces the hydrophobicity, and improves cell viability and proliferation.

Keywords: biofabrication, human adipose-derived stem cells, poly (ϵ -caprolactone), pristine graphene, scaffolds, tissue engineering

*Correspondence to: Paulo Jorge Bártolo, School of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester, Manchester, UK; E-mail: paulojorge.dasilvabartolo@manchester.ac.uk

Received: May 30, 2016; **Accepted:** June 16, 2016; **Published Online:** June 28, 2016

Citation: Wang W, Caetano G F, Chiang W-H, *et al.*, 2016, Morphological, mechanical, and biological assessment of PCL/pristine graphene scaffolds for bone regeneration. *International Journal of Bioprinting*, vol.2(2): 95–105. <http://dx.doi.org/10.18063/IJB.2016.02.009>.

1. Introduction

Bone is a highly anisotropic tissue, able to heal and remodel without leaving any scar in cases of very limited damage or fracture. However, in pathological fractures, traumatic bone loss or pri-

mary tumour resection, where the bone defect exceeds a critical size, bone is no longer able to heal itself^[1,2]. Additionally, this regenerative ability reduces with age^[3]. With the increasing life expectancy of the population, osteoporotic fractures will have a serious economic impact on society and patient's quality of

life. It is estimated that in Europe 179,000 men and 611,000 women will suffer hip fracture each year and the cost of all osteoporotic fractures in the EU will increase from the current 31.7 billion euros to 76.7 billion euros by 2050^[4].

In these cases, the clinical approach is the use of bone grafts, defined as an implanted material that promotes bone healing alone or in combination with other materials, through osteogenesis, osteoinduction, and osteoconduction^[5]. Bone grafts can be divided into autografts, allografts, and xenografts^[1,2,6]. However, there are many inherent limitations with this procedure. Autografts are considered to be the most effective approach, however, they present some drawbacks such as site morbidity, pain, and prolonged hospitalisation^[2,3]. Allografts are associated with rejection problems, transmission of diseases and infections from donor to recipient, and cost^[1,2,6]. Xenografts major limitations are related to their lack of osteogenic properties, risk of immunogenicity and transmission of infections and zoonotic diseases, and poor clinical outcome^[5,6]. Therefore, biofabrication—the combined use of additive manufacturing techniques, biocompatible and biodegradable materials, cells, growth factors, etc., for the fabrication of bioactive scaffolds (synthetic grafts)—is becoming a promising alternative for grafting^[7–14]. In this approach, scaffolds provide an initial biochemical substrate for the novel tissue until cells can produce their own extra-cellular matrix. An ideal scaffold for bone tissue engineering must be designed according to the following requirements^[3,10,11,15,16]:

- The scaffold material must be non-toxic and allow cell attachment, proliferation, and differentiation;
- The scaffold material must degrade into non-toxic products under a controlled degradation rate;
- The scaffolds should promote osteointegration, which corresponds to the formation of a chemical bond between bone and the surface of the implanted scaffold without the formation of fibrous tissue. They must also promote osteoconduction and osteogenesis, inducing chemical stimulation of human mesenchymal stem cells into bone-forming osteoblasts;
- Scaffolds must be able to deliver growth factors, cytokines, and antibacterial materials.

Scaffolds must present sufficient strength and stiffness to withstand stresses in the host tissue environment and adequate surface properties like wettability and surface roughness guaranteeing that a good biomechanical coupling is achieved between the scaffold and the tissue.

Its capacity to stimulate cells is also another important requirement. As electrical signals are critical physiological stimuli that strongly affect cell behavior, electro-active scaffolds could have a great potential as substrates for tissue engineering, enabling cell stimulation, as well as increasing their proliferation and differentiation^[17–20]. In order to produce these scaffolds, different routes are explored, including the use of conductive polymers mixed with non-conductive polymers, and the use of inorganic conductive materials with non-conductive polymers. Pristine graphene (highly pure graphene material) is a two-dimensional carbon nano-filler that can be used to create electro-active scaffolds, with potential to improve mechanical and conductivity properties. Different manufacturing techniques, like solvent precipitation/casting and electrospinning, have been used to produce graphene composites substrates (2D), as well as foams and scaffolds (3D)^[21–23]. However, these techniques are not fully reproducible and do not allow a good control over pore shape, size, and interconnectivity, which are critical parameters to design optimised 3D scaffolds. Additionally, a number of studies reported on the cytotoxicity of graphene-based composite materials and its potential risks^[24–26], while others reported that graphene-coated surfaces presented good cytocompatibility, stimulating cell proliferation^[27,28].

This paper investigates the potential usage of PCL/pristine graphene scaffolds, containing very small concentrations of pristine graphene (to avoid potential cytotoxicity effects), for tissue engineering applications. Two major effects were considered; how effective is pristine graphene to improve the mechanical properties even in small concentrations, and the effect of small concentrations of pristine graphene on both cell viability and proliferation. Scaffolds with different material compositions were produced using an extrusion-based additive manufacturing technique, which allows high reproducibility and the fabrication of scaffolds with good control over its topology (pore size, shape, distribution, etc.).

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Poly (ϵ -caprolactone)

Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) used in the research was Capa 6500 (Perstorp, UK). PCL is a semi-crystalline biocompatible and biodegradable linear aliphatic polyester with a low melting point and glass transition

temperature^[29,30]. Its relevant properties are indicated in Table 1.

Table 1. Material properties of PCL

Density	1.146 g/mL at 25°C
Melting point	58–60°C
Glass transition temperature	≈ −60°C
Molecular weight (Mw)	50000 g/mol
Specific heat of vaporisation	1 kJ/g
Solubility parameter (δ)	−9.43 (cal/cm ³)

Pristine Graphene

Pristine graphene was prepared via water-assisted liquid phase exfoliation of graphite. Briefly, 50 mg microcrystalline graphite powder (325 mesh, 99.995% pure, purchased from Alfa Aesar) was immersed in *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) mixture with a 0.2 mass fraction of water. The initial concentration of graphite was fixed at 5 mg mL^{−1} for exfoliation. NMP, 99% extra pure, was purchased from ACROS ORGANICS. The materials were batch sonicated for 6 hours in a bath sonicator (Elma sonic P60H, Switzerland) at a fixed nominal power and frequency of 100 W and 37 kHz, respectively. Sample dispersions were hanged on for overnight in between sonication and centrifugation, and were centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes using a Hettich, EBA20. The upper 75% of the colloidal supernatant were collected and dried in an oven to yield the graphene nano-sheets.

Melt-Blending Process

PCL/pristine graphene blends were prepared according to the following steps:

PCL pellets were melted up to 70°C;

Pristine graphene flakes were added to the polymer melt at desired concentrations (0.25% wt, 0.50% wt and 0.75% wt);

The blend was physically mixed for 15 minutes to ensure good pristine graphene dispersion;

After mixing, the blended material was cool down and cut into small pellets.

2.2 Scaffold Fabrication

A three-dimensional block model was initially designed in a computer-aided design (CAD) software (SolidWorks, Dassault Systems). A 0°/90° lay-down pattern was adopted to obtain pores with a regular square geometry while maintaining a constant filament distance of 680 μ m. Scaffolds were produced using the

following process parameters: melting temperature (90°C); slice thickness (220 μ m); screw rotation velocity (22 rpm) and deposition velocity (20 mm/s). PCL and PCL/pristine graphene scaffolds containing different concentrations of graphene (0.25% wt, 0.50% wt and 0.75% wt) were produced using a screw-assisted additive manufacturing system from RegenHU (3DDiscovery, Switzerland). In this process, the material is molten in the liquefier tank, pressed to the barrier screw tank by compressed air, and extruded out through a 330 μ m nozzle. PCL/pristine graphene pellets were initially prepared by melt blending. Produced scaffolds presented well dispersed pristine graphene, as previously reported using Raman spectroscopy and micro Raman mapping^[4].

2.3 Thermogravimetric Analysis

The onset of thermal degradation and pristine graphene content in the scaffolds was assessed using a TA Instruments Q500 TGA equipped with an evolved gas analysis furnace. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on neat PCL scaffolds as controls, and pristine graphene loaded PCL scaffolds. Scans were performed in an air atmosphere (flow at 60 mL/min) with a temperature range from room temperature to 560°C at a rate of 10°C/min. Measurements were taken using sample mass of 6 ± 1 mg in platinum pans. The weight losses of the PCL/pristine graphene composite structures were monitored and used to calculate the final pristine graphene contents.

2.4 Morphological Characterisation

Scanning electron microscopy (SEM) was used to investigate the morphology of produced scaffolds and to measure pore size (PS) and filament width (FW), by comparing obtained values with the initial design parameters (Figure 1). SEM was conducted with a Quanta 200 SEM system, using an accelerating voltage of 10 kV. All relevant dimensions were measured using the software Image J. The average and standard deviation obtained from 6 measurements are reported for each scaffold.

2.5 Apparent Water-in-air Contact Angle

The contact angle indicates the wettability of the material surface, being an important parameter in order to understand the biological interaction between the scaffolds and cells. The balance of forces regarding the surface tension between liquid-vapour (γ_{lv}) for a liquid drop and the interfacial tension between the solid

Figure 1. Design parameters of the PCL/pristine graphene scaffolds.

substrate and the liquid drop (γ_{sl}) depends on the angle (θ) between the drop and the surface. Thus, the surface energy (γ_{sv}) can be evaluated using the following equation:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sf} \cos \theta + \gamma_{lv} \quad (1)$$

The contact angle enables to understand the hydrophilic/hydrophobic characteristics of the structure. A contact angle below 90° means a hydrophilic surface while a contact angle values above 90° corresponded to hydrophobic surfaces.

Static contact angle measurements were performed using the equipment OCA 15 (Data Physics) and deionised water (4 μL of volume drop, 1 $\mu\text{L/s}$ of velocity). For each condition, five measurements were performed using the sessile drop method. The drop shape was recorded with a high speed framing camera. Measurements were performed after a static time of 20 seconds.

2.6 Mechanical Characterisation

Compression tests were performed on both PCL and PCL/pristine graphene scaffolds to assess the effect of the addition of pristine graphene on the mechanical properties of scaffolds. All tests were carried out using scaffolds ($5 \times 5 \times 6$ mm) in the dry state at a rate of 1 mm/min, to a strain limit of 0.3 mm/mm (30%), using the INSTRON 4507 system equipped with a 1 kN load cell. During uniaxial compression tests, the software captured force, F , and corresponding displacement values, which were converted into engineering stress (σ) and strain (ϵ) as follows:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (2)$$

$$\epsilon = \frac{\Delta h}{h_0} \quad (3)$$

where A is the initial sample cross section area and Δh is the scaffold height variation. The obtained stress-strain data was further processed to determine the compression modulus, E_c , according to the procedure previously reported by Fiedler^[7].

2.7 Biological Test (*In Vitro*)

Scaffold Preparation

For biological tests, PCL and PCL/pristine graphene scaffolds were cut into small blocks (11 mm $\times$ 11 mm $\times$ 6 mm) and placed into 24-well plates for further *in vitro* measurement. All scaffolds were sterilised by immersion in 70% ethanol for at least 4 hours, then rinsed twice with phosphate buffer solution (PBS) and dried 12 hours in a 37°C incubator. Prior to cell seeding, scaffolds were dampened using cell culture media (MesenPRO RS™ Basal Medium) for 4 hours to enhance cell attachment and prevent drying.

Cell Seeding

In vitro tests were performed by seeding human adipose-derived stem cells (ADSC) (STEMPRO®, Invitrogen, USA) on the scaffolds, using passages 3 to 5 suitable for seeding. Cells were cultured in T75 tissue culture flasks (Sigma-Aldrich, UK) with MesenPRO RS™ Basal Medium (Invitrogen, USA) until 80% confluence and harvested by the use of 0.05% trypsin-EDTA solution (Invitrogen, USA), and finally seeded on the scaffolds (100 μL of medium containing around 5×10^4 cells per sample). The cell-seeded scaffolds were incubated at standard conditions (37°C under 5% CO_2 and 95% humidity) for 2 hours to allow cell attachment, before the addition of 1 mL fresh basal medium^[16,31].

Cell Viability/Proliferation

Cell viability/proliferation was assessed using the Resazurin assay, commercially known as Alamar Blue assay (Sigma-Aldrich, UK). Resazurin (7-hydroxy-10-oxido-phenoxazin-10-ium-3-one) dye is used to measure cytotoxicity and proliferation^[32,33]. Cells are able to reduce resazurin to resorufin intracellularly by mitochondrial enzyme activity based on their cellular metabolic activity^[33,34]. Briefly, cell viability/proliferation was measured at 3, 7, and 14 days after cell seeding. The medium was changed every 3 days. At each time point, the cell-seeded scaffolds were placed in a new 24 well plate and 1 mL Alamar Blue solution

(0.001% in culture medium) was added to each well. The plates were incubated for 4 hours under standard conditions. After incubation, 100 μ L of each sample was transferred to a 96-well plate and the fluorescence intensity was measured at 540 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength with a spectrophotometer (Sunrise; Tecan, Männedorf, Zurich, Switzerland). Experiments were performed at least three times in duplicate.

Cell Morphology

After incubation for 14 days, cell-seeded scaffolds were observed with SEM to assess the cell attachment and morphology. Scaffold samples were fixed with 2% glutaraldehyde solution (Sigma-Aldrich, UK) for 2 hours at room temperature. Then scaffolds were rinsed twice with PBS, dehydrated with graded ethanol series, following 50%, 70%, 80%, 90% and 100%, then 50:50 ethanol:hexamethyldisilazane (v/v) (HMDS) and 100% HMDS (with 10 minutes exposure steps), and then air dried for removal of HMDS^[35]. Samples were coated with platinum and imaged using SEM, as described above.

2.8 Data Analysis

All data were represented as mean $\pm$ standard deviation. Biological results were subjected to one-way analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's post-hoc test using GraphPad Prism software. Significance levels were set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1 Thermogravimetric Analysis

The final content of pristine graphene in the PCL/pristine graphene composite scaffolds was calculated by TGA. The results (Table 2) suggest that the pristine graphene was effectively incorporated into the composite scaffolds, without significant losses during the melt blending process. It is also possible to observe from Table 2 that there is no significant difference on

Table 2. Pristine graphene loading verification, assessed by TGA (reported at 555°C)

Target graphene loading (% wt)	Determined pristine graphene concentration (%)	T_d (°C)
0	-	297.7 $\pm$ 0.6
0.25	0.131 $\pm$ 0.065	294.7 $\pm$ 3.8
0.50	0.503 $\pm$ 0.004	296.3 $\pm$ 1.5
0.75	0.78 $\pm$ 0.001	297.3 $\pm$ 0.6

the onset of thermal degradation due to the presence of pristine graphene. Results also indicate that no degradation events occur during the scaffold fabrication process, since the extrusion temperature was 90°C.

3.2 Morphological Analysis

Figures 2 and 3 show the SEM micrographs (top and cross-section) of PCL and PCL/pristine graphene scaffolds. From the top view of these micrographs (Figure 2), it is possible to observe that scaffolds present a well-defined internal geometry and uniform pore distribution. Cross-section micrographs (Figure 3) show a good adhesion between adjacent layers. The values of pore size and filament width are summarised in Table 3. Results show an increase in the filament width due to the increase in pristine graphene, resulting in a slight decrease in both pore size and porosity. Figure 4 shows the corresponding variation trends.

3.3 Mechanical Compression Test

The mechanical behaviour of the scaffolds is strongly correlated to the amount of pristine graphene in PCL. Results show that by increasing the concentration of pristine graphene from 0.13% to 0.78%, the compression modulus increased from 80 MPa to circa 130 MPa (Table 4 and Figure 5). This effect is due not only to the reinforcement effect of the pristine graphene but also to the differences in terms of pore size (Table 3). In comparison to PCL scaffolds, a slight decrease in mechanical properties was observed for scaffolds containing 0.13% pristine graphene, which the authors hypothesise, could be due to the stress concentration in the interface between the polymer and the pristine graphene, which superpose the reinforcement effect of pristine graphene and the reduction on the pore size. Maximum values of compression modulus observed for scaffolds containing higher concentrations of pristine graphene are in the mid range of properties reported for human trabecular bone^[36].

3.4 Apparent Water-in-air Contact Angle Analysis

To access the hydrophilicity, the static contact angle was determined and the results presented in Table 5 and Figure 6. The results show a decrease in the static contact angle by increasing the pristine graphene concentration. It is also possible to observe that pristine graphene, even in very small concentrations, can be used to shift from hydrophobic PCL scaffolds to hydrophilic composite ones. Statically, 0.50% and 0.78% PCL/pristine graphene scaffold exhibited lower contact angle than PCL scaffolds.

Figure 2. SEM images of scaffolds (top view) produced using different pristine graphene concentration. (A) 0% wt; (B) 0.13% wt; (C) 0.50% wt; (D) 0.78% wt.

Figure 3. SEM images of scaffolds (cross section) produced using different pristine graphene concentration. (A) 0% wt; (B) 0.13% wt; (C) 0.50% wt; (D) 0.78% wt.

Table 3. Morphological characteristics of scaffold structures for different pristine graphene concentration

Pristine graphene concentration (% wt)	Filament width (μm)	Pore size (μm)
0	343 ± 5	368 ± 24
0.13	361 ± 5	366 ± 11
0.50	367 ± 4	347 ± 13
0.78	379 ± 14	343 ± 6

Figure 4. Variation of filament diameter and pore size as a function of pristine graphene concentration.**Table 4.** Mechanical properties of scaffolds for pristine graphene concentration values

Pristine graphene concentration (% wt)	Compression modulus, E_c [MPa]
0	82.2 ± 6.8
0.13	80.6 ± 3.1
0.50	109.3 ± 5.3
0.78	128.7 ± 6.9

Figure 5. Compression test results for scaffolds containing different pristine graphene concentrations.

3.5 In Vitro Evaluation

The Alamar Blue assay was performed to evaluate cell

Table 5. Apparent water-in-air contact angle after 20 seconds

Pristine graphene concentration (% wt)	Contact Angle
0	96.10 ± 1.51
0.13	91.78 ± 5.32
0.50	84.68 ± 2.98
0.78	88.25 ± 3.95

Figure 6. Contact angle test results for scaffolds containing different pristine graphene concentrations. * Statistical evidence ($p < 0.05$) analysed by one-way ANOVA, and Tukey post test.

viability and cell proliferation on PCL/pristine graphene scaffolds compared to PCL scaffolds. The fluorescence intensity after measurement is given in Figure 7. Higher fluorescence intensity corresponds to more metabolically active cells. It can be observed

Figure 7. Cell viability/proliferation using Alamar blue assay. NC (negative control); *Statistical evidence ($p < 0.05$) analysed by one-way ANOVA, and Tukey post test.

that at day 3, all scaffolds exhibited similar biological performance. At day 7, 0.78% PCL/pristine graphene scaffolds exhibited greater fluorescence intensity, statistically different from 0%, corresponding to a high cellular activity. This observation can indirectly be correlated to higher cell proliferation rate. On the other hand, based on the statistical analysis, it is possible to notice that on day 14, 0.50% and 0.78% PCL/pristine graphene scaffolds positively deviated from PCL scaffolds and 0.13% PCL/pristine graphene scaffolds, showing higher cell viability/proliferation rates. It is also possible to observe that through all the time points, the fluorescence activity increased, which indicates an increase in the cell proliferation rate. The negative control (NC) shows no metabolically active cells.

According to SEM observations of the cells on the scaffolds (Figure 8), extensive cell attachment and cell spreading (pseudopodia) are evident. Cell sheets are seen to bridge orthogonal scaffold filaments, indicating that scaffolds are able to support the growth and proliferation of cells. The isolation and characterisa-

tion tests of ADSCs were performed by the supplier (ThermoFisher Scientific, UK). The focus of this paper was to access the effect of low concentration of pristine graphene on both cell viability and proliferation. Differentiations studies, not reported here, are being conducted.

4. Conclusion

This paper presents the morphological, mechanical, and biological properties of PCL/pristine graphene scaffolds containing different concentrations of pristine graphene. The results indicate that the screw assisted additive manufacturing system considered in this research work is a viable technique to produce these composite scaffolds. The results also show that the addition of pristine graphene has an impact on both the scaffold topology and mechanical properties. For the same process conditions, increasing the content of pristine graphene increases the filament width, decreases pore size, and increases the mechanical performance of the scaffold.

Figure 8. SEM images of cell attachment and cell spreading on PCL/pristine graphene scaffolds. (A) scaffold with 0.78% of pristine graphene; (B) scaffold with 0.5% of pristine graphene; (C) scaffold with 0.13% of pristine graphene; (D) scaffold with 0% of pristine graphene.

It was also observed that pristine graphene slightly reduces the contact angle, thus increasing the cell-scaffold affinity and cell viability/proliferation. These results suggest that PCL/pristine graphene scaffolds are promising biomaterial for bone tissue engineering applications.

Conflict of Interest and Funding

No conflict of interest was reported by the authors.

Mr. Weiguang Wang wishes to acknowledge the School of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester, for the financial support on his PhD project.

Mr. Guilherme Ferreira Caetano wishes to acknowledge the financial support received from FAPESP, Brazil (Process 2014/23662-1).

This work was partially performed within the framework of the SKELGEN project – Establishment of a cross continent consortium for enhancing regenerative medicine in skeletal tissues (Marie Curie Action, International Research Staff Exchange Scheme (IRSES) – Project reference: 318553).

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Mr. David Mortimer for the technical support on mechanical tests, Mr. William Stephen Ambler for his technical support on SEM operation, Mr. Ruben Pereira for his support on the contact angle measuring procedure, Prof. Nicholas Turner for his kind support on the plate reader and Mr. Ningning Zhu for his assistance on chemicals.

References

1. Lee J, Farag M M, Park E K, *et al.*, 2014, A simultaneous process of 3D magnesium phosphate scaffold fabrication and bioactive substance loading for hard tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, vol.36: 252–260.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.12.007>
2. Lichte P, Pape H C, Pufe T, *et al.*, 2011, Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury*, vol.42(6): 569–573.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.033>
3. Tang D, Tare R S, Yang L Y, *et al.*, 2016, Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, vol.83: 363–382.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.024>
4. Wang W, Chiang W H and Bartolo P J, 2016, *Proceedings of the 2nd International Conference on Progress in Additive Manufacturing, May 16-19, 2016: Design, fabrication and evaluation of PCL/graphene scaffolds for bone regeneration.*
5. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, *et al.*, 2014, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, vol.9(1): 18.
<http://dx.doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>
6. Denry I and Kuhn L T, 2016, Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Dental Materials*, vol.32(1): 43–53.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.008>
7. Fiedler T, Videira A C, Bártolo P, *et al.*, 2013, On the mechanical properties of PLC–bioactive glass scaffolds fabricated via BioExtrusion. *Materials Science and Engineering: C*, vol.57: 288–293.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.063>
8. Sousa I, Mendes A, Pereira R F, *et al.*, 2014, Collagen surface modified poly (ϵ -caprolactone) scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties. *Materials Letters*, vol.134: 263–267.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.06.132>
9. Santos A R C, Almeida H A and Bártolo P J, 2013, Additive manufacturing techniques for scaffold-based cartilage tissue engineering. *Virtual and Physical Prototyping*, vol.8(3): 175–186.
<http://dx.doi.org/10.1080/17452759.2013.838825>
10. Bartolo P J, Kruth J P, Silva J, *et al.*, 2012, Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes. *CIRP Annals – Manufacturing Technology*, vol.61(2): 635–655.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2012.05.005>
11. Bártolo P J, Chua C K, Almeida H A, *et al.*, 2009, Biomanufacturing for tissue engineering: present and future trends. *Virtual and Physical Prototyping*, vol.4(4): 203–216.
<http://dx.doi.org/10.1080/174527590903476288>
12. Fantini M, Curto M and De Crescenzo F, 2016, A method to design biomimetic scaffolds for bone tissue engineering based on Voronoi lattices. *Virtual and Physical Prototyping*, vol.11(2): 1–14.
<http://dx.doi.org/10.1080/17452759.2016.1172301>
13. Lee J M and Yeong W Y, 2015, A preliminary model of time-pressure dispensing system for bioprinting based on printing and material parameter. *Virtual and Physical Prototyping*, vol.10(1): 3–8.
<http://dx.doi.org/10.1080/17452759.2014.979557>
14. Dean D, Mott E, Luo X, *et al.*, 2014, Multiple initiators and dyes for continuous digital light processing (cDLP) additive manufacture of resorbable bone tissue engineering. *Virtual and Physical Prototyping*, vol.9(1): 3–9.
<http://dx.doi.org/10.1080/17452759.2013.873337>
15. Kumar A, Mandal S, Barui S, *et al.*, 2016, Low temperature additive manufacturing of three dimensional

- scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, vol.103: 1–39.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2016.01.001>
16. Caetano G, Violante R, Sant'Ana A B, *et al.*, 2016, Cellularized versus decellularized scaffolds for bone regeneration. *Materials Letters*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.05.152>
 17. Jin G and Li K, 2014, The electrically conductive scaffold as the skeleton of stem cell niche in regenerative medicine. *Materials Science and Engineering: C*, vol.45: 671–681.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.004>
 18. Lu L, Mende M, Yang X, *et al.*, 2012, Design and validation of a bioreactor for simulating the cardiac niche: a system incorporating cyclic stretch, electrical stimulation, and constant perfusion. *Tissue Engineering Part A*, vol.19(3–4): 403–414.
<http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0135>
 19. Maidhof R, Tandon N, Lee E J, *et al.*, 2012, Biomimetic perfusion and electrical stimulation applied in concert improved the assembly of engineered cardiac tissue. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol.6(10): e12–e23.
<http://dx.doi.org/10.1002/term.525>
 20. Kuilla T, Bhadra S, Yao D, *et al.*, 2010, Recent advances in graphene based polymer composites. *Progress in Polymer Science*, vol.35(11): 1350–1375.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.07.005>
 21. Li M, Guo Y, Wei Y, *et al.*, 2006, Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials*, vol.27(13): 2705–2715.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.037>
 22. Kumar S, Azam D, Raj S, *et al.*, 2016, 3D scaffold alters cellular response to graphene in a polymer composite for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol.104(4): 732–749.
<http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.33549>
 23. Wang J K, Xiong G M, Zhu M, *et al.*, 2015, Polymer-enriched 3D graphene foams for biomedical applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol.7(15): 8275–8283.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsami.5b01440>
 24. Liao K H, Lin Y S, Macosko C W, *et al.*, 2011, Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol.3(7): 2607–2615.
<http://dx.doi.org/10.1021/am200428v>
 25. Wang K, Ruan J, Song H, *et al.*, 2011, Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Research Letters*, vol.6(1): 8.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11671-010-9751-6>
 26. Zhang Y, Ali S F, Dervishi E, *et al.*, 2010, Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano*, vol.4(6): 3181–3186.
<http://dx.doi.org/10.1021/nn1007176>
 27. Park S Y, Park J, Sim S H, *et al.*, 2011, Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Advanced Materials*, vol.23(36): H263–H267.
<http://dx.doi.org/10.1002/adma.201101503>
 28. Li N, Zhang X, Song Q, *et al.*, 2011, The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. *Biomaterials*, vol.32(35): 9374–9382.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.065>
 29. Woodruff M A and Hutmacher D W, 2010, The return of a forgotten polymer — polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, vol.35(10): 1217–1256.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
 30. Sasmazel H T, 2011, Novel hybrid scaffolds for the cultivation of osteoblast cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.49(4): 838–846.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.022>
 31. Caetano G F, Bártolo P J, Domingos M, *et al.*, 2015, Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold. *Procedia Engineering*, vol.110: 59–66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2015.07.010>
 32. Zhang H X, Du G H and Zhang J T, 2004, Assay of mitochondrial functions by resazurin *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica*, vol.25(3): 385–389.
 33. Borra R C, Lotufo M A, Gaglioti S M, *et al.*, 2009, A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*, vol.23(3): 255–262.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242009000300006>
 34. Vega-Avila E and Pugsley M K, 2011, An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, vol.54: 10–14.
 35. Poh P S P, Hutmacher D W, Holzapfel B M, *et al.*, 2016, *In vitro* and *in vivo* bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds. *Acta Biomaterialia*, vol.30: 319–333.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.012>
 36. Bártolo P J, Domingos M, Patrício T, *et al.*, 2011, Biofabrication strategies for tissue engineering, in Fernandes P R and Bártolo P J, (eds) *Advances on Modeling in Tissue Engineering*, Springer, Netherlands, 137–176.
<http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-1254-6>

Article

Enhancing the Hydrophilicity and Cell Attachment of 3D Printed PCL/Graphene Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Weiguang Wang ^{1,†}, Guilherme Caetano ^{1,2,†}, William Stephen Ambler ³, Jonny James Blaker ³, Marco Andrey Frade ², Parthasarathi Mandal ¹, Carl Diver ¹ and Paulo Bártolo ^{1,*}

¹ Manchester Institute of Biotechnology, School of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK; weiguang.wang@postgrad.manchester.ac.uk (W.W.); caetanogf@gmail.com (G.C.); partha.mandal@manchester.ac.uk (P.M.); carl.diver@manchester.ac.uk (C.D.)

² Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil; prof.marcoandrey@gmail.com

³ Bio/Active Materials Group, School of Materials, The University of Manchester, Manchester M13 9PL, UK; william.ambler@postgrad.manchester.ac.uk (W.S.A.); jonny.blaker@manchester.ac.uk (J.J.B.)

* Correspondence: paulojorge.dasilvabartolo@manchester.ac.uk; Tel.: +44-161-306-4887

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Chee Kai Chua

Received: 30 September 2016; Accepted: 25 November 2016; Published: 7 December 2016

Abstract: Scaffolds are physical substrates for cell attachment, proliferation, and differentiation, ultimately leading to the regeneration of tissues. They must be designed according to specific biomechanical requirements, i.e., certain standards in terms of mechanical properties, surface characteristics, porosity, degradability, and biocompatibility. The optimal design of a scaffold for a specific tissue strongly depends on both materials and manufacturing processes, as well as surface treatment. Polymeric scaffolds reinforced with electro-active particles could play a key role in tissue engineering by modulating cell proliferation and differentiation. This paper investigates the use of an extrusion-based additive manufacturing system to produce poly(ϵ -caprolactone) (PCL)/pristine graphene scaffolds for bone tissue applications and the influence of chemical surface modification on their biological behaviour. Scaffolds with the same architecture but different concentrations of pristine graphene were evaluated from surface property and biological points of view. Results show that the addition of pristine graphene had a positive impact on cell viability and proliferation, and that surface modification leads to improved cell response.

Keywords: biofabrication; composite materials; graphene; hydrophilicity; polycaprolactone; scaffolds; surface modification; tissue engineering

1. Introduction

Three-dimensional (3D) scaffolds fabricated by additive manufacturing are a promising strategy in tissue engineering for the replacement and regeneration of damaged tissue. Such scaffolds should ideally be stimulatory, as well as biocompatible, degradable, and designed according to specific requirements to create a highly porous structure with interconnected pores [1–3]. These characteristics can provide an appropriate environment for cells and play an important role as a physical substrate for cell attachment, proliferation, and differentiation, as well as integration to the host tissue in order to regenerate the defect [4–6]. Although some new methods using shape memory materials, such as bioprinting and 4D printing, are under development [7–10], they are very much at infancy and less mature than scaffold technology.

An ideal approach is to combine porous scaffolds with living progenitor cells, especially for elderly people whose cell growth and cell differentiation are age-compromised. Cellularised scaffolds, as previously reported using human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) in a bone regeneration animal model [11], might stimulate the tissue around the damage area towards regeneration whilst playing an important role to support cell migration, cell attachment, proliferation, and differentiation.

Achieving suitable cell attachment to the scaffold is key to success; however, it is challenging with highly hydrophobic scaffold matrices, which may result in inefficient cell colonisation. Material surface modification such as plasma, laser and chemical treatment, and protein coating is commonly used in order to improve cell attachment, leading to more efficient scaffold colonisation [12–17]. However, some of these techniques are expensive, require long times, and in some cases are non-reproducible [12–14].

Pristine graphene, a two-dimensional carbon nanofiller, could play an important role in enhancing polymer material properties because it can improve solubility, processability, and mechanical and conductivity properties. Furthermore, it is suggested that graphene composites are able to provide a dramatic improvement in these properties with very low filler content [18–22]. Controversial discussion about graphene usage to develop and produce biomaterials has been reported in terms of cytotoxicity. Some research works have presented graphene-based composites as materials that might have potential cytotoxicity risks [23–25], while other studies report good cytocompatibility and the ability to stimulate cell proliferation, for example, with graphene coatings [26,27].

In order to enhance cell attachment and biological performance of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) scaffolds, this paper investigates the addition of three different small concentrations of pristine graphene, as well as a simple sodium hydroxide (NaOH) surface treatment, to render the scaffolds more hydrophilic. Two major effects were considered: the effect of pristine graphene in small concentrations on the cell viability/proliferation rate and the effect of NaOH chemical treatment on the surface properties such that the hydrophobic feature of PCL scaffolds is changed.

2. Results and Discussion

2.1. Surface Modification Evaluated by Contact Angle

The apparent water-in-air contact angle on scaffolds untreated and treated with NaOH are given in Figure 1. As previously reported [28,29], the contact angle indicates the wettability of the material surface, indicating hydrophilic/hydrophobic characteristics of the material. In general, a contact angle above 90° corresponds to a hydrophobic surface, while a contact angle value below 90° represents a hydrophilic surface. In the untreated case, the values slightly decreased with the addition of pristine graphene, ranging from $96^\circ \pm 1.50^\circ$ (neat PCL) to $84^\circ \pm 2.90^\circ$ (0.50 wt % pristine graphene). Contrary to the common assumption that graphene, as other carbon-based materials, is hydrophobic, these results are in line with recent observations from Munz and co-workers [30]. Those researchers investigated the adhesion and friction properties of single-layer and double-layer graphene using chemical force microscopy with a hydrophobic probe. Results showed a large adhesion force between the probe and double-layer graphene compared to single-layer, showing that double-layer graphene is ideal for hydrophobic applications and single-layer graphene for applications where a hydrophilic surface is required. Figure 1 shows a bar chart with the contact angle values. A statistical difference was observed between pure PCL scaffolds and both 0.50 wt % and 0.78 wt % pristine graphene scaffolds before NaOH treatment, indicating that the hydrophilicity of the surface increased with a small concentration of pristine graphene. After NaOH treatment, neat PCL ($61^\circ \pm 6.50^\circ$), 0.13 wt % ($69^\circ \pm 6.72^\circ$), and 0.50 wt % ($67^\circ \pm 6.09^\circ$) pristine graphene scaffolds had a significant reduction in contact angle, compared to untreated scaffolds, and were statistically different from 0.78 wt % ($83^\circ \pm 7.06^\circ$).

Figure 1. Summary of the apparent water-in-air contact angle for scaffolds containing different pristine graphene concentrations untreated and treated with NaOH 5M. * Statistical evidence ($p < 0.05$) analysed with a one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.

2.2. Morphological Evaluation of Scaffolds

Figure 2 represents the fibre surface of 0.78 wt % pristine graphene and neat PCL scaffolds treated and untreated with 5 M NaOH for 3 h. Results show that, for the NaOH chemical treatment time considered, there is no negative impact on the fibre structure in the produced scaffolds. Similar results were obtained for the other compositions. It is also evident that the produced scaffolds have regular, well-defined, and uniform pore distribution.

Figure 2. Top surface and cross-section scanning electron microscope images of neat PCL and 0.78 wt % pristine graphene scaffolds treated and untreated with NaOH.

2.3. Biological Evaluation

Cell viability and proliferation on scaffold samples were assessed using an Alamar Blue assay. Fluorescence intensity is reported in Figure 3. Higher fluorescence intensity corresponds to more

metabolically active cells. Comparing the three different time points in Figure 3a or Figure 3b, it can be observed that, for scaffolds both treated and untreated with NaOH, fluorescence intensity increases from one point in time to another, suggesting that scaffolds fabricated with the additive manufacturing system are suitable substrates for cell proliferation. Compared with values at the same point in time in Figure 3a or Figure 3b for untreated scaffolds, the addition of pristine graphene has a positive impact on the biological behaviour of polymer scaffold, but not a significant one. At Day 14, the fluorescence intensity of the 0.78 wt % PCL/pristine graphene scaffold was statistically higher than the neat PCL scaffold, representing a higher cell viability/proliferation rate. For NaOH-treated scaffolds, it can be observed that the addition of pristine graphene had a significant positive impact on cell viability/proliferation. According to statistical analysis, at Day 3, 0.50 wt % and 0.78 wt % scaffolds exhibited greater fluorescence intensity, statistically different from the neat and 0.13 wt % scaffolds, corresponding to higher cell viability/proliferation rates. At Days 7 and 14, all PCL/pristine graphene scaffolds exhibited better biological performance over the neat PCL scaffolds.

Figure 3. Cell viability/proliferation (Fluorescence intensity) after 3, 7, and 14 days of cell seeding. (a) Untreated scaffolds; (b) NaOH-treated scaffolds. * Statistical evidence ($p < 0.05$) analysed with a one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.

Comparing Figure 3a,b, it is evident that, at all three time points, scaffolds treated with NaOH had higher fluorescence intensity than non-treated scaffolds, presenting an improved biological performance. After 14 days, results indicated that, after chemical treatment with NaOH, the

improvements on biological behaviour caused by the addition of pristine graphene still exist. For each particular time point in Figure 3b, PCL/pristine graphene scaffolds showed higher fluorescence intensity than neat PCL scaffolds, with cell proliferation rate increasing concomitant to increase graphene addition.

Figure 4 represents the assessment of cells attached on the scaffolds and left on the surface of the well plate. The measurement was performed at the first time point (3 days) after cell seeding, which is a representation of the cell attachment rate. It is evident that scaffold samples treated with NaOH had a higher cell attachment rate than the untreated scaffolds. Scaffolds untreated had around 30% cell attachment, while scaffolds treated with NaOH varied widely among samples. Moreover, 0.50 wt % and 0.78 wt % pristine graphene scaffolds had statistically higher cell attachment rate after 3 days compared to the neat PCL scaffold. Cell attachment is closely related to the surface properties of the scaffolds. The chemical treatment with NaOH leads to enhanced hydrophilicity and more cell attachment when compared to the untreated scaffolds. Furthermore, the addition of pristine graphene (0.50 wt % and 0.78 wt %) improved the cell attachment and proliferation rate even more after three days.

Figure 4. Percentage of cells attached on the well plate surface (cells not attached to the scaffold) and percentage of cells attached on the scaffold after 3 days of cell seeding. * Statistical evidence ($p < 0.05$) analysed with a one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.

As is evident from Figures 3 and 4, pristine graphene has a significant impact on the biological performance of produced scaffolds, increasing cell attachment and proliferation. This can be attributed to the high surface area, the elastic modulus, and the stiffness of graphene. It is also related to the presence of wrinkles and ripples on graphene, created during the production of graphene [31]. Graphene was also found to be useful as a cellular adhesive, preventing implanted cells from reactive oxygen species (ROS)-mediated cell death, enhancing cell proliferation [32].

2.4. Cell Attachment and Cell Morphology

Cell attachment and morphology on the scaffolds was assessed via scanning electron microscopy (SEM) and laser confocal microscopy. Extensive cell attachment and cell spreading was observed, as shown in Figure 5. Confluent cell sheets were also observed, with many cells bridging orthogonal scaffold filaments. This indicates that the scaffolds are able to provide a suitable environment and support the growth and proliferation of cells. The confocal images show that cell morphology is maintained (nuclei stained blue, cell membrane red). Qualitatively, for all types of scaffolds, both SEM

and confocal images show a greater number of cells present for scaffolds containing pristine graphene. NaOH-treated scaffolds presented higher cell confluency than untreated scaffolds.

Figure 5. Cells attached on the scaffold. (a) SEM images after 21 days culture; (b) confocal images after 28 days culture.

3. Materials and Methods

3.1. Scaffold Fabrication

Poly (ϵ -caprolactone) (M_w 50,000, Capa 6500, Perstorp, Warrington, UK) and pristine graphene were used to produce scaffolds through a screw-assisted additive biomanufacturing system, the 3D Discovery (RegenHU, Villaz-St-Pierre, Switzerland), as previously reported [28]. PCL/pristine graphene pellets were initially prepared by melt blending in three different pristine graphene concentrations (0.25, 0.50, and 0.75 wt %) [28]. Briefly, pure PCL pellets were heated above 70 °C in a bowl to ensure all material is in a molten state prior to pristine graphene flake addition, at the desired concentrations. The materials were mixed for 15 min to guarantee a homogenous dispersion. After cooling down for 2 h, the blended material was cut into small pellets to be loaded to the screw-assisted additive biomanufacturing system. As previously reported [28], the obtained pristine graphene concentrations are 0.13, 0.50, and 0.78 wt %.

The extrusion-based additive manufacturing technique used in this work allows high reproducibility and good control over scaffold topology (including pore size, pore shape, and pore

distribution), which are critical parameters when designing optimised 3D interconnected porous scaffolds [28,33]. The 0°/90° lay-down pattern was adopted to obtain pores with a regular square geometry and a constant filament distance of 680 µm. The optimal combination of processing parameters—melting temperature (90 °C), slice thickness (220 µm), screw rotation velocity (22 rpm), and deposition velocity (20 mm/s)—allows for the filament diameter after extrusion to be close to the desired diameter of 330 µm [28,33]. As previously reported, the presence of pristine graphene at the surface of the scaffold filaments was observed using Raman spectroscopy, and micro Raman mapping showed a uniform distribution of pristine graphene [33].

After fabrication, scaffold samples were cut with fine, double-edged razor blades into small blocks (~11 mm × 11 mm × 6 mm) to fit in a 24-well culture plate.

3.2. Surface Modification

Scaffold samples for the NaOH-treated group were processed by soaking in 5 M NaOH for 3 h using 50 mL conical tubes, at room temperature [11]. The scaffolds were washed exhaustively with distilled water and air-dried for 24 h in an incubator at 37 °C.

3.3. Apparent Water-in-Air Contact Angle

Static contact angle measurements were performed on produced scaffolds using an OCA 15 (Data Physics) machine using the sessile drop method. Deionised water droplets of ~4 µL were deposited via a motorised syringe at a velocity of 1 µL/s. Five measurements per sample type were performed. The drop shape was recorded with a high speed framing camera. Measurements were performed 20 s after droplet addition.

3.4. Morphological Characterisation

Scanning electron microscopy (SEM) was used to investigate the morphology of produced scaffolds treated and untreated with 5 M NaOH. SEM was conducted with a Quanta 200 SEM system, using an accelerating voltage of 3.0 kV.

3.5. Cell Culture Studies

In vitro cell culture studies were conducted using Human adipose-derived stem cells (ADSCs) (STEMPRO[®], Invitrogen, Waltham, MA, USA) ranging from passage 3 to 5. Cells were cultured in T75 tissue culture flasks (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) with MesenPRO RS[™] Basal Medium (Invitrogen, Waltham, MA, USA) until 80% confluence and harvested by the use of a 0.05% trypsin solution (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

3.5.1. Cell Seeding

Scaffolds were sterilised in 70% ethanol for 4 h, rinsed in phosphate buffered saline (PBS) three times, placed in 24-well plates, and air-dried for 24 h in an incubator at 37 °C. The scaffolds were wet with 200 µL of media containing 10% foetal bovine serum (FBS) and kept in standard conditions (37 °C under 5% CO₂ and 95% humidity) for 2 h prior to cell seeding [11]. Cells were seeded on each scaffold (150 µL of medium containing around 5×10^4 cells). A tissue culture plastic (TCP) control containing the same amount of cells was included for consideration as 100% of cells seeded to evaluate the seeding efficiency after 3 days. The cell-seeded scaffolds and control were incubated at standard conditions (37 °C under 5% CO₂ and 95% humidity) for 2 h to allow cell attachment, before the addition of 1 mL of fresh basal media [11,34].

3.5.2. Cell Viability/Proliferation

In order to study the cell viability/proliferation and the percentage of cells attached in the scaffolds (cell-seeding efficiency), the Alamar Blue assay (also termed the Resazurin assay) was used

(reagents from Sigma-Aldrich, Dorset, UK) [35,36]. Briefly, cell viability/proliferation was measured at 3, 7, and 14 days after cell seeding to PCL and PCL/pristine graphene scaffolds treated and untreated with NaOH. After 3 days of cell seeding, but before the Alamar Blue test, the cell-seeded scaffolds were moved to a new 24-well plate and 1 mL of the Alamar Blue solution was added to each well and the control. Cells attached on the surface of the wells were also quantified on the 3rd time point. The plates were incubated for 4 h under standard conditions. After incubation, 150 μ L of each sample was transferred to a 96-well plate, and the fluorescence intensity was measured at 540 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength with a spectrophotometer (Sunrise, Tecan, Männedorf, Zurich, Switzerland). Experiments were performed three times in duplicate.

3.5.3. Cell Morphology and Attachment

Samples of scaffolds used in the cell viability/proliferation study were kept in culture up to 21 days to assess cell morphology and qualitative attachment to the scaffolds via scanning electron microscopy (SEM). For SEM preparation, scaffolds were fixed with a 3% glutaraldehyde solution (Sigma-Aldrich, UK) for 30 min at room temperature, rinsed twice with PBS, dehydrated with a graded ethanol series (50%, 70%, 80%, 90%, and 100% (twice)), in 50:50 ethanol/hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) and then in 100% HMDS (with 10 min exposure at each step), and then air dried for HMDS removal [11]. Thin cross-section layers of each sample (around 1 mm) was cut and platinum-coated for imaging using a Gatan Model 682 Precision Etching Coating System, to an approximate thickness of 7 nm. SEM images were obtained using a Hitachi S300N microscope (Hitachi, Maidenhead, UK).

Cell morphology was further assessed using laser confocal microscopy with scaffolds cultured up to 28 days, with cell membranes and nuclei stained. Samples were removed from the cell culture plate, rinsed twice in PBS, fixed using 4% paraformaldehyde for 40 min, and then washed twice with PBS prior to immersion for 30 min in an immunocytochemistry blocking buffer comprised of 2% goat serum and 1% bovine serum albumin in PBS. Samples were again rinsed twice in PBS. Cell nuclei were stained blue by soaking them in a PBS solution containing Hoescht 33342 (C62249, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) at a 2 μ M concentration; the cell membranes stained using CellMask™ Orange plasma membrane stain (C10045, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) were diluted to the manufacturer recommended level [37,38]. Samples were left in the staining solution for 10 min prior to removal, rinsed twice thoroughly with PBS, and mounted using ProLong® Diamond Antifade (P36962, ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Confocal images were obtained on a Leica TCS SP5 (Leica, Milton Keynes, UK) confocal microscope.

3.6. Data Analysis

All data were represented as mean $\pm$ standard deviation. A one-way analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's post-hoc test using GraphPad Prism software was applied. Significance levels were set at $p < 0.05$.

4. Conclusions

Scaffolds with filaments containing well dispersed pristine graphene produced by an additive manufacturing system presented good biological behaviour in terms of cell viability and proliferation, making them a good substrate for bone tissue regeneration. The addition of low concentrations of pristine graphene exhibited no cytotoxicity, and enhanced cell viability/proliferation.

The addition of pristine graphene, served to moderately reduce the apparent water-in-air contact angle compared to the neat PCL filaments. Chemical treatment with 5 M NaOH further increased the hydrophilicity, leading to better cell attachment and enhanced biological behaviour. Test results also proved that the NaOH treating process did not change the enhancement in biological performance due to the addition of pristine graphene.

It can be concluded that PCL/pristine graphene scaffolds fabricated by an extrusion-based additive manufacturing system could be a promising substrate for bone tissue engineering, and that NaOH chemical treatment could effectively improve the biological behaviour of these composite scaffolds.

Acknowledgments: The authors wish to acknowledge the School of Mechanical, Aerospace and Civil Engineering, University of Manchester and University of Sao Paulo. Financial support was received from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, (Process 2014/23662-1) and partially performed within the framework of the SKELGEN project—Establishment of a cross continent consortium for enhancing regenerative medicine in skeletal tissues (Marie Curie Action, International Research Staff Exchange Scheme (IRSES)—Project reference: 318553). The authors would like to acknowledge Ruben Pereira for his support on the contact angle measuring procedure.

Author Contributions: P.B., W.W., and G.C. conceived and designed the experiments; W.W. was responsible for blending the material and printing the scaffolds. W.W. and G.C. performed the experiments; W.W. and G.C. analysed the data; W.S.A. and J.J.B. were responsible for SEM and confocal imaging. W.W. and G.C. produced the first manuscript of the paper; P.B., P.M., C.D., M.A.F., W.S.A., and J.J.B. were responsible for manuscript reviewing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bartolo, P.J.; Chua, C.K.; Almeida, H.A.; Chou, S.M.; Lim, A.S. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends. *Virtual Phys. Prototyp.* **2009**, *4*, 203–216. [[CrossRef](#)]
2. Bartolo, P.J.; Kruth, J.P.; Silva, J.; Levy, G.; Malshe, A.; Rajurkar, K.; Mitsuishi, M.; Ciurana, J.; Leu, M. Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes. *CIRP Ann. Manuf. Technol.* **2012**, *61*, 635–655. [[CrossRef](#)]
3. Vaezi, M.; Yang, S. Extrusion-based additive manufacturing of PEEK for biomedical applications. *Virtual Phys. Prototyp.* **2015**, *10*, 123–135. [[CrossRef](#)]
4. Bártolo, P.J.; Almeida, H.A.; Rezende, R.A.; Laoui, T.; Bidanda, B. Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering. In *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications*; Springer: New York, NY, USA, 2008; pp. 149–170.
5. Bártolo, P.J.; Almeida, H.; Laoui, T. Rapid prototyping and manufacturing for tissue engineering scaffolds. *Int. J. Comput. Appl. Technol.* **2009**, *36*, 1–9. [[CrossRef](#)]
6. Dean, D.; Mott, E.; Luo, X.; Busso, M.; Wang, M.O.; Vorwald, C.; Siblani, A.; Fisher, J.P. Multiple initiators and dyes for continuous Digital Light Processing (cDLP) additive manufacture of resorbable bone tissue engineering scaffolds: A new method and new material to fabricate resorbable scaffold for bone tissue engineering via continuous Digital Light Processing. *Virtual Phys. Prototyp.* **2014**, *9*, 3–9. [[CrossRef](#)]
7. Wang, S.; Lee, J.M.; Yeong, W.Y. Smart hydrogels for 3D bioprinting. *Int. J. Bioprint.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)]
8. Wang, M.; He, J.; Liu, Y.; Li, M.; Li, D.; Jin, Z. The trend towards in vivo bioprinting. *Int. J. Bioprint.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)]
9. Lee, J.M.; Yeong, W.Y. A preliminary model of time-pressure dispensing system for bioprinting based on printing and material parameters: This paper reports a method to predict and control the width of hydrogel filament for bioprinting applications. *Virtual Phys. Prototyp.* **2015**, *10*, 3–8. [[CrossRef](#)]
10. Khoo, Z.X.; Teoh, J.E.; Liu, Y.; Chua, C.K.; Yang, S.; An, J.; Leong, K.F.; Yeong, W.Y. 3D printing of smart materials: A review on recent progresses in 4D printing. *Virtual Phys. Prototyp.* **2015**, *10*, 103–122. [[CrossRef](#)]
11. Caetano, G.; Violante, R.; Sant, A.B.; Murashima, A.B.; Domingos, M.; Gibson, A.; Bártolo, P.; Frade, M.A. Cellularized versus decellularized scaffolds for bone regeneration. *Mater. Lett.* **2016**, *182*, 318–322. [[CrossRef](#)]
12. Poh, P.S.; Huttmacher, D.W.; Holzapfel, B.M.; Solanki, A.K.; Stevens, M.M.; Woodruff, M.A. In vitro and in vivo bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds. *Acta Biomater.* **2016**, *30*, 319–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Domingos, M.; Intrantuovo, F.; Gloria, A.; Gristina, R.; Ambrosio, L.; Bártolo, P.J.; Favia, P. Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5997–6005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sousa, I.; Mendes, A.; Pereira, R.F.; Bártolo, P.J. Collagen surface modified poly (ϵ -caprolactone) scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties. *Mater. Lett.* **2014**, *134*, 263–267. [[CrossRef](#)]

15. Kuilla, T.; Bhadra, S.; Yao, D.; Kim, N.H.; Bose, S.; Lee, J.H. Recent advances in graphene based polymer composites. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1350–1375. [[CrossRef](#)]
16. Tiaw, K.S.; Goh, S.W.; Hong, M.; Wang, Z.; Lan, B.; Teoh, S.H. Laser surface modification of poly (ϵ -caprolactone) (PCL) membrane for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 763–769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yeo, A.; Wong, W.J.; Teoh, S.H. Surface modification of PCL-TCP scaffolds in rabbit calvaria defects: Evaluation of scaffold degradation profile, biomechanical properties and bone healing patterns. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *93*, 1358–1367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tan, P.S.; Teoh, S.H. Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 304–308. [[CrossRef](#)]
19. Geim, A.K.; MacDonald, A.H. Graphene: Exploring carbon flatland. *Phys. Today* **2007**, *60*, 35–41. [[CrossRef](#)]
20. Si, Y.; Samulski, T. Synthesis of water soluble graphene. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1679–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Worsley, K.A.; Ramesh, P.; Mandal, S.K.; Niyogi, S.; Itkis, M.E.; Haddon, R.C. Soluble graphene derived from graphite fluoride. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *445*, 51–56. [[CrossRef](#)]
22. Niyogi, S.; Bekyarova, E.; Itkis, M.E.; McWilliams, J.L.; Hamon, M.A.; Haddon, R.C. Solution properties of graphite and graphene. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7720–7721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liao, K.H.; Lin, Y.S.; Macosko, C.W.; Haynes, C.L. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2607–2615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, K.; Ruan, J.; Song, H.; Zhang, J.; Wo, Y.; Guo, S.; Cui, D. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhang, Y.; Ali, S.F.; Dervishi, E.; Xu, Y.; Li, Z.; Casciano, D.; Biris, A.S. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3181–3186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Park, S.Y.; Park, J.; Sim, S.H.; Sung, M.G.; Kim, K.S.; Hong, B.H.; Hong, S. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Adv. Mater.* **2011**, *23*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Li, N.; Zhang, X.; Song, Q.; Su, R.; Zhang, Q.; Kong, T.; Liu, L.; Jin, G.; Tang, M.; Cheng, G. The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9374–9382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, W.; Caetano, G.F.; Chiang, W.H.; Braz, A.L.; Blaker, J.J.; Frade, M.A.; Bartolo, P.J. Morphological, mechanical and biological assessment of PCL/pristine graphene scaffolds for bone regeneration. *Int. J. Bioprint.* **2016**, *2*. [[CrossRef](#)]
29. Llorens, E.; Calderón, S.; del Valle, L.J.; Puiggalí, J. Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *50*, 74–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Munz, M.; Glusca, C.E.; Myers-Ward, R.L.; Gaskill, D.K.; Kazakova, O. Thickness-dependent hydrophobicity of epitaxial graphene. *ACS Nano* **2015**, *9*, 8401–8411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Lee, W.C.; Lim, C.H.Y.X.; Shi, H.; Tang, L.A.L.; Wang, Y.; Lim, C.T.; Loh, K.P. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7334–7341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kim, T.M.; Lee, T.; El-Said, W.A.; Choi, J.W. Graphene-based materials for stem cell applications. *Materials* **2015**, *8*, 8674–8690. [[CrossRef](#)]
33. Wang, W.; Chiang, W.H.; Bartolo, P.J. *Design, Fabrication and Evaluation of PCL/Graphene Scaffolds for Bone Regeneration, Proceedings of the 2nd International Conference on Progress in Additive Manufacturing, Singapore, 16–19 May 2016*; Chua, C.K., Lau, G.K., Moon, S.K., Zhang, Y.L., Zhou, K., Zhou, Y.F., Eds.; Research Publishing: Singapore, 2016.
34. Caetano, G.F.; Bartolo, P.J.; Domingos, M.; Oliveira, C.C.; Leite, M.N.; Frade, M.A. Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold. *Procedia Eng.* **2015**, *110*, 59–66. [[CrossRef](#)]
35. Zhang, H.X.; Du, G.H.; Zhang, J.T. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 385–389. [[PubMed](#)]

36. Vega-Avila, E.; Pugsley, M.K. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. *Proc. West Pharmacol. Soc.* **2011**, *54*, e4. Available online: https://www.researchgate.net/profile/Elisa_Vega/publication/221712024_An_overview_of_colorimetric_assay_methods_used_to_assess_survival_or_proliferation_of_mammalian_cells/links/0a85e531f8ec28e1fd000000.pdf (accessed on 10 September 2016).
37. Parish, C.R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Boil.* **1999**, *77*, 499–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ortiz de Solorzano, C.; Malladi, R.; Lelievre, S.A.; Lockett, S.J. Segmentation of nuclei and cells using membrane related protein markers. *J. Microsc.* **2001**, *201*, 404–415. [[CrossRef](#)]

© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).