NATACHA KALLINE DE OLIVEIRA

**Desempenho de discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) funcionalizados
por células tronco de polpa dentária humana na angiogênese: ensaio em
membrana corioalantóica**

São Paulo

2020

NATACHA KALLINE DE OLIVEIRA

**Desempenho de discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) funcionalizados
por células tronco de polpa dentária humana na angiogênese: ensaio em
membrana corioalantóica**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

São Paulo

2020

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Oliveira, Natacha Kalline de.

Desempenho de discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) funcionalizados por células tronco de polpa dentária humana na angiogênese: ensaio em membrana corioalantóica / Natacha Kalline de Oliveira; orientador Maria Cristina Zindel Deboni. -- São Paulo, 2020.

109 p. : fig.; tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Células-tronco. 2. Polímeros. 3. Indutores da Angiogênese. 4. Membrana corioalantóica. I. Deboni, Maria Cristina Zindel. II. Título.

Oliveira NK. Desempenho de discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) funcionalizados por células tronco de polpa dentária humana na angiogênese: ensaio em membrana corioalantóica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 27/04/2021

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Flavia Cristina Rosin Prado

Instituição: FO da Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Marcela Charantola Rodrigues

Instituição: Universidade Municipal de São Caetano do Sul Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Daniel Isaac Sendyk

Instituição: FO da Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

Aos meus pais, Romeu e Dulci,
Meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**.

Aos **meus pais**, pelo amor, toda ajuda e apoio incondicional.

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni** Pela paciência, exemplo, ensinamentos, por acreditar em mim, pelas viagens e amizade durante todos esses anos. Não poderia ter melhor pessoa para me acompanhar nessa jornada.

À **Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem**, Agradeço pelas lições e conselhos, que sem dúvida contribuíram para a minha formação. E pela oportunidade de fazer parte da Pós Graduação em Cirurgia da FOU SP, do qual tenho muito orgulho.

À **Dra. Vera Pozzani** pelas orientações, conselhos e amizade.

À **Profa. Dra. Márcia Martins Marques** e **Profa. Dra. Luciana Correa** as quais tiveram papel importante durante a elaboração e desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcos Akira D'ávila** e sua aluna **Tais Helena Costa Salles**, por nos ter confiado a utilização da membrana de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) para a realização dos nossos trabalhos.

Ao **Prof. Dr. Renato Mazzonetto** (*in memoriam*), de quem trago boas recordações e muitos ensinamentos. Um dos incentivadores para que eu seguisse carreira acadêmica. Suas palavras me influenciaram e influenciam sempre.

Aos professores da disciplina de Cirurgia, **Prof. Dr. Marcos Vianna Gayotto** (*in memoriam*), **Profa. Dra. Emanuela Ferraz**, **Profa. Dra. Andréia Aparecida Traina Hanna**, **Prof. Dr. Fernando Melhem Elias**, **Profa. Dra. Marina Cleia Palo Prado**, **Prof. Dr. José Luiz Piratininga**, **Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz**, pela oportunidade de convivência em ambiente profissional e por todos os ensinamentos.

Aos amigos da pós-graduação, **Daniel Isaac Sendyk**, **Natália Caroline Aguiar Tartaroti**, **Vitor Pereira Rodrigues**, **Samantha Cavalcanti**, **Ricardo Pimenta D'ávila**, **Marcelo Cecchetti**, **Yuri Slusarenko da Silva**, **Alex de Freitas Rodrigues**, **Rui Sampaio**, **Ana Clara Pedroni**, **Thais Miniello**, **João Frare**, **Lilian Espínola**, **Nathália Bueno**, **Julia Lúcio**, **Matheus Barreto**, **Camila Benassi**, **Sahar Ganz Riman** pela convivência durante esses anos, amizade e pelos momentos de descontração durante nossa caminhada neste curso.

Às minhas queridas amigas, irmãs que há tempos me apoiam nessa trajetória **Marcela Charantola Rodrigues, Priscila Garcia, Larissa Moreno**. Com certeza, sem a amizade de vocês, eu não teria chegado até aqui.

À querida psicóloga, **Dra. Denise Figueiredo**, Obrigada pela ajuda nos momentos difíceis.

Aos funcionários do departamento de Cirurgia: **Aparecida Conceição de Souza, Edison Henrique Vicente, Roseli de Andrade**. E do departamento de Dentística: **Silvana e Selma Santi**. Obrigada por todo tempo despendido, dedicação e ajuda durante esse período.

Aos amigos que fiz durante meu doutorado sanduíche, **Alana Machado, Dra Viviane Conceição, Pam, Jacob, Andy e Natalie Vosberg, Camila Pacheco, Alessandro Granato, Alice e Kim Amaya, Lea Rubin, Ruben Gomez, Dra Yan Zhang, Dr Ishida Hirotake, Dr Hyeonwi Son, Dr John Shannonhose e Dr Dr. Yu Shin Kim**, Obrigada pelo acolhimento, amizade e apoio.

Ao **Dr. Nathaniel Jeske**, Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, paciência e toda experiência que obtive durante esse ano em seu laboratório.

Ao **Dr Edward Ellis** e ao **Dr Daniel Perez**, Obrigada pela oportunidade de acompanhar o serviço de residência, foi um sonho realizado poder estar no centro cirúrgico e aprender com vocês.

À “**University of Texas Health Science Center at San Antonio**” pelo aceite para a realização do meu doutorado sanduíche.

Aos **Alunos de Iniciação Científica e graduação** com os quais tive oportunidade de conviver nesse período e com quem muito aprendi e tenho aprendido.

Aos **Pacientes da FOUSP**, agradeço a confiança, sem eles com certeza não existiriam clínica, pesquisa ou sequer os cursos de graduação e pós graduação. Muito Obrigada

À **FOUSP**, em nome do **Diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha** pelo suporte tanto em infraestrutura quanto técnico durante o desenvolvimento do nosso trabalho.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que com o auxílio pesquisa (Processo 2015/15055-0) nos possibilitou recursos para a realização a pesquisa.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior, que me ofereceu uma bolsa de estudos no Brasil e pela maravilhosa oportunidade para realização de um doutorado sanduíche durante um ano nos EUA.

Ao **Laboratório de Pesquisa Básica** da FOU SP, em nome da **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, e ao **Laboratório de Patologia Experimental** em nome da **Profa. Dra. Luciana Corrêa** e **Profa. Dra. Flavia Rosin**, por todo o suporte para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao **IPEN**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, mais especificamente ao **Dr. Pablo Vasquez** do Centro de Tecnologia das Radiações – CTR, pela ajuda com a esterilização da membrana polimérica utilizada em nosso trabalho.

Ao serviço de **biblioteca da FOU SP**, mais especificamente à **Glauci Elaine Damásio Fidelis**, pela atenção e dedicação durante a normalização dessa tese.

E à **Faculdade de Odontologia de Bauru** da Universidade de São Paulo (FOB-USP), onde tudo começou.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

Oliveira NK. Desempenho de discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) funcionalizados por células tronco de polpa dentária humana na angiogênese: ensaio em membrana corioalantóica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

As terapias regenerativas abrem grandes possibilidades para as grandes reconstruções ósseas. A engenharia de biomateriais tem um papel importante nesse cenário, mais precisamente com o desenvolvimento de estruturas que forneçam um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação de células residentes ou implantadas na região receptora para a neoformação óssea. Há seis anos trabalhamos em parceria com o Departamento de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP para a caracterização biológica de um biomaterial composto por uma blenda polimérica de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano), que apresentou potencial para ser funcionalizada por células tronco de polpa dentária humana com diferenciação osteogênica. O sucesso da bioengenharia de substitutos de novos tecidos depende de rápida e adequada angiogênese para que ocorra suprimento de oxigênio e de nutrientes para a sobrevivência das células. O objetivo deste estudo foi verificar o desempenho de discos de blenda polimérica de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) funcionalizados por células tronco de polpa dentária humana no processo de vascularização por meio de um ensaio em membrana corioalantóica. Células tronco de polpa dentária humana (hDPSCs) foram cultivadas por 14 dias a partir de amostras congeladas e re-caracterizadas. Para este ensaio, utilizamos ovos de galinha fertilizados no 3º dia embrionário. Foram removidos 2mL de albumina e a confeccionada abertura nas cascas de todos os ovos. No 7º dia embrionário sobre a membrana corioalantóica (MCA) dos ovos que apresentavam sinal visível de fecundação e embrião viável, foram depositados os insertos do experimento distribuídos nos grupos: **Policlono**, onde as células cultivadas em meio clonogênico por 14 dias foram semeadas sobre discos do polímero; **Polimin**, onde as células semeadas foram cultivadas em meio mineralizante por 14 dias; **Poli** no qual foi inserido apenas o disco de polímero sem semeadura celular; **controle positivo** apenas com inserto de hDPSCs na mesma

densidade das sementeiras anteriores e **controle negativo** sem células e sem biomaterial para normatizar o padrão vascular sem intervenções. No 14º dia embrionário as aberturas nas cascas foram ampliadas e foram realizadas imagens digitais padronizadas para avaliação macroscópica da vascularização. As MCAs de todos os ovos foram removidas para análise histológica por meio de coloração por Hematoxilina-Eosina para avaliação microscópica da angiogênese. Colorações imuno-histoquímicas para anticorpos CD34 e Actina músculo liso (AML) e de imunofluorescência para Lamin-A foram utilizadas de foram representativas da presença das células endoteliais, dos vasos sanguíneos e das hDPSCs respectivamente. Os resultados mostraram que ocorreu aumento do número de vasos e intersecções e uma correspondência histológica da angiogênese na presença do conjunto poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano)/hDPSCs. Foi possível observar ainda que as células indiferenciadas pareceram estimular a angiogênese de forma mais intensa quando comparado às células diferenciadas. A blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) possui potencial de estimular a angiogênese especialmente quando funcionalizada por células tronco e desempenho promissor como biomaterial bioativo para bioengenharia nas terapias regenerativas.

Palavras-chave: Células tronco. Polímeros. Efeito angiogênico. Membrana corioalantóica.

ABSTRACT

Oliveira NK. Performance of poly ϵ -caprolactone / poly (rotaxane) disks functionalized with human dental pulp stem cells in angiogenesis: a chorioallantoic membrane assay [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Regenerative therapies open great possibilities for large bone reconstructions. Biomaterial engineering plays an important role in this scenario, more precisely with the development of structures that provide a favorable environment for the proliferation and differentiation of cells residents or implanted in a receptor region for bone neoformation. For six years, we have been working in partnership with the Materials Department of the Faculty of Mechanical Engineering of UNICAMP for the biological characterization of a biomaterial composed of a polymeric blend of poly ϵ -caprolactone/poly (rotaxane), which presented the potential to be functionalized by human dental pulp stem cells and osteogenic differentiation. The success of bioengineering of new tissue substitutes depends on rapid and adequate angiogenesis for the supply of oxygen and nutrients for cell survival. The objective of this study was to verify the performance of polymeric blend discs of poly ϵ -caprolactone/poly (rotaxane) functionalized by human dental pulp stem cells in the vascularization process by means of a chorioallantoic membrane assay. Human dental pulp stem cells (hDPSCs) were cultured for 14 days from frozen and re-characterized samples. For this trial, on the 3rd embryonic day of fertilized chicken eggs, 2mL of albumin was removed and the opening was made in the shells of all eggs. On the 7th embryonic day on the chorioallantoic membrane (MCA) of the eggs that presented visible sign of fertilization and viable embryo, the inserts of the experiment were deposited in the groups: **Polyclon-** where the cells cultivated in clonogenic medium for 14 days were sown on polymer discs; **Polimin-** where the seed cells were grown in mineralizing medium for 14 days; **Poly -** where only the polymer disc without cell sowing was inserted; **positive control** where hDPSCs were inserted the same density of the previous groups and, **negative control-** without cells or biomaterial, to standardize the vascular pattern without interventions. On the 14th embryonic day, the openings in the barks were enlarged and

standardized digital images were performed for macroscopic evaluation of vascularization. The MCAs of all eggs were removed for histological analysis by hematoxylin-eosin staining for microscopic evaluation of angiogenesis. Immunohistochemical staining for CD34 and Actin smooth muscle (AML) and immunofluorescence for Lamin-A antibodies were used to be representative of the presence of endothelial cells, blood vessels and hDPSCs, respectively. The results showed that there was an increase in the number of vessels and intersections and a histological correspondence of angiogenesis in the presence of the poly ϵ -caprolactone/poly (rotaxane)/hDPSCs. It was also possible to observe that the undifferentiated cells seemed to stimulate angiogenesis more intensely when compared to the differentiated cells. The blend of poly ϵ -caprolactone/poly (rotaxane) have the potential to stimulate angiogenesis especially when functionalized by stem cells and shows a promising performance as bioactive biomaterial for bioengineering in regenerative therapies.

Keywords: Stem cells. Polymers. Angiogenesis Effect. Chorioallantoic Membrane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Linha do tempo	47
Figura 4.2 - Abertura dos ovos.....	47
Figura 4.3 - Padronização da região de contagem macroscópica dos vasos em ovo grupo Controle Negativo (A) e detalhe da área circular para contagem dos vasos periféricos(B)	48
Figura 4.4 - Método de contagem das estruturas vasculares na avaliação macroscópica no programa ImageJ – ferramenta “multipoint”	49
Figura 4.5 - Corte histológico representativo da MCA apresentando as três principais camadas o ectoderme (ec) o mesoderme (m) e o epitélio corioalantóico (ea). Ilustração sobreposta representativa da interface do programa ImageJ com o método de calibração de escala de pixels (a) para μm^2 (b).	51
Figura 4.6 - Delineamento do contorno do vaso ferramenta “freehand” para mensurar a área da luz vascular	52
Figura 4.7 - Traçado para mensurar o diâmetro ferramenta “straight segmented” ...	52
Figura 5.1 - Vascularização na MCA (E14) em diferentes grupos (macroscópica) após 7 dias de implantação (A) PoliClono; (B) PoliMin; (C) Poli; (D) Controle Positivo e (E) Controle Negativo	56
Figura 5.2 - Vascularização periférica aos discos e no controle após 7 dias de implantação na MCA (E14) em diferentes grupos (macroscópico detalhe). As setas indicam as interseções vasculares na periferia dos discos e controle (A) PoliClono; (B) PoliMin; (C) Poli; (D) Controle Positivo. Em (E) Controle Negativo – vascularização natural da MCA sem intervenção. Vasos mais finos sem alças ou dobramentos. Em (F) MCA removida do ovo exibindo intensa vascularização envolvendo o disco do polímero.....	57
Figura 5.3 - Representação gráfica da distribuição das médias da contagem de estruturas vasculares: pequenos e médios vasos e interseções	

vasculares na avaliação macroscópica em todos os grupos experimentais e controles	59
Figura 5.4 - Representação gráfica da distribuição das médias da contagem das interseções vasculares na avaliação macroscópica na periferia dos discos e do controle positivo	59
Figura 5.5 - Cortes histológicos representativos da MCA nos grupos experimentais após 7 dias de implantação dos discos (a) PoliCLono, (b) PoliMin, (c) Poli e (d) das células hDPSCs (controle positivo). As setas identificam no mesoderme as aberturas vasculares de diferentes diâmetros exibindo hemácias nucleadas comuns do embrião. Coloração Hematoxilina eosina.....	61
Figura 5.6 - Representação gráfica dos dados da contagem de vasos na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo.....	62
Figura 5.7 - Representação gráfica do diâmetro médio dos vasos na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo.....	63
Figura 5.8 - Representação gráfica da média de vasos de menor calibre na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo..	63
Figura 5.9 - Representação gráfica da média de vasos de maior calibre na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo.....	65
Figura 5.10 - Representação gráfica dos dados de área das aberturas vasculares nos grupos experimentais e no controle positivo.....	66
Figura 5.11 - Imagem representativa da expressão em imunofluorescência do anticorpo lamin-A em verde evidenciando as estruturas nucleares das hDPSCs no grupo controle positivo em (a) aumento original 100x e (b) aumento original 400x. Em (c) detalhe do corte histológico da MCA com expressão positiva em parede vascular para o anticorpo actina músculo liso (AML) aumento original 400X. Em (d) detalhe do corte histológico da MCA com expressão positiva para células endoteliais para o anticorpo transmembrana CD34.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Características dos anticorpos utilizados na imuno-histoquímica e imunofluorescência	54
Tabela 5.1 - Dados descritivos da contagem de estruturas vasculares na avaliação macroscópica	58
Tabela 5.2- Dados descritivos da contagem de intersecções vasculares na periferia dos discos e no controle positivo na avaliação macroscópica	60
Tabela 5.3- Dados descritivos da contagem de estruturas vasculares maiores e menores na avaliação microscópica	64
Tabela 5.4- Dados descritivos para os valores da área de aberturas vasculares (μm^2)	65
Tabela 5.5- Dados descritivos dos dados de aferição de diâmetros	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3RS	Do inglês, Replacement, Reduction, and Refinement
AA2P	L-ascorbic acid 2-phosphate
BM-MSC	Do inglês “ <i>bone marrow-mesenchymal stem cell</i> ”
BMP2	Do inglês “ <i>Bone morphogenetic protein 2</i> ”
CD	Cluster de diferenciação
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso dos Animais
Cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Do inglês “ <i>Dimethyl Sulfoxide</i> ”
DPSC	Do inglês “ <i>dental pulp stem cell</i> ”
FDA	Do ingles “ <i>food and drug association</i> ”
FGF-2	Do ingles “ <i>Fibroblast growth factor-2</i> ”
FOUSP	Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo
hMSC	do inglês “ <i>human mesenchymal stem cell</i> ”
I-309	Quimiocina inflamatória humana
ICC	Correlação interclasse
MCA	Membrana corioalantóica
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
MSC	Do inglês “ <i>mesenchymal stem cell</i> ”
PBS	Do inglês “phosphate buffered saline”
PCL	Poli ε-caprolactona
PDLLA	Poly(D,L-Lactic Acid)
PGA	Poly(glycolic acid)
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
pHMGCL	Poly (hydroximethylglicolido-co-ε-caprolactone)
PLA	Do inglês “Polylactic acid”
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)

PLLA	Poly (L-Lactic acid)
q-PCR	Do inglês " <i>Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction</i> "
RT-qPCR	Do inglês " <i>Real time - Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction</i> "
SDF-1 α	do inglês " <i>Stromal Cell Derived Factor-1 alpha</i> "
SMA	Do ingles "smooth muscle Actin"
UNICAMP	Universidade estadual de Campinas
VEGF	Do inglês " <i>vascular endothelial growth factor</i> "
Xg	Indica que a força centrífuga aplicada é x vezes a força gravitacional da Terra.
α - MEM	Alpha Minimum Essential Medium
μ m	Micrometros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISTA DE LITERATURA	27
2.1	ARCABOUÇOS DE POLÍMEROS E AS TERAPIAS REGENERATIVAS EM TECIDO ÓSSEO	29
2.2	ANGIOGÊNESE E SEU PAPEL NA TERAPIA REGENERATIVA DE TECIDO ÓSSEO	32
2.3	ENSAIO EM MEMBRANA CORIOALANTÓICA	34
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	CULTIVO CELULAR	43
4.2	PREPARO DO SCAFFOLD E GRUPOS EXPERIMENTAIS	45
4.3	ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA	46
4.3.1	Angiogênese – análise macroscópica	48
4.3.2	Angiogênese – análise microscópica	49
4.3.3	Imuno-histoquímica e imunofluorescência	53
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	55
5.1	ANGIOGÊNESE – ANÁLISE MACROSCÓPICA	55
5.2	ANGIOGÊNESE – ANÁLISE MICROSCÓPICA	60
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea bucomaxilofacial tem evoluído progressivamente graças a terapias regenerativas, que utiliza a engenharia de biomateriais, a biologia celular e os fatores de crescimento celular para a produção de um novo tecido. Estas terapias poderão tornar reconstruções teciduais extensas até então desafiadoras cada vez mais viáveis, e com resultados mais previsíveis no futuro.

A engenharia de biomateriais, mais precisamente a construção de estruturas orgânicas ou inorgânicas desempenha parte importante na tríade das terapias regenerativas ósseas, pois fornece um ambiente favorável para a migração, proliferação e diferenciação de células residentes ou externas à região receptora para regeneração de um futuro tecido ósseo (1).

Biomateriais reabsorvíveis naturais e sintéticos tem sido desenvolvido com o propósito de promover a regeneração de tecidos e facilitarem a implantação de fatores de crescimento, substâncias e de células em feridas e regiões de grandes defeitos teciduais para que o reparo tecidual possa ocorrer preferencialmente por regeneração tecidual (2).

O tecido ósseo nas grandes perdas tem sua capacidade regenerativa reduzida e muitas vezes procedimentos de enxertia são necessários para que ocorra a neoformação óssea total do defeito. Os enxertos de ossos autógenos e a utilização de seus substitutos alógenos ou xenógenos tem sido a prática mais comum na reconstrução de tecido ósseo. Esses procedimentos têm muitas desvantagens quanto a sua captação, manutenção e preservação no leito receptor.

Assim, substitutos que envolvam a bioengenharia de tecidos têm sido um dos focos mais inovadores nas pesquisas em regeneração tecidual. Há seis anos trabalhamos em parceria com o Departamento de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP para a caracterização biológica de um biomaterial composto por uma blenda polimérica de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano). Os resultados in vitro mostraram que a blenda não é citotóxica para fibroblastos murinos (3). Além disso, recentemente esta blenda apresentou potencial para ser funcionalizada por células tronco de polpa dentária humana que são capazes de se aderir, proliferar e diferenciar e que de alguma forma o biomaterial parece auxiliar no processo de diferenciação osteogênica das células tronco derivadas de polpa dentária humana (4).

O sucesso da bioengenharia de substitutos de novos tecidos e órgãos depende de rápida e adequada angiogênese para que ocorra suprimento de oxigênio e de nutrientes para a sobrevivência das células, sua adesão e diferenciação no biomaterial funcionalizado por prazo adequado para o desempenho deste conjunto biomaterial, células e fatores de crescimento na regeneração de um novo tecido em um sítio receptor vivo.

Como mais uma fase na caracterização dessa blenda polimérica de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) propusemos a verificar o desempenho de discos desse biomaterial funcionalizados por células tronco de polpa dentária humana no processo de vascularização por meio de um ensaio de membrana corioalantóica.

2 REVISTA DE LITERATURA

Como apresentamos, três estratégias devem ser adotadas para a criação de um novo tecido utilizando-se terapias regenerativas: a presença das células ou substituto celular, que serão manipulados para funções específicas, em particular as células tronco mesenquimais humana (hMSC), os fatores de crescimento, que darão o estímulo a essas células, e o andaime ou arcabouço como suporte aloplástico ou orgânico que possa dar sustentação para a transferência de células na formação de um novo tecido (5).

As células tronco apresentam as melhores características biológicas para a regeneração dos tecidos. São células indiferenciadas, com características particulares de diferenciação em diversos tipos tecidos. Está claro na literatura que o caminho da diferenciação é dependente do estímulo aplicado e das condições favoráveis no microambiente de cultivo, além do potencial de auto renovação, ou seja, a proliferação celular (6, 7). Muitas são as origens das células tronco para funcionalização de biomateriais podendo ser provenientes da medula óssea, de tecidos constituintes e de suporte de dentes humanos. Aquelas que provêm de tecidos dentários são obtidas de forma relativamente simples e tem mostrado um alto potencial de diferenciação (4, 8).

Quanto aos biomateriais, existe uma grande variabilidade de composições e de estruturas físico-químicas com o propósito de funcionalização biológica. Dentre os arcabouços inorgânicos, podemos destacar as biocerâmicas, como a hidroxiapatita e fosfato de cálcio, com resultados relevantes na literatura (9-11). São utilizados particularmente quando não certa resistência mecânica, mas uma degradação rápida (12). Em outros trabalhos o comportamento biológico quanto a regeneração óssea de cimento bifásico composto por sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico foi avaliada *in vivo*, e mostrou resultados muito próximos do grupo controle na tentativa de regeneração de defeito ósseo crítico em calvária (9, 13).

Os polímeros tanto naturais quando sintéticos figuram o grupo orgânico, o qual tem sido amplamente utilizado para a regeneração óssea, o tipo de polímero, ou a mistura deles é selecionado, dependendo do objetivo que se deseja alcançar (2, 4). Independentemente do tipo de biomaterial, existem propriedades físico-químicas e propriedades biológicas importantes a se considerar com o objetivo de substituir um tecido perdido ou lesionado, sendo elas: geometria externa, propriedades

mecânicas, grau de absorção, porosidade e a biocompatibilidade (14), propriedades que serão exploradas abaixo separadamente.

A geometria do biomaterial deve se compatível com o tecido, o qual será substituído, de forma a reproduzir/imitar a matriz extracelular, tanto macro quanto nano estruturalmente, fornecendo a sustentação e a resistência necessária. A configuração do biomaterial pode melhorar a infiltração e crescimento celular, além de influenciar os fatores de crescimento presentes na área receptora (15, 16).

Uma das principais nanoestruturas do scaffold são os poros. Trabalhos anteriores mostraram que a porosidade tem influência na adesão, crescimento, interação, sinalização celular, transporte de nutrientes e na vascularização (17-19). O desenvolvimento de novos vasos é essencial para a formação de um novo tecido, assim sendo, o tamanho, distribuição, formato, volume e a interconectividade dos poros devem ser considerados para a produção de um novo scaffold. Em revisão sistemática, na qual, foi avaliada a influência da porosidade para proliferação celular e diferenciação osteogênica, foi encontrada uma grande variação entre os tamanhos e a quantidade dos poros, os poros entre 50 e 224µm de diâmetro e na quantidade de 72 a 93% do scaffold mostraram os melhores resultados. Dentre os artigos, não houve uma padronização na metodologia para avaliação da porosidade dos biomateriais. Mas, na maioria dos estudos a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada como forma de avaliar outras características além dos poros (2).

Da mesma forma, as propriedades mecânicas devem ter características iguais ou semelhantes ao tecido que vai ser substituído, portanto, em tecido ósseo, o scaffold precisa suportar grandes cargas externas. Considerando um biomaterial para reconstrução da cavidade oral, por exemplo, precisará suportar cargas mastigatórias. Já, o scaffold utilizado para substituição de tecido mole, como tendões, ligamentos ou músculos, também precisarão apresentar características inerentes ao tecido lesionado, mas, nestes casos, o módulo de elasticidade do biomaterial será uma característica mais importante (20).

Independente do tipo de tecido que será repostado, será preciso se estabelecer o grau de absorção. Quando o biomaterial não é absorvível ele permanece biologicamente estável, fornecendo suporte permanente, o que dependendo do objetivo final, pode ser necessário; encontramos essa possibilidade principalmente na medicina, mais especificamente na ortopedia, com a substituição de grandes articulações (21, 22). No caso de um biomaterial absorvível, será preciso determinar

o grau e o tempo de absorção, novamente, essa característica será estabelecida de acordo com o tecido que se deseja substituir e com os resultados que se deseja alcançar. A degradação pode ocorrer de forma física, química, ou através de processos biológicos. No caso dos polímeros, envolve a quebra de ligações hidrolíticas ou enzimáticas específicas. Portanto, a degradação depende das propriedades do polímero, como estrutura química, ligações hidrolíticas instáveis, nível de hidrofiliidade ou hidrofobicidade, estrutura morfológica, proporção de copolímero ou peso molecular. O polímero tem, portanto, sua estrutura interna quebrada, assim, perde massa molecular, o que vai propiciar sua absorção (1).

Os polímeros sintéticos, uma das classes de biomateriais mais estudadas, têm sido objeto crescente de pesquisas especialmente quanto às suas propriedades biológicas. A escolha do material para “scaffold” adequado deve considerar várias características entre elas a sua adaptação ao leito receptor, necessidade ou não de resistência mecânica e a resposta biológica celular. A literatura classifica os “scaffolds”: como não absorvíveis e absorvíveis, sendo que os absorvíveis podem ser naturais, sintéticos ou híbridos (23, 24) e teriam vantagem sobre os não absorvíveis uma vez que a medida que reabsorvem irão dando lugar ao novo tecido. Os *scaffolds* naturais apresentam vantagens sobre os sintéticos devido a presença de sinais de reconhecimento celular, pois a maioria deles apresentam componentes semelhantes aos do tecido que será regenerado (25). Os biomateriais sintéticos, por sua vez, oferecem propriedades mecânicas mais satisfatórias e mais controláveis que os naturais.

2.1 Arcabouços de polímeros e as terapias regenerativas em tecido ósseo

Dentre os principais polímeros biodegradáveis e bioreabsorvíveis encontram-se os poliésteres alifáticos sintéticos como o poly (L-Lactic acid) (PLLA), o poly (ϵ -caprolatona) (PCL), o poly (glycolic acid) (PGA) e seus compostos (26). Quando exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o polímero sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se por meio da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros, ou monômeros, solúveis e não tóxicos. A degradação acontece então por processos biologicamente ativos ou pela clivagem hidrolítica passiva (27-29). Polímeros

sintéticos apresentam como vantagem o custo reduzido, a reprodutibilidade e facilidade na funcionalização por células (18, 24, 30). Como desvantagem, podemos destacar maior resposta imune, quando comparamos a um polímero natural.

Notavelmente, o uso de poli- ϵ -caprolactona (PCL) para engenharia de tecidos aumentou significativamente ao longo da última década. O PCL é um dos principais polímeros sintéticos, ele é composto por poli ϵ caprolactona (31). Tem sido amplamente utilizado na engenharia tecidual, além de ser considerado um material versátil, ele apresenta baixo custo, é estável e biocompatível (6, 26, 32). Apresenta degradação lenta, boas propriedades mecânicas e ambiente físico-químico favorável para vários tipos celulares, principalmente para células tronco mesenquimais de origem humana (hMSC) (24, 31). O PCL já foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para a utilização em humanos (33). É um poliéster alifático, cuja hidrólise conduz ao ácido capróico de baixa concentração, consequentemente esse material não tem a tendência a causar reações tóxicas ao tecido circundante (5).

Em associação com o polímero natural quitosana, o PCL mostrou-se uma boa alternativa para o cultivo de células tronco mesenquimais, com o propósito de regeneração óssea em animais (17). Este material também foi utilizado na confecção de scaffolds em diferentes formatos e apresentou resultados satisfatórios em conjunto com células tronco mesenquimais humanas, nesse estudo o scaffold foi sintetizado através de impressão biocelular, nesse processo, foi possível controlar geometria externa e porosidade. Independente da característica tridimensional do material, todos os formatos foram biocompatíveis para o cultivo celular (34).

Outro estudo comparou o PCL com poli (hydroximetilglicolico-co- ϵ -caprolactone) (pHMGCL), ambos scaffolds foram confeccionados por prototipagem. A adesão celular foi maior no pHMGCL, portanto a atividade metabólica também foi maior no pHMGCL. Como também demonstrado em outros trabalhos, acreditou-se que a associação de outros componentes com o PCL, ajuda a diminuir sua hidrofobicidade, permitindo maior interconectividade entre os poros e consequentemente entre as células (35), melhorando o microambiente para adesão e proliferação celular (32, 36).

O ácido poli-láctico (PLA) também é amplamente utilizado como scaffold com o propósito de regeneração óssea. É considerado biocompatível, favorecendo proliferação e diferenciação celular. O PLA foi encontrado em diferentes combinações, como por exemplo, o poli(L- láctico) (PLLA), poli(D,L-lactido)(PDLLA) e o compósito de PLA+PGA denominado de poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Nos últimos anos, o PLA foi utilizado junto com o polímero natural quitosana e vidro bioativo como scaffold para regeneração de tecido cartilaginoso a partir da diferenciação de células tronco de origem adiposa (37, 38).

O PLLA também foi utilizado em conjunto com PCL para formação de um scaffold nanofibroso. O estudo utilizou diferentes proporções de PLLA/PCL para o cultivo de células tronco humana de origem adiposa. Os testes de proliferação, adesão, viabilidade e diferenciação mostraram que a proporção de 1/1 apresentou os melhores resultados, sendo biocompatível o suficiente para repor a matriz extracelular (26).

O PLGA apresenta boas propriedades mecânicas e fácil processamento, mas, como o PCL possui superfície hidrofóbica o que consequentemente prejudica a interação com a matriz celular tornando necessária a associação com outro material para diminuir essa característica; a hidroxiapatita foi um dos materiais mais associados ao PLGA (31, 39).

Compostos híbridos de microesferas de PHBV 9 poli (b-hidroxibutirato-co-b-hidroxivalerato) em matriz de PLGA foi sintetizado com o propósito de regeneração óssea. Os scaffolds foram empregados para adesão e proliferação de hMSCs do inglês "*human mesenchymal stem cell*", e mesmo em diferentes proporções de PLGA/ PHBV, a viabilidade celular foi possível (16).

Outro polímero bastante utilizado em associação com outros materiais é o rotaxano, ele possui uma arquitetura supramolecular única. Os polirotaxanos e poli pseudorotaxanos são polímeros com múltiplas moléculas cíclicas que circundam uma cadeia de eixos (40). Os sistemas macromoleculares podem ser controlados por "interruptores de rotaxano", dessa forma, as transformações estruturais dos polímeros, como linear, cíclico ou estrelar, podem ser obtidas usando essas ligações. Esse sistema dinâmico é interessante para projetar uma infinidade moléculas (41).

Alguns estudos exploraram o papel do rotaxano em relação as propriedades mecânicas e mostraram que o rotaxano em uma combinação específica pode atuar

acelerando a dissociação de ligações covalentes, ou seja, a mesma ligação de rotaxano que proporciona absorção de choque em um polímero de pequena extensão, pode conduzir à característica negativa quando o polímero é de grande extensão, como acúmulo de tensão e estresse de torsão, deixando o biomaterial mais vulnerável (42). A presença do rotaxano mostrou-se estável quando combinado unidades cíclicas conectadas por meio de interações não covalentes (43).

Blendas poliméricas nano-particuladas de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) surgiram como um novo biomaterial para a confecção de “*scaffolds*”. O polirotaxano é um polímero a base de ciclodextrina que pode ser adicionado ao PCL para aumentar a hidrofiliabilidade e assim controlar a biodegradação do polímero (3).

O potencial biológico de uma blenda contendo o PCL e rotaxano foi estudada e o comportamento desse biomaterial frente à morfologia, adesão, proliferação e diferenciação de células tronco de polpa dentária humana em células osteogênicas foi demonstrado. Os resultados foram animadores neste caso, tanto biologicamente quando em relação às características mecânicas, o que confirma a importância da cuidadosa combinação que deve ser feita entre os polímeros (4).

A caracterização biológica para o uso futuro como material bioativo do dessa blenda polimérica com a presença do rotaxano deve passar por várias etapas, sendo que uma delas a análise do desempenho do biomaterial em um ambiente que simule situações clínicas para o processo de neoformação tecidual.

2.2 Angiogênese e seu papel na terapia regenerativa de tecido ósseo

O osso é um tecido altamente vascularizado e dinâmico, ou seja, está em constante remodelação, a estabilidade estrutural e o equilíbrio de cálcio são seus principais objetivos. O tecido ósseo apresenta uma alta capacidade de reparação quando se trata de defeitos pequenos, mas, no caso de defeitos ósseos críticos, o reparo é prejudicado e os processos endógenos não são capazes de realizar a total reparação, nesse momento há a necessidade de uma terapia externa. A formação de uma rede vascular é um dos fatores mais importantes para o sucesso da consolidação óssea, melhorando consideravelmente a resposta regenerativa. No processo de angiogênese as células endoteliais proliferam, migram, e formam condutos, por onde o sangue flui fornecendo oxigênio, nutrição, fatores de

crescimento e hormônios durante a formação e desenvolvimento de um novo tecido. De forma geral, a ossificação ocorre através de uma relação angiogênese-osteogênese (44, 45).

Muitos estudos confirmam a relação entre suprimento sanguíneo e a densidade óssea, como por exemplo, trabalhos realizados com paciente portadores de osteoporose, que demonstrou a ativação da angiogênese como forma de prevenção da doença óssea (46-48). Outro estudo foi realizado para revisar novas estratégias utilizando engenharia de biomateriais em estudos *in vivo* para induzir a vascularização para regeneração em defeitos ósseos, a abordagem mais encontrada foi a associação aos fatores de crescimento, os principais foram VEGF do inglês "*Vascular endothelial growth factor*" e BMP2 do inglês "*Bone morphogenetic protein*", que foram explorados para aumentar o início precoce da invasão vascular (49).

Ao longo do tempo, estudiosos buscam se aprofundar nos conhecimentos sobre a vascularização, a osteogênese e mais atualmente, estudos com o propósito de determinar a influência de biomateriais no processo de angiogênese. Em 2018, Nowak-Sliwinska e colaboradores (50) desenvolveram diretrizes para a utilização e interpretação de mais de uma dezena de ensaios diferentes *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, ou seja, o estudo apresenta orientações de como e quando utilizar o melhor ensaio para diferentes tecidos e condições no processo da vascularização. Células tronco mesenquimais demonstraram às células endoteliais e geraram estruturas semelhantes a capilares quando cultivadas em meios específicos e associado à fatores de crescimento (51, 52). Seebach e colaboradores mostraram o potencial de células tronco de se diferenciarem em células semelhantes as células endógenas. Outro estudo mostrou a capacidade das células tronco de funcionar como recruta de células endoteliais endógenas para iniciar o reparo vascular (53).

Outros estudos demonstraram a relação de sinergia entre células tronco mesenquimais diferenciadas em células osteogênicas e células endoteliais angiogênicas, quando em contato, mostraram resultados positivos para fosfatase alcalina, um marcador precoce para diferenciação osteogênica e a expressão de BMP2, sobre scaffold de fosfato de cálcio. As células endoteliais beneficiam a proliferação de células osteoblásticas e diminuem a quantidade de proteínas envolvidas no processo de apoptose quando cultivadas em co-cultura (54, 55).

De Cara e colaboradores (56) mostraram as propriedades angiogênicas de células tronco derivadas de polpa dentária, elas foram capazes liberar fatores de crescimento vasculares e produzir tecido conjuntivo vascularizado em um modelo ortotópico de regeneração pulpar em roedores. Zhu e colaboradores (57) estudaram a regeneração de polpas dentárias com a utilização de DPSC, após imuno-histoquímica, observou-se que as células no tecido regenerado foram positivas para marcadores de células humanas, sugerindo que houve diferenciação de DPSC em células endoteliais. Os dados mostraram que as DPSCs modificadas pelo gene VEGF e pelo gene SDF-1 α expressaram significativamente níveis mais elevados das respectivas proteínas e, dessa forma, aumentou a proliferação, migração e capacidade angiogênica das DPSCs.

Em outro estudo, o ensaio de imuno-histoquímica da polpa dentária *in situ* foi realizado e revelou a presença de VEGF e MCP-1, que não foi encontrado em ensaios *in vitro*. As células-tronco transplantadas funcionam por dois mecanismos distintos: pela secreção de fatores angiogênicos que induzem angiogênese de células endoteliais do hospedeiro (efeito parácrino) e por diferenciação em células endoteliais, incorporando ativamente nas paredes dos vasos sanguíneos (58).

Contudo, podemos observar que as DPSCs, tem um grande potencial clínico para engenharia de tecidos e para outras áreas da medicina. O potencial pró angiogênico com a utilização de células autógenas pode ser uma opção de tratamento emergente para patologias associadas à vascularização insuficiente, como por exemplo, nos casos de pacientes com feridas crônicas, acidente vascular cerebral e até enfartes do miocárdio (59).

2.3 Ensaio em membrana corioalantóica

Na embriologia das aves, as camadas do alantoide e córion, são responsáveis pela nutrição e trocas gasosas do embrião com o meio externo, essas camadas se unem para formar a membrana corioalantóica (MCA). Ao se expandir, a MCA gera uma intensa rede vascular. Por essas características o ensaio em membrana corioalantóica do ovo de galinha tem sido amplamente utilizado (60).

Em 2000, Bernardini e colaboradores (61) utilizaram esse ensaio para avaliar a capacidade *in vivo* do efeito angiogênico da quimiocina I-309 em esponja de fibrina

sobre a membrana corioalantóica no oitavo dia embrionário, PBS e FGF-2 foram usados como controles. No décimo segundo dia embrionário foi possível observar capilares ao redor do implante na presença de I-309 e FGF-2, enquanto nenhuma reação vascular foi observada ao redor da fibrina com PBS.

Outro estudo avaliou o motivo da falha *in vivo* dos sensores de glicose que podiam estar relacionados à inflamação e fibrose dos vasos no local de implantação, avaliar se o aumento de densidade poderia melhorar o problema com os sensores, então, células geneticamente modificadas para expressar o fator de crescimento de células endoteliais vasculares foram incorporadas em um modelo de sensor sobre a membrana corioalantóica e mantidas até o décimo oitavo dia embrionário, esse ensaio mostrou-se eficiente para comprovar que a neovascularização aumentou a eficiência do sensor (62).

Esse ensaio também foi utilizado para avaliar diferentes polímeros, Poli (p-dioxanone) e poli (ϵ -caprolactone), homopolímeros foram usados como controle, para tal, o ovo foi aberto e os materiais implantados no oitavo dia embrionário, a indução significativa de macro e micro vasos foi significativa no grupo Poli (p-dioxanone) (63).

Estruturas em biovidro com revestimento de colágeno foi utilizado para semear células tronco derivada de tecido adiposo humano e fibroblastos humanos. As amostras foram colocadas na membrana corioalantóica no sétimo dia embrionário. As imagens digitais foram realizadas no décimo dia embrionário, as bifurcações e interconexões dos vasos foram contadas utilizando o software ImageJ. As células tronco juntamente com o biomaterial se mostraram muito mais eficiente quando comparado aos fibroblastos em relação à angiogênese (64).

Estruturas de ácido poli-L-láctico eletrofiado imersas em VEGF funcionalizadas ou não com heparina foram implantadas na membrana corioalantóica no oitavo dia embrionário. Após 14 dias imagens macroscópicas foram realizadas e em seguida o biomaterial foi removido, fixado e analisado histologicamente, foi possível observar que os vasos cresceram em direção ao biomaterial funcionalizado, a marcação por anticorpo CD31, marcador de células endoteliais, mostrou a infiltração dos vasos no biomaterial (65). Woloszyk e colaboradores (66) utilizaram ensaio de MCA para mostrar que fibroblastos gengivais humanos e células tronco de polpa dentária humana foram igualmente capazes de atrair vasos sanguíneos para o interior de arcabouços confeccionados com fios de seda.

Nanopartículas de dióxido de titânio de três tipos diferentes: nanopartículas utilizadas na indústria alimentícia, em correias para tratamento de água contaminada e utilizadas em cosméticos colocados em soro fetal bovino e solução salina, foram testadas sobre MCA quanto à citotoxicidade. Não houve diferença significativa dos vasos ou morte do embrião na presença das nanopartículas (67).

PLLA em conjunto com VEGF do inglês "*Vascular endothelial growth fator*" e AA2P do inglês "*L-ascorbic acid 2-phosphate*" com objetivo de regeneração óssea e aumento do desenvolvimento vascular, foi testado sobre MCA, após 14 dias embrionários, a estrutura estava totalmente integrada com a membrana, com formação de novos vasos totalmente visíveis (68).

A fotobiomodulação foi aplicada durante ensaios de MCA sobre xenoenxerto de pele humana para avaliação da proliferação de células endoteliais. A irradiação laser mostrou forte indicativo de estímulo a angiogênese (69).

A MCA oferece uma possibilidade mais orgânica quando comparada aos estudos *in vitro*, e financeiramente mais acessível (70-72). O ensaio em MCA tem sido largamente utilizado, por exemplo, há muitos anos para testes relacionados à terapia anti-fator de crescimento endotelial vascular aplicada a tumores malignos, para verificar as respostas locais e sistêmicas da radioterapia, quimioterapia e metástase, com o objetivo de entender melhor os sucessos e insucessos desses tipos de tratamento.

Dentre as vantagens do ensaio de MCA, destacamos a disponibilidade, facilidade de visualização e acompanhamento do embrião, rapidez de resultados, custo acessível, viável para quase todos os tipos de amostras, além de ser um teste confiável pela quantidade de estudos já realizados (69, 70, 73, 74). O protocolo experimental varia de acordo com o propósito, mas todos envolvem a inserção de um biomaterial sobre a membrana corioalantóica ou a injeção intravenosa na vascularização do embrião (75).

Apesar de simples, o método é bastante delicado, a abertura realizada quando o experimento é *in ovo* deve ser cuidadoso, pois os detritos da casca na MCA podem ser difíceis de remover e podem prejudicar a análise e influenciar no resultado, assim como a maneira de inserir o biomaterial, que pode ser superficial. O momento de implantação deve ser escolhido de acordo com o objetivo da pesquisa, que está relacionado principalmente ao crescimento dos vasos, acontece de forma exponencial entre o quinto e nono dia embrionário (72).

A posição do biomaterial na MCA é importante, pois, de acordo com a literatura, a inserção perto de grandes ou pequenos vasos pode gerar resultados diferentes e/ou análises diferentes. Nas áreas entre grandes vasos a avaliação de eventos angiogênicos é mais objetiva, pois a região é menos vascularizada. Como o sistema imunológico ainda não está desenvolvido, a interação entre o mesoderme em desenvolvimento imaturo fornece um microambiente adequado para a sobrevivência, desenvolvimento e aquisição de vasos pelos implantes a serem testados (50).

As amostras podem ser analisadas por uma infinidade de testes, de forma química ou histológica ou por meio de imagens digitais. Os estudos mostram análises de expressão gênica (q-PCR), quantificação de proteínas, microarquitetura vascular por microtomografias com ou sem contraste, radiografias e até monitoramento das células implantadas (50, 76).

Outro aspecto importante da utilização de ensaios de MCA está relacionado à aderência dos princípios dos 3Rs (do inglês, Replacement, Reduction, and Refinement) em experimentação animal. A iniciativa dos 3Rs foi desenvolvida há mais de 50 anos, para que a realização de pesquisas animais se tornassem mais humanas (77). Neste caso a pesquisa com a membrana corioalantóica tem um grande potencial, obviamente, o ensaio *in vivo* não poderá ser totalmente evitado para testes mais específicos, mas a quantidade de animais utilizados será reduzida. Além disso, a iniciativa 3Rs possibilitou a implantação e suas atualizações dos guias de reporte de métodos e da apresentação de resultados de pesquisas utilizando animais mostrando maior transparência, integridade, confiabilidade e reprodutibilidade dos estudos científicos (78).

Como justificativa, alguns autores afirmam que o embrião da galinha não é considerado um animal até o seu 17º dia de desenvolvimento, sendo, portanto, isenta a avaliação do comitê de ética antes desse período (60).

Baiguera e colaboradores (79) comentaram após uma extensa revisão que o ensaio de membrana corioalantóica é um dos mais utilizados para se determinar as respostas angiogênicas de biomateriais. Os autores salientam que este tipo de experimento permite uma avaliação rápida, simples e de custo reduzido do potencial angiogênico e como um estágio intermediário entre o estudo *in vitro* e o estudo em um modelo animal que pode permitir ajustes de manufatura antes da sua aplicação em estudos *in vivo*.

Existe a dificuldade de distinção entre a neovascularização e uma densidade vascular falsamente aumentada devido ao rearranjo dos vasos existentes. Portanto é importante observar o momento da resposta angiogênica. Além disso, a MCA é extremamente sensível à modificação por fatores ambientais, como mudanças na tensão de oxigênio, que tornam crítica a vedação da abertura na casca, pH, osmolaridade e quantidade de queratinização. Outra desvantagem se deve ao baixo número de reagentes compatíveis com as espécies aviárias incluindo, anticorpos, citocinas e iniciadores (“*Primers*”) (80).

Estudos demonstraram que as DPSCs expressam muitos fatores pró angiogênicos, de forma parácrina, que podem promover a migração de células endoteliais *in vitro*, formação de tubos, angiogênese *in vivo* e regeneração de tecidos (59, 81). De acordo com os resultados da quimiotaxia de células endoteliais, meio condicionado derivado de BM-MSCs foi capaz de melhorar a angiogênese *in vivo*, enquanto meio condicionado de DPSCs não teve efeito na formação de vasos sanguíneos no ensaio MCA nas condições testadas. A aplicação direta de ambas as células-tronco já demonstrou estimular a neovascularização *in ovo* em outros trabalhos (58, 82, 83). Além disso, resultados semelhantes foram observados para meio condicionado derivado de BM-MSC humano e de camundongo [8,56]. Esses dados sugerem que a produção contínua de fatores angiogênicos por DPSCs é necessária para seu potencial angiogênico *in ovo*, que pode ser causado pela meia-vida restrita dos fatores de crescimento presentes em seu meio condicionado. A importância desses mediadores parácrinos solúveis também é enfatizada pelo fato de que vesículas extracelulares derivadas de DPSC e BM-MSC por si só não foram capazes de realizar efeitos pró-angiogênicos *in ovo*. Acredita-se que essa falta de resposta angiogênica não foi causada pela diferença de espécies, uma vez que em outro estudo estimularam com sucesso a neovascularização *in ovo* por vesículas extracelulares derivadas de MSCs de cordão umbilical humano em ensaio de MCA, com a diferença de que utilizou soro com depleção de vesículas, o que não foi utilizado no primeiro estudo (84, 85). As diferenças nos scaffolds aplicados também podem ter um impacto na preservação e liberação de fatores angiogênicos e nos efeitos angiogênicos *in ovo* observados. Além disso, embora as reações inflamatórias não específicas sejam geralmente consideradas insignificantes antes do dia embrionário 15 por causa do sistema imunológico relativamente imaturo do embrião de galinha (80), uma inflamação menor e uma resposta angioproliferativa

secundária associada não podem ser excluídas. No entanto, tanto DPSCs quanto BM-MSCs têm capacidades antiinflamatórias e imunomoduladoras (86, 87).

3 PROPOSIÇÃO

Verificar o desempenho da blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) funcionalizado por células tronco da polpa dentária humana (hDPSCs) na angiogênese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi encaminhado para o Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos da FOUSP (CEP-FOUSP) em respeito ao uso de células humanas na pesquisa tendo sido aprovado pelo protocolo número 2865.414. Além disso, foi aprovado por isenção pelo Comitê de ética em experimentação animal CEUA- FOUSP em respeito ao estudo in ovo sob número 009/2018 (Anexos A-D).

O biomaterial de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) foi eletrofiado na Faculdade de Engenharia Mecânica no Departamento de Materiais da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. A caracterização físico-química foi realizada em estudo anterior (3). A primeira fase da caracterização biológica e capacidade de funcionalização por células tronco derivadas de polpa humana (hDPSCs) que expressem seu potencial osteogênico foi realizada em um segundo estudo (4).

4.1 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular da hDPSCs foi realizado a partir de células congeladas armazenadas no Laboratório de Pesquisa Básica “Edmir Matson” do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (88). Um tubo criogênico com a linhagem celular crioprotegida em dimetilsulfóxido, armazenado em nitrogênio líquido da (DMSO – Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) foi descongelado em banho-maria a 37°C (Fanem, SP, Brasil) por 2 minutos. Para remover o DMSO, as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo meio clonogênico composto por: 10 ml de alpha Minimum Essential Medium (α - MEM) (Gibco® - Life Technologies) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Mesenchymal Stem Cell, Qualified, Specialty - Gibco® - Life Technologies) e 1% de 10000 U/ml de penicilina + 10000 μ g/ml de estreptomicina (Pen Strep- Gibco® - Life Technologies), 1% de L-Glutamina (L-Glutamine 200mM/100x- Gibco® - Life Technologies) e 1 % de solução 0.1 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente (Centrífuga Excelsa Baby I modelo 206 - Fanem, SP, Brasil).

Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células, resultante da centrifugação, foi ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura fresco. A suspensão das células transferida para um frasco de 25 cm², contendo 4 mL de meio de cultura clonogênico fresco, e mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar. Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar (VECO–Campinas, SP, Brasil), seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meios de cultura (normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8). A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultura trocado a cada 2 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após subconfluência de cerca de 70 a 80% da área cultivável do frasco as células foram subcultivadas. O meio do frasco de cultivo foi aspirado e as células lavadas com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA, do inglês calcium and magnesium-free phosphate buffered saline) em pH 7,2. A seguir, as células foram destacadas com 2ml de uma solução de tripsina à 0,25% (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) em estufa à 37 °C por 3-5 min. A tripsina foi inativada por meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas (300Xg) durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1 ml de meio clonogênico fresco. Essa suspensão de células foi então colocada em novos frascos de cultivo. As células utilizadas nos experimentos foram expandidas até no máximo a 6a passagem. Para verificar se as células após o descongelamento ainda apresentavam características de células-tronco mesenquimais, as células foram submetidas à citometria de fluxo utilizando um painel de anticorpos primários, conjugados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou alofococianina (APC), contra moléculas de superfície humanas, a saber: CD14-PE, CD44-APC, CD45-APC (BD Biosciences, CA, EUA), CD146-APC (Biolegend, CA, EUA), STRO-1-FITC (BD Biosciences) e, ainda, os anticorpos não acoplados de fábrica, Nanog, bem como seu controle isotópico IgG2k-FITC (BD Biosciences) e CD34-FITC (Dako) em equipamento multiusuário no Laboratório de Imunologia Experimental do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

As células também foram submetidas, na segunda fase de caracterização biológica, ao ensaio RT-qPCR (*Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction*) para genes ósseos específicos (Colágeno 1, runx 2, fosfatase alcalina e

osteocalcina). As células cultivadas sobre o biomaterial mostraram expressão gênica para os genes anteriores demonstrando a capacidade de diferenciação osteogênica facilitada pela presença da blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) (4).

4.2 PREPARO DO SCAFFOLD E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram preparados discos padronizados de cinco milímetros de diâmetro utilizando-se um perfurador de papel. Estes scaffolds foram esterilizados por meio de radiação gama no Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares e mantidos em invólucros fechados até a sua utilização no experimento. Os discos foram inseridos no fundo de placas de 48 poços divididos nos grupos experimentais. Um grupo de discos (n=15) foi semeado com células na densidade de 1×10^4 e mantidos em cultura por 14 dias em meio clonogênico **(Grupo PoliClono)**: 10 ml de alpha Minimum Essential Medium (α - MEM) (Gibco® - Life Technologies) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Mesenchymal Stem Cell, Qualified, Specialty - Gibco® - Life Technologies) e 1% de 10000 U/ml de penicilina + 10000 μ g/ml de estreptomicina (Pen Strep- Gibco® - Life Technologies), 1% de L-Glutamina (L-Glutamine 200mM/100x- Gibco® - Life Technologies) e 1 % de solução 0.1 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). O segundo grupo de discos (n=15) foi semeado por células na mesma densidade anterior e mantidos em cultura por 14 dias em meio mineralizante **(Grupo PoliMin)** composto por α MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA) e por 10mM β -glicerofosfato de Na (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA), 50 μ g/ml ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA) e 10^{-3} M de dexametasona (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA), diluída em etanol. Um terceiro grupo de discos (n=15) sem semeadura de células foi mantido úmido imerso em meio clonogênico por 14 dias **(Grupo Poli)**. Além disso, dois grupos controles foram preparados em meio clonogênico, um grupo contendo apenas células que foram semeadas na densidade de 1×10^4 , em um anel de silicone (Ortodontia MORELLI®), (89), **(Controle Positivo)** e outro grupo sem o biomaterial e sem células **(Controle negativo)**.

4.3 ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA

Cento e oito ovos brancos fertilizados de galinha (*Gallus gallus Domesticus*) (Sóorgânicos – comércio de alimentos orgânicos LTDA) foram utilizados para o ensaio os procedimentos foram adaptados de Yuanman Yu et. Al (90). Para o maior controle do ensaio foram incubados 24 ovos por vez. Os ovos eram pré-incubados por três dias a 38° C em rotação com velocidade de 360°/4 horas (Chocadeiras elétricas e automáticas para aves Golden®). No 3° dia embrionário (ED3) os ovos foram cuidadosamente higienizados com etanol 70% e processados para o cultivo *in ovo* dentro da câmara de fluxo laminar. Para tal, dois mL da albumina foi removida com uma seringa Luer descartável de 20 mL, com agulha 0,70 X 0,30mm para aumentar o espaço vazio sob o topo da casca do ovo. Em seguida, uma pequena abertura quadrangular de 1,5cm² foi realizada com disco de carborundum cinza, a abertura em seguida foi coberta por fita adesiva (Fita para peles sensíveis, Nexcare, 3M®)

Os ovos foram estabilizados em suporte plástico higienizado por etanol 70% e mantidos incubados a 37° C e 0% CO₂ em incubadora automática sem a rotação. No 7° dia (ED7) embrionário, os discos do biomaterial seguindo a distribuição dos grupos foram inseridos cuidadosamente utilizando uma pinça estéril sobre a membrana corioalantóica. Todos os grupos foram mantidos incubados por um período de mais 7 dias (ED14) a 37° C e 0% CO₂ **(Figura 4.1 e 4.2).**

Figura 4.1 – Sequência metodológica

Fonte: O autor

Figura 4.2 – Realização de abertura do ovo e disposição na chocadeira

Fonte: O autor

4.3.1 Angiogênese – análise macroscópica

No 14^o dia de incubação foram realizadas imagens digitais padronizadas, por meio de uma câmera fotográfica digital (Cybershot 3 Mega Pixels, Sony), a câmera foi posicionada em um tripé com uma distância padronizada de 10cm da abertura realizada no ovo. A imagem obtida da região de implantação dos discos foi recortada de forma padrão. As imagens macroscópicas eram então transferidas para o programa ImageJ (v.1.48 NIH – EUA – domínio público). Dois observadores calibrados previamente, utilizando-se a ferramenta “*multipoint*” realizaram a contagem do número total de vasos, a contagem de pequenos e médios vasos de cada amostra e, as intersecções de vasos em toda a região visível da membrana em uma área referência retangular de 50X40mm em um dos ovos do grupo controle negativo. **(Figura 4.3)**. Após, foi estabelecida uma circunferência de 16mm de diâmetro em torno dos discos de PoliClono, PoliMin, Poli e dos anéis de silicone (controle positivo) e foram contados os números de intersecções vasculares na periferia dos discos ou anéis de silicone utilizando a mesma ferramenta “*multipoint*” **(Figura 4.4)**.

Figura 4.3 - Padronização da região de contagem macroscópica dos vasos em ovo grupo Controle Negativo (A) e detalhe da área circular para contagem dos vasos periféricos(B)

Fonte: O autor

Figura 4.4 - Método de contagem das estruturas vasculares na avaliação macroscópica no programa ImageJ – ferramenta “multipoint”

Fonte: O autor

4.3.2 Angiogênese – análise microscópica

No 14^o dia embrionário (ED14) as membranas corioalantóica de cada grupo foram removidas dos ovos e fixadas em paraformaldeído 4%, processadas para inclusão em parafina. Foram realizados cortes de 4 μ m e coloração com hematoxilina e eosina.

A análise histológica da quantidade de vasos, da área e dos diâmetros das aberturas vasculares foi realizada de forma cega por dois observadores calibrados independentes e cegos aos grupos. As imagens histológicas de seis campos aleatórios das amostras de MCA de cada grupo foram digitalizadas em aumento original de 40X em câmera Leica DFC 295 acoplada ao microscópio Leica DM 250 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha com aquisição e processamento de imagens LAS® (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). A intensidade de luz foi padronizada

em todas as digitalizações. As imagens digitalizadas foram mantidas com formato RGB, resolução de 2048X1536 pixels e com extensão jpg.

As imagens foram analisadas no programa ImageJ (v.1.48 NIH – EUA – domínio público). Utilizando-se a ferramenta “*multipoint*” foi realizada a contagem do número de vasos de cada um dos seis campos aleatórios. A mensuração de área e diâmetros dos vasos foi aferida pela ferramenta “*freehand*” e “*straight segmented*” respectivamente aplicando-se a ferramenta “*analyse measure*” após ajuste da escala em pixels para μm utilizando como referência a barra de 50 μm de uma das amostras (**Figura 4.5, 4.6 e 4.7**).

A soma dos valores obtidos nos seis campos de cada amostra foi considerada a contagem total de vasos ou a área total de aberturas vasculares de cada amostra. Os diâmetros aferidos dos vasos foram apresentados em diâmetros médios e nos intervalos de maior e menor diâmetro. Após o cálculo do diâmetro médio os vasos foram distribuídos em vasos com diâmetro abaixo da média (menor calibre) e vasos maiores que o diâmetro médio (vasos de maior calibre).

Figura 4.5 - Corte histológico representativo da MCA apresentando as três principais camadas o ectoderme (ec) o mesoderme (m) e o epitélio corioalantoico (ea). Ilustração sobreposta representativa da interface do programa ImageJ com o método de calibração de escala de pixels (a) para μm^2 (b)

Fonte: O autor

Figura 4.6. – Delineamento do contorno do vaso ferramenta “freehand” para mensurar a área da luz vascular

Fonte: O autor

Figura 4.7 - Traçado para mensurar o diâmetro ferramenta “straight segmented”

Fonte: O autor

4.3.3 Imuno-histoquímica e imunofluorescência

Algumas amostras foram submetidas ao teste de imuno-histoquímica para os anticorpos CD34 e actina de músculo liso (SMA- do inglês “smooth muscle Actin”), com o objetivo de visualizar vasos sanguíneos, evidenciando a musculatura lisa dos vasos e células endoteliais. E a imunofluorescência para o anticorpo lamin A, para a visualização da membrana nuclear evidenciando a presença das células tronco humanas. Cortes histológicos de 3 µm foram dispostos em lâminas silanizadas. Após a desidratação com etanol e desparafinização com xilol e a reidratação do tecido com etanol, foi feita a recuperação antigênica dos tecidos. Para o anticorpo CD34 e SMA, a recuperação antigênica foi realizada com ácido cítrico (1,92g de ácido cítrico -anidro (PM 192,12) diluído em 1 litro de água MiliQ – pH 6,0)) durante 30 minutos em banho maria a 95°C.

Para o lamin A, a recuperação antigênica foi realizada com Tris/EDTA durante 30 minutos em banho maria a 95 °C. Após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com dois banhos (15 min cada) em solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%. Após o bloqueio da peroxidase, os cortes foram lavados em dois banhos de 1 minuto cada em água destilada e em dois banhos em TBS (150mM de NaCl, 20mM de Tris base pH 7,6). Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítio inespecífico com BSA 1% por uma hora. Depois do bloqueio de sítio inespecífico, os cortes foram incubados com os anticorpos anti-CD34, actina musculo liso (AML) e anti-lamin-A por 1 hora em temperatura ambiente. As características dos anticorpos constam na **Tabela 4.1**. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com TBS (três banhos de 2 minutos cada), e em seguida realizou-se a incubação com anticorpo secundário conjugado com biotina (30 minutos) e com o complexo terciário (30 minutos) (Vectastain kit, Vector Laboratories, CA, USA); cada incubação foi intercalada com três imersões em solução de TBS (2 minutos). A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) (Dako Luiquid DAB Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) e a contra coloração com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram então desidratados em banhos em cadeia crescente de etanol e diafanizados por xilol. As lâminas foram então montadas com fita de polietileno (Coverslipping Film Finitek, Sakura, EUA) em sistema de montagem automatizada (Tissue- Tek SCA, Sakura, EUA). Com anti-lamin-A as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS (5 minutos cada lavagem) e incubadas no escuro por 1 hora em

temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-Igg de coelho conjugado a FITC. Após essa incubação as amostras foram lavadas novamente com PBS (3X), e montadas com meio de montagem contendo DAPI (vectashield®, Vector Laboratories, CA, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Axiolmager A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Tabela 4.1- Características dos anticorpos utilizados na imuno-histoquímica e imunofluorescência

Anticorpo primário	Procedência	Espécie	Diluição	Recuperação antigênica
Anti CD34	Spring Bioscience (clone QBEnd/10)	Camundongo	1:50	Ácido cítrico
Anti lamin A	Abcam (clone 131C3)	Camundongo	1:200	Tris/EDTA
Anti SMA	Invitrogen (clone 1A4)	Camundongo	1:250	Ácido cítrico

Fonte: O autor

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica do programa Excel para Microsoft 365 (versão 2018). Os dados de 20% das amostras obtidas inicialmente pelos dois observadores independentes foram submetidos *à priori* a um teste para o coeficiente de correlação interclasse (ICC). Foi obtido um índice de correlação intraclasse de 0.79. Foi considerada uma correlação ótima e as medidas dos dois observadores foram então consideradas para 100% das amostras.

Foram apresentadas análises descritivas em médias ou medianas e desvios-padrão e valores máximos e mínimos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk determinando uma distribuição não normal. Dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os testes foram realizados pelo programa SigmaPlot 11.0® (Systat Software Inc., USA) com um nível de significância adotado de 5%.

5 RESULTADOS

Foram incubados um total de 118 ovos em todo o experimento. Houve uma perda de amostras por contaminação ou por não fertilização em de cerca de 30% em cada repetição do ensaio. Entretanto, somente embriões viáveis foram submetidos aos testes. A sobrevivência dos embriões nas amostras após 7 dias da implantação dos insertos foi de 100%. A amostra final foi composta por 37 ovos distribuídas nos grupos: PoliClono (n=10), PoliMin (n=7), Poli (n=8), Controle positivo (n= 7) e controle negativo (n=5).

5.1 ANGIOGÊNESE– ANÁLISE MACROSCÓPICA

A **Figura 5.1** ilustra o aspecto macroscópico da vascularização ocorrida em toda a membrana corioalantóica visível em cada grupo. Na **Figura 5.2** estão apresentados detalhes das áreas próximas aos implantes dos discos e das hDPSCs sem o biomaterial. Nas regiões implantadas pelos discos houve crescimento dos vasos na membrana corioalantóica com aumento do número de vasos próximos aos implantes convergindo de forma radial para os discos. No grupo PoliMin (**Figura 5.2. f**) nota-se uma interação do disco com a membrana corioalantóica como se ela estivesse incorporada a MCA. Podemos observar a MCA do grupo Poli, logo após a coleta da amostra, a imagem mostra um crescimento vascular interno na malha polimérica, é possível ver detalhes da vascularização nas proximidades dos biomateriais com aspecto de roda raiada e alças de vasos próximas aos insertos.

A **tabela 5.1**, mostra a distribuição da amostra avaliada de cada grupo e o número total de vasos pequenos e médios e de intersecções vasculares. Vasos pequenos estão em maior quantidade no grupo PoliMin, estatisticamente significativo quando comparado aos outros grupos, as intersecções vasculares também foram maiores no grupo PoliMin, com resultado estatisticamente significativo quando comparado apenas ao grupo Poli. Os vasos médios não estavam em grande quantidade em nenhum dos grupos (**Figura 5.2**). Observando apenas as intersecções de vasos adjacentes ao biomaterial, obtivemos o Grupo PoliMin com a maior quantidade, sendo essa diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao grupo Controle positivo (**Figura 5.3 e 5.4**). A **tabela 5.2**

mostra os dados descritivos da contagem de intersecções vasculares adjacentes ao biomaterial.

Figura 5.1 – Vascularização na MCA (E14) em diferentes grupos (macroscópica) após 7 dias de implantação (A) PoliClono; (B) PoliMIn; (C) Poli; (D) Controle Positivo e (E) Controle Negativo

Figura 5.2 – Vascularização periférica aos discos e no controle após 7 dias de implantação na MCA (E14) em diferentes grupos (macroscópico detalhe). As setas indicam as interseções vasculares na periferia dos discos e controle (A) PoliClono; (B) PoliMIn; (C) Poli; (D) Controle Positivo. Em (E) Controle Negativo – vascularização natural da MCA sem intervenção. Vasos mais finos sem alças ou dobramentos. Em (F) Poli; MCA removida do ovo exibindo intensa vascularização envolvendo o disco do polímero

Fonte: O autor

Tabela 5.1- Dados descritivos da contagem de estruturas vasculares na avaliação macroscópica

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	CI da média	Max	Min	Mediana	25%	75%
Vasos médios										
PoliClono	4	55	14.47	7.23	23.02	68	38	57	43	67
PoliMin	4	66.75	5.37	2.87	9.13	74	60	66.5	63	70.5
Poli	4	29.25	4.11	2.05	6.54	33	24	30	26	32.5
Controle Positivo	4	37.5	15.58	7.80	24.80	53	20	38.5	24.5	50.5
Vasos pequenos										
PoliClono	4	32	4.76	2.38	7.57	35	25	34	29	35
PoliMin	4	70.5	18.77	9.38	29.86	88	44	75	58.5	82.5
Poli	4	18.5	1.91	0.95	3.04	20	16	19	17	20
Controle Positivo	4	22.25	4.64	2.32	7.39	28	18	21.5	18.5	26
Intersecções										
PoliClono	4	55	14.46	7.23	23.022	68	38	57	43	67
PoliMin	4	66.75	5.737	2.86	9.129	74	60	66.5	63	70.5
Poli	4	29.25	4.113	2.05	6.545	33	24	30	26	32.5
Controle Positivo	4	37.5	15.588	7.79	24.805	53	20	38.5	24.5	50.5

PoliClono= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano). CI = intervalo de confiança; Max: valor máximo e Min= valor mínimo

Fonte: O autor

Figura 5.3- Representação gráfica da distribuição das médias da contagem de estruturas vasculares: pequenos e médios vasos e interseções vasculares na avaliação macroscópica em todos os grupos experimentais e controles

MCA= membrana corioalantóica; PoliClono= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de PCL(polirotaxano) Teste de Kruskal-wallis letras minúsculas diferentes significativo quando $p < 0.05$

Fonte: O autor

Figura 5.4 - Representação gráfica da distribuição das médias da contagem das interseções vasculares na avaliação macroscópica na periferia dos discos e do controle positivo

PoliClono= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de PCL(polirotaxano) Teste de Kruskal-wallis letras minúsculas diferentes significativo quando $p < 0.05$

Fonte: O autor

Tabela 5.2 - Dados descritivos da contagem de intersecções vasculares na periferia dos discos e no controle positivo na avaliação macroscópica

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	CI da média	Max	Min	Median	25%	75%
PoliClono	4	11.5	0.577	0.289	0.919	12	11	11.5	11	12
PoliMin	4	14.5	4.203	2.102	6.688	19	10	14.5	11	18
Poli	4	11	2.708	1.354	4.309	15	9	10	9.5	12.5
Controle Positivo	4	7.75	1.893	0.946	3.012	9	5	8.5	6.5	9

PoliClono= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano). CI = intervalo de confiança; Max: valor máximo e Min= valor mínimo

Fonte: O autor

5.2 ANGIOGÊNESE – ANÁLISE MICROSCÓPICA

A **Figura 5.5** ilustra o aspecto microscópico da vascularização em cada grupo experimental. Na **Figura 5.6** podemos observar a representação gráfica da contagem de vasos na avaliação microscópica. O grupo Policlono apresentou maior quantidade de vasos quando comparado aos outros grupos e foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle positivo.

Figura 5.5 - Cortes histológicos representativos da MCA nos grupos experimentais após 7 dias de implantação dos discos (a) PoliCLono, (b) PoliMin, (c) Poli e (d) das células hDPSCs (controle positivo). As setas identificam no mesoderme as aberturas vasculares de diferentes diâmetros exibindo hemácias nucleadas comuns do embrião. Coloração Hematoxilina eosina - Aumento original 400X

Fonte: O autor

Figura 5.6 - Representação gráfica dos dados da contagem de vasos na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo

PoliClono= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de PCL(polirotaxano) Teste de Kruskal-wallis letras minúsculas diferentes significativo quando $p < 0.05$

Fonte: O autor

Na figura 5.7 observamos os diâmetros médios dos vasos, esses valores foram considerados para determinação dos vasos de grande e pequeno calibre. Na Figura 5.8 podemos notar o mesmo aspecto, quando observado apenas vasos de pequeno calibre, o grupo Policlono foi maior que os outros grupos e essa diferença foi significativa quando comparada ao grupo controle. Em relação à presença de vaso de grande calibre, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 5.9).

Figura 5.7 - Representação gráfica do diâmetro médio dos vasos na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo

PoliClono= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de PCL(polirotaxano) Teste de Kruskal-wallis letras minúsculas diferentes significativo quando $p < 0.05$

Fonte: O autor

Figura 5.8 - Representação gráfica da média de vasos de menor calibre na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo

PoliClono= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de PCL(polirotaxano) Teste de Kruskal-wallis letras minúsculas diferentes significativo quando $p < 0.05$

Fonte: O autor

A **tabela 5.3** mostra os dados referentes à quantidade total de vasos em cada grupo e os dados em relação à quantidade de vasos maiores e menores em cada grupo.

Tabela 5.3 – Dados descritivos da contagem de estruturas vasculares maiores e menores na avaliação microscópica

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	CI	Max	Min	Mediana	25%	75%
Quantidade de vasos										
Policlono	10	22.83	8.55	2.01	4.25	40	12	23	15	27
Polimin	7	16.44	5.34	1.78	4.10	24	7	17	14.25	19.25
Poli	7	17.5	4.86	1.3	2.80	25	10	18	14	22
Controle Positivo	9	13.94	3.64	0.91	1.94	21	8	13.5	11	16.5
Vasos Menores										
Policlono	10	12.8	6.58	2.08	4.71	22	3	13	7	19
Polimin	7	8.9	3.35	1.06	2.40	16	4	8.5	7	11
Poli	7	7.8	4.37	1.38	3.12	13	1	8	4	12
Controle Positivo	9	4.3	2.12	0.71	1.63	7	1	4	2.75	6.25
Vasos Maiores										
Policlono	10	11.4	3.406	1.077	2.436	18	8	10.5	9	13
Polimin	7	12.1	6.008	1.9	4.298	24	0	12.5	9	13
Poli	7	11	7.958	2.517	5.693	23	3	8	4	21
Controle Positivo	9	9.6	4.274	1.352	3.057	15	0	9.5	8	13

PoliClono= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMIn= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano).

Fonte: O autor

No **Figura 5.9** observamos que o grupo Poli apresentou a maior área vascular, o que foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo Controle positivo e na **tabela 5.4** os dados referentes as aberturas vasculares estão descritos para cada grupo experimental

Figura 5.9 - Representação gráfica da média de vasos de maior calibre na avaliação microscópica nos grupos experimentais e controle positivo

MCA= membrana corioalantóica; PoliClono= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de PCL(polirotaxano) Teste de Kruskal-Wallis, não significativo

Fonte: O autor

Tabela 5.4 - Dados descritivos para os valores da área de aberturas vasculares (μm^2)

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	C.I.	Max	Min	Mediana	25%	75%	p
PoliClono	10	26491.9	10073.3	2374.3	5009.4	42223.0	10407.3	26313.2	20657.8	35433.0	NS
PoliMin	7	24009.5	12933.6	3587.1	7815.7	44320.0	2470.4	19704.7	15633.6	38039.1	NS
Poli	7	33556.5	9022.7	2329.7	4996.6	50319.3	20095.0	31960.0	28785.5	37655.9	p=0.018
Controle Positivo	9	21360.4	12976.3	3599.0	7841.5	47602.0	9555.7	16620.0	11118.6	28291.0	

PoliClono= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) Teste de Kruskal-Wallis significativo quando $p < 0.05$ NS= Não significativo

Fonte: O autor

Na **Figura 5.10** observamos que a abertura dos vasos é maior nos grupos onde há a presença do biomaterial, com uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos Poli e Controle positivo. **A tabela 5.5** apresenta a distribuição do diâmetro médio dos vasos. Foram considerados vasos de grande calibre, quando os valores

eram acima da média e foram considerados vasos de pequeno calibre, os valores abaixo da média.

Figura 5.10 - Representação gráfica dos dados de área das aberturas vasculares nos grupos experimentais e no controle positivo

PoliClono= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de PCL(polirotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de PCL(polirotaxano) Teste de Kruskal-wallis letras minúsculas diferentes significativo quando $p < 0.05$

Fonte: O autor

Tabela 5.5 - Dados descritivos dos dados de aferição de diâmetros

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	C.I.	Max	Min	Mediana	25%	75%
Diâmetro de todos os vasos										
PoliClono	10	33.57	17.96	2.30	4.60	91.11	12.79	26.92	22.48	37.43
PoliMin	7	40.68	32.05	5.34	10.84	168.63	9.94	30.12	22.03	46.95
Poli	7	38.30	17.97	2.62	5.28	88.23	13.10	35.34	26.47	46.86
Controle Positivo	9	43.78	20.51	2.87	5.77	88.23	13.10	40.06	28.36	55.99

PoliClono= discos de poli ε-caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio clonogênico; PoliMin= discos de poli ε-caprolactona/poli (rotaxano) com hDPSCs em meio mineralizante; Poli= discos de poli ε-caprolactona/poli (rotaxano)

Fonte: O autor

Na **Figura 5.11 (a) e (b)**, observamos as imagens de imunofluorescência representativas da presença das células tronco humanas no Grupo controle positivo após 7 dias sobre a membrana corioalantóica. Revelando que elas são capazes de permanecer ao longo de todo o período do ensaio. Na **Figura 5.11. (c) e (d)** houve

marcação positiva para anticorpos actina músculo liso (AML) e para CD34 revelando as paredes vasculares e marcação citoplasmática das células endoteliais.

Figura 5.11 - Imagem representativa da expressão em imunofluorescência do anticorpo lamin-A em verde evidenciando as estruturas nucleares das hDPSCs no grupo controle positivo em (a) aumento original 100x e (b) aumento original 400x. Em (c) detalhe do corte histológico da MCA com expressão positiva em parede vascular para o anticorpo actina músculo liso (AML) aumento original 400X. Em (d) detalhe do corte histológico da MCA com expressão positiva para células endoteliais para o anticorpo transmembrana CD34. Aumento original 400X

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

As terapias regenerativas têm ganhado cada vez mais espaço para a regeneração de tecidos. Neste cenário a pesquisa para o desenvolvimento de biomateriais tem evoluído exponencialmente. Aqui realizamos mais um passo importante para a caracterização biológica de um polímero eletrofiado composto por poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) com o propósito de ser utilizado como arcabouço para o transporte de células na bioengenharia de tecidos especialmente o tecido ósseo.

Na bioengenharia de tecidos, a angiogênese desempenha um papel muito importante. A vascularização é um fator necessário para a resposta regenerativa na formação de um novo tecido. Além de todas as qualidades desejadas de um biomaterial com o propósito de regeneração óssea, a possibilidade de permitir ou estimular a angiogênese local tem se tornado um fator preponderante na sua escolha.

A blenda polimérica de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) apresentou excelentes resultados em trabalho anterior, sendo eles, a não citotoxicidade para hDPSCs, potencial de funcionalização por células tronco com diferenciação celular, formação de nódulos de mineralização e adesão celular (4). Neste estudo observamos o seu potencial angiogênico.

Empregamos um modelo de pesquisa pré-clínico baseado no ensaio de membrana corioalantóica conhecido como estudo *in ovo* (71, 91). Tem crescido muito na literatura ensaios com MCAs com diversos biomateriais, fármacos, e outras substâncias para testes de citotoxicidade e avaliação dos processos de angiogênese associados (62, 64, 68, 70).

As potencialidades deste tipo de ensaio foram apontadas por muitos autores (67, 70-72), principalmente referente ao baixo custo e disponibilidade dos ovos e materiais necessários para o experimento, além da facilidade de acompanhamento do desenvolvimento do embrião durante todo o período do ensaio.

Há muito tempo formas alternativas aos estudos em animais estão sendo incentivadas. A utilização do ensaio em MCA se mostra eficiente para o estudo das fases iniciais do comportamento biológico *in vivo* diminuindo a quantidade de

animais em estudos experimentais posteriores. É certo que o método é bastante delicado no seu manejo. O cuidado na perfuração dos ovos para a remoção da albumina na criação do espaço para a abertura da janela na casca do ovo é algo a ser bastante treinado. Alguns ovos no início do experimento não foram a termo e tiveram que ser descartados antes da implantação dos discos. Mas, com treinamento adequado o ensaio é bastante simples e relativamente curto de ser executado. Em 14 dias já apresenta os resultados da resposta da vascularização ao biomaterial implantado sobre a MCA.

Nossos resultados mostraram que a blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) estimula a formação vascular especialmente quando associada a células tronco derivadas da polpa dentaria humana.

A angiogênese foi avaliada por meio de imagens macroscópicas e cortes histológicos da MCA. Macroscopicamente a MCA apresentou uma rede bastante ampla de vasos com diferentes contagens e características de forma entre os grupos experimentais.

Nem todos os resultados da análise macroscópica apresentaram correspondências na análise microscópica, isso deve ter acontecido muito provavelmente pelo posicionamento do biomaterial sobre a MCA que sofre pequenas movimentações ao longo do processo de desenvolvimento do embrião, o que limitou a quantidade de amostras adequadas para a avaliação macroscópica.

Macroscopicamente, ainda, observamos a presença, de alças vasculares adjacentes ao biomaterial e vascularização em forma radiada, característica que evidencia a reação e a incorporação do biomaterial à MCA, o que foi ressaltado por outros autores com o nome de “looping” (58, 59). No presente estudo, essa característica foi observada nos grupos onde o biomaterial estava presente, demonstrando biocompatibilidade. Havíamos observado este mesmo achado nos estudos anteriores (3, 4) como parte da caracterização inicial dessa blenda. Alguns autores já mostraram que a conformação de vasos em formato de raios de sol ao redor do biomaterial está relacionada à estimulação dos brotamentos capilares (60-62, 64, 69, 72), podendo fazer inferência que o mesmo ocorreu no presente ensaio.

Quando observamos imagens ampliadas, no detalhe da amostra de MCA removida do ovo com o biomaterial, sem células, ele encontra-se aderido a membrana. Podemos sugerir que o processo da angiogênese envolve intimamente o biomaterial, e até mesmo certa interiorização de pequenos capilares na rede

polimérica, embora outros exames mais detalhados desta amostra precisam ser realizados para confirmar esta hipótese. Alguns estudos sugeriram a injeção de solução de contraste nos vasos do embrião e a tomada de imagens tomográficas para se comprovar a rede de vasos intrínseca em biomateriais implantados em MCAs (50).

Os vasos menores e as intersecções vasculares foram observados em maior quantidade nos discos semeados com células diferenciadas e indiferenciadas, e em menor quantidade nos discos sem células e no controle positivo. Essas informações são relevantes, pois, caracterizam que a proliferação vascular foi maior na presença do conjunto polímero e hDPSCs.

Quando observamos as técnicas de mensuração e/ou contagem de vasos na literatura, não encontramos um padrão, principalmente para as amostras macroscópicas. Em nosso estudo, não incluímos os vasos de maior calibre durante as contagens, pois se trata da veia e artéria alantóica principais para nutrição do embrião (cordão umbilical), que está presente em todas as MCA (60). Mas observamos a alteração de posicionamento vascular bastante nítida quando há presença de algum inserto com o polímero ou no grupo controle positivo. Escolhemos realizar duas contagens diferentes, uma considerando a resposta do biomaterial na vascularização total e outra mais localizada ao redor do biomaterial. Em ambas, observamos aspectos macroscópicos semelhantes, mostrando que o biomaterial provocou reflexos importantes na vascularização adjacente aos insertos, como também influenciou a aparência e distribuição dos vasos na totalidade visível da MCA.

Uma das limitações do ensaio em MCA *in ovo*, é que não é possível contar ou observar macroscopicamente, todos os vasos presentes na membrana, devido sua característica tridimensional de posicionamento no interior do ovo. A remoção somente da MCA mostrou-se dificultosa, pois ela é viscosa e tem a propriedade de se enrugar e enrolar em si própria. A grande maioria dos autores escolhe compor a análise pela avaliação microscópica, por ser um método mais simples e de menor custo (63-65).

Na análise microscópica, conseguimos observar de forma mais concreta as características dos vasos. Os cortes histológicos mostraram presença abundante de pequenos vasos espalhados pelo ectoderme e mesoderme reconhecido pelas formações vasculares contendo as hemácias nucleadas características da ave. A

diferença de contagem de pequenos vasos entre os grupos, contendo o polímero semeado por células indiferenciadas e com os insertos das hDPSCs semeadas no controle, se confirmou nos resultados das mensurações do diâmetro dos vasos. Este fato reforça a interpretação de que houve maior quantidade de brotamento vascular no grupo polímero + hDPSCs. Além disso, apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre os outros grupos, a contagem sempre foi maior quando o polímero estava presente.

A área das aberturas vasculares foi maior nos grupos onde havia o biomaterial em conjunto com a célula, e quando avaliamos esses dados simultaneamente aos dados referentes ao diâmetro dos vasos, validamos as características observadas macroscopicamente. Os vasos de menor calibre estão em maior quantidade nos grupos onde as células foram semeadas sobre o biomaterial, fazendo com que área seja maior nesses grupos, não por ter vasos grandes, mas sim, por ter muitos vasos pequenos, o que mostra que o polímero estimula o processo de angiogênese.

Muitos autores funcionalizaram os biomateriais com fatores de crescimento como, por exemplo, do crescimento endotelial (VEGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e outros juntamente às células tronco com o propósito de estudar melhor estes estímulos a angiogênese (51-53). Aqui nossos resultados, mostraram que o biomaterial funcionalizado pelas células tronco foi suficiente para aumentar o potencial angiogênico na MCA. A presença das células tronco foi um diferencial para os resultados. Outros estudos já relataram as propriedades das células tronco de se diferenciarem em células endoteliais ou a liberação de vesículas que provavelmente atraem células endógenas para o processo de angiogênese (56, 57). Diversos estudos já demonstraram a presença de um estímulo para a diferenciação das células tronco ou seu poder atrair outras células que favoreçam a vascularização (51, 52). Aqui, acreditamos que o biomaterial tenha de certa forma, exercido essa função, devido às outras respostas biológicas de diferenciação encontradas com essa blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) em estudos anteriores (4). Podemos refletir ainda por todas as respostas biológicas encontradas até aqui se a utilização de células indiferenciadas poderia trazer melhores resultados, quando colocada no leito cirúrgico do que células diferenciadas. Ainda, levantar uma discussão para futuras pesquisas, de que o maior potencial de divisão nas células indiferenciadas iria atrair fatores inerentes ao leito cirúrgico, o que poderia induzir maior potencial de formação vascular e tecido ósseo.

As expressões imuno-histoquímicas evidenciadas pela marcação positiva de lamin-A foram importantes para mostrar que em 7 dias de implantação as hDPSCS estavam presentes na MCA e vivas. As outras marcações positivas para os anticorpos actina músculo liso (AML) e CD34 foram só ilustrativas, mas futuramente poderão ser utilizadas para melhor evidenciar vasos e células endoteliais em todos os grupos avaliados e verificar padrões diferentes de expressões a estes anticorpos.

A perda de ovos por não estarem fecundados, por dificuldade de desenvolvimento do embrião ou por contaminação foram fatores limitadores ao número das amostras. Entretanto inerentes ao método, estes fatores não prejudicaram as avaliações, pois, só foram considerados os embriões que estavam bem e sem contaminações no 7º dia embrionário para implantação dos grupos experimentais. Além disso, 100% dos embriões no 14º dia embrionário estavam vivos e sem respostas negativas a implantação das amostras, o que comprovou mais uma vez a não toxicidade do material. Acreditamos que além de poupar muitos animais em um estudo *in vivo*, o estudo *in ovo* apresenta grande potencialidade como método de baixo custo e, uma vez aprendida a técnica, ela é simples e reprodutível. A subjetividade das avaliações pôde ser suplantada pela calibração de dois observadores cegos aos grupos que se padronizados no método a priori tornam a avaliação mais integrada e transparente.

Finalmente, depois de concluídas estas três fases de caracterização biológica essa blenda polimérica de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) poderá ser utilizada como biomaterial funcionalizado por células tronco em defeitos ósseos críticos em um grupo reduzido de animais em um estudo *in vivo*, de longo termo, para se verificar a reabsorção ou manutenção dos arcabouços e as respostas orgânicas mais complexas na regeneração óssea.

7 CONCLUSÕES

Nos limites metodológicos deste estudo, podemos concluir que:

A blenda de poli ϵ -caprolactona/poli (rotaxano) per si estimula angiogênese, e de forma mais intensa quando funcionalizada por células tronco derivadas da polpa dentária humana.

REFERÊNCIAS¹

1. Janoušková O. Synthetic polymer scaffolds for soft tissue engineering. *Physiol Res.* 2018 Oct 30;67(Suppl 2):S335-S348. doi: 10.33549/physiolres.933983.
2. de Oliveira, NK, Miguita, L, Salles, THC, d'Ávila, MA, Marques, MM, Deboni, MCZ. Can porous polymeric scaffolds be functionalized by stem cells leading to osteogenic differentiation? A systematic review of in vitro studies. *J Mater Sci* 2018, 53:15757–68. doi:10.1007/s10853-018-2621-9.
3. Salles THC, Sendyk DI, de Oliveira NK, Machado, D, Lacelloti, M, Deboni, MCZ. et al. In vitro and in vivo evaluation of electrospun membranes of poly (ϵ -caprolactone) and poly (rotaxane). *Mater. Sci. Eng. C.* 2017 Aug;77:912-919. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.190.
4. Oliveira NK, Salles THC, Pedroni AC, Miguita L, D'Ávila MA, Marques MM. et al. Osteogenic potential of human dental pulp stem cells cultured onto poly- ϵ -caprolactone/poly (rotaxane) scaffolds. *Dent Mater.* 2019 Dec;35(12):1740-9. doi: 10.1016/j.dental.2019.08.109. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31543375.
5. Changotade S, Radu BG, Consalus A, Poirier F, Peltzer J, Lataillade JJ, et al. Preliminary in Vitro Assessment of Stem Cell Compatibility with Cross-Linked Poly(ϵ - caprolactone urethane) Scaffolds Designed through High Internal Phase Emulsions. *Stem Cells Inter.* 2015;2015. doi: 10.1155/2015/283796.
6. Soliman S, Pagliari S, Rinaldi A, Forte G, Fiaccavento R, Pagliari F. et al. Multiscale three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering via multimodal electrospinning. *Acta Biomater.* 2010 Apr;6(4):1227-37. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.051.
7. Wang C, Lin K, Chang J, Sun J. Osteogenesis and angiogenesis induced by porous β -CaSiO₃/PDLGA composite scaffold via activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Biomaterials.* 2013 Jan;34(1):64-77. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.021.
8. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30. doi: 10.1073/pnas.240309797. PMID: 11087820; PMCID: PMC17626.

---

¹De acordo com o Estilo Vancouver

9. Souza, DFM, Correa, L, Sendyk, DI, Burim, RA, Naclério-Homem, MG, Deboni, MCZ. Efeito adverso do beta-fosfato tricálcico com controle de potencial zeta no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos. *Rev. bras. ortop.* 2016, 51(3):346-52. doi: 10.1016/j.rboe.2015.07.010.
10. Adamopoulos O, Papadopoulos T. Nanostructured bioceramics for maxillofacial applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Aug;18(8):1587-97. doi: 10.1007/s10856-007-3041-6.
11. Gotz W, Papageorgiou SN. Molecular, Cellular and Pharmaceutical Aspects of Synthetic Hydroxyapatite Bone Substitutes for Oral and Maxillofacial Grafting. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18(1):95-106. doi: 10.2174/1389201017666161202103218. PMID: 27915980.
12. Polo CI, Sendyk WR, Correa L, Sendyk D, Deboni MCZ, Naclério-Homem MDG. Synergism between recombinant human bone morphogenetic protein 2/absorbable collagen sponge and bone substitutes favors vertical bone augmentation and the resorption rate of the biomaterials: Histomorphometric and 3D microcomputed tomography analysis. *J Periodontol.* 2020 Oct;91(10):1295-1306. doi: 10.1002/JPER.19-0571.
13. Thrivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am.* 2017 Oct;61(4):835-56. doi: 10.1016/j.cden.2017.06.003.
14. Xu LC, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials.* 2007 Aug;28(22):3273-83. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.032.
15. Hofmann S, Hagenmüller H, Koch AM, Müller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials.* 2007 Feb;28(6):1152-62. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.019.
16. Huang W, Shi X, Ren L, Du C, Wang Y. PHBV microspheres--PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010 May;31(15):4278-85. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.059.

17. Costa-Pinto AR, Salgado AJ, Correlo VM, Sol P, Bhattacharya M, Charbord P. et al.. Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008 Jun;14(6):1049-57. doi: 10.1089/tea.2007.0153.

18. Zhang Y, Fan W, Ma Z, Wu C, Fang W, Liu G. et al. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. *Acta Biomater*. 2010 Aug;6(8):3021-8. doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.030.

19. Zhu Y, Liu T, Song K, Jiang B, Ma X, Cui Z. Collagen-chitosan polymer as a scaffold for the proliferation of human adipose tissue-derived stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Mar;20(3):799-808. doi: 10.1007/s10856-008-3636-6.

20. Wegst U, Ashby M. The mechanical efficiency of natural materials. *Philosophical Magazine*. 2004;84(21):2167-86. doi: 10.1080/14786430410001680935.

21. Auclair-Daigle C, Bureau MN, Legoux JG, Yahia L. Bioactive hydroxyapatite coatings on polymer composites for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Jun 15;73(4):398-408. doi: 10.1002/jbm.a.30284.

22. Liu H, Webster TJ. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications. *Int J Nanomedicine*. 2010 Apr 15;5:299-313. doi: 10.2147/ijn.s9882.

23. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. doi: 10.1126/science.8493529.

24. Mohan N, Nair PD, Tabata Y. Growth factor-mediated effects on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D semi-IPN poly(vinyl alcohol)-poly(caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(1):146-59. doi: 10.1002/jbm.a.32680.

25. Oliveira JT, Correlo VM, Sol PC, Costa-Pinto AR, Malafaya PB, Salgado AJ, et al. Assessment of the suitability of chitosan/polybutylene succinate scaffolds seeded with mouse mesenchymal progenitor cells for a cartilage tissue engineering approach. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(10):1651-61. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0307.

26. Chen L, Bai Y, Liao G, Peng E, Wu B, Wang Y. et al. Electrospun poly(L-lactide)/poly(ϵ -caprolactone) blend nanofibrous scaffold: characterization and biocompatibility with human adipose-derived stem cells. *PLoS One*. 2013 Aug 26;8(8):e71265. doi: 10.1371/journal.pone.0071265.
27. Garg K, Bowlin GL. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*. 2011 Mar 30;5(1):13403. doi: 10.1063/1.3567097.
28. Gautam S, Chou CF, Dinda AK, Potdar PD, Mishra NC. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Jan 1;34:402-9. doi: 10.1016/j.msec.2013.09.043.
29. Meng Z, Zheng W, Li L, Zheng Y. Fabrication and characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL–MWCNTs by electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*. 2010;30(7):1014-21. doi: 10.1016/j.msec.2010.05.003.
30. Wang L, Zhang C, Li C, Weir MD, Wang P, Reynolds MA. et al. Injectable calcium phosphate with hydrogel fibers encapsulating induced pluripotent, dental pulp and bone marrow stem cells for bone repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Dec 1;69:1125-36. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.019.
31. Zheng X, Yang F, Wang S, Lu S, Zhang W, Liu S. et al. Fabrication and cell affinity of biomimetic structured PLGA/articular cartilage ECM composite scaffold. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Mar;22(3):693-704. doi: 10.1007/s10856-011-4248-0.
32. Jang YJ, Chun SY, Kim GN, Kim JR, Oh SH, Lee JH. et al. Characterization of a novel composite scaffold consisting of acellular bladder submucosa matrix, polycaprolactone and Pluronic F127 as a substance for bladder reconstruction. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):3117-25. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.002.
33. Xiang P, Wu KC, Zhu Y, Xiang L, Li C, Chen DL. et al. A novel Bruch's membrane-mimetic electrospun substrate scaffold for human retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials*. 2014 Dec;35(37):9777-9788. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.040.
34. Domingos M, Intranuovo F, Russo T, De Santis R, Gloria A, Ambrosio L. 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*. 2013 Dec;5(4):045004. doi: 10.1088/1758-5082/5/4/045004.

35. Patlolla A, Collins G, Arinzeh TL. Solvent-dependent properties of electrospun fibrous composites for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2010 Jan;6(1):90-101. doi: 10.1016/j.actbio.2009.07.028.
36. Seyednejad H, Gawlitta D, Dhert WJ, Van Nostrum CF, Vermonden T, Hennink WE. Preparation and characterization of a three-dimensional printed scaffold based on a functionalized polyester for bone tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2011 May;7(5):1999-2006. doi: 10.1016/j.actbio.2011.01.018.
37. Ahtiainen K, Sippola L, Nurminen M, Mannerström B, Haimi S, Suuronen R. et al. Effects of chitosan and bioactive glass modifications of knitted and rolled polylactide-based 96/4 L/D scaffolds on chondrogenic differentiation of adipose stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Jan;9(1):55-65. doi: 10.1002/term.1614.
38. Schutgens EM, Tryfonidou MA, Smit TH, Öner FC, Krouwels A, Ito K. et al. Biomaterials for intervertebral disc regeneration: past performance and possible future strategies. *Eur Cell Mater.* 2015 Oct 12;30:210-31. doi: 10.22203/ecm.v030a15.
39. Xue D, Zheng Q, Zong C, Li Q, Li H, Qian S. et al. Osteochondral repair using porous poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite hybrid scaffolds with undifferentiated mesenchymal stem cells in a rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Jul;94(1):259-70. doi: 10.1002/jbm.a.32691.
40. Li JJ, Zhao F, Li J. Polyrotaxanes for applications in life science and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Apr;90(2):427-43. doi: 10.1007/s00253-010-3037-x.
41. Takata T. Switchable Polymer Materials Controlled by Rotaxane Macromolecular Switches. *ACS Cent Sci.* 2020 Feb 26;6(2):129-143. doi: 10.1021/acscentsci.0c00002.
42. Zhang Q, Shi B, Ding J, Yan, L, Thawani, JP, Fu, C. et al. Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair. *Acta Biomaterialia.* 2019 Apr;88:57-77. doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.056.
43. Sun HL, Zhang HY, Dai Z, Han X, Liu Y. Insights into the Difference Between Rotaxane and Pseudorotaxane. *Chem Asian J.* 2017 Jan 17;12(2):265-270. doi: 10.1002/asia.201601545. Epub 2016 Dec 16.

44. Liu Y, Han ZP, Zhang SS, Jing YY, Bu XX, Wang CY. et al. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem*. 2011 Jul 15;286(28):25007-15. doi: 10.1074/jbc.M110.213108.
45. Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Buschmann MD. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Mar;15(3):316-27. doi: 10.1016/j.joca.2006.08.007.
46. Alagiakrishnan K, Mereu LE, Tsuyuki RT, Kalisiak M, Sclater A, Hervas-Malo M. Cholesterol and Osteoporosis in Postmenopausal Women: A Pilot Study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2003;51(10):1510-1. doi: 10.1046/j.1532-5415.2003.514847.x.
47. Tong X, Chen X, Zhang S, Huang M, Shen X, Xu J et al. The Effect of Exercise on the Prevention of Osteoporosis and Bone Angiogenesis. *BioMed Research International*. 2019;2019. 8171897. doi: 10.1155/2019/8171897
48. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):323-328. doi: 10.1038/nature13145.
49. García JR, García AJ. Biomaterial-mediated strategies targeting vascularization for bone repair. *Drug Deliv Transl Res*. 2016 Apr;6(2):77-95. doi: 10.1007/s13346-015-0236-0.
50. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 2018 Aug;21(3):425-532. doi: 10.1007/s10456-018-9613-x.
51. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M. et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-84. doi: 10.1634/stemcells.22-3-377.
52. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C. et al. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e46842. doi: 10.1371/journal.pone.0046842.

53. Seebach C, Henrich D, Kähling C, Wilhelm K, Tami AE, Alini M. et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jun;16(6):1961-70. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0715.
54. Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, Nöth U, Tuan RS. Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Mar;1(3):237-47. doi: 10.5966/sctm.2011-0036.
55. Bulnheim U, Müller P, Neumann HG, Peters K, Unger RE, Kirkpatrick CJ. et al. Endothelial cells stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014 Oct;8(10):831-40. doi: 10.1002/term.1590.
56. de Cara SPHM, Origassa CST, de Sá Silva F, Moreira MSNA, de Almeida DC, Pedroni ACF. et al. Angiogenic properties of dental pulp stem cells conditioned medium on endothelial cells in vitro and in rodent orthotopic dental pulp regeneration. *Heliyon*. 2019 Apr 28;5(4):e01560. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01560.
57. Zhu L, Dissanayaka WL, Zhang C. Dental pulp stem cells overexpressing stromal-derived factor-1 α and vascular endothelial growth factor in dental pulp regeneration. *Clin Oral Investig*. 2019 May;23(5):2497-2509. doi: 10.1007/s00784-018-2699-0. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30315421.
58. Hilkens P, Fanton Y, Martens W, Gervois P, Struys T, Politis C. et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Res*. 2014 May;12(3):778-90. doi: 10.1016/j.scr.2014.03.008.
59. Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C. et al. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS One*. 2013 Aug 7;8(8):e71104. doi: 10.1371/journal.pone.0071104.
60. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol*. 2017 Jun;70:97-101. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.11.004. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27832950.
61. Bernardini G, Spinetti G, Ribatti D, Camarda G, Morbidelli L, Ziche M. et al. I-309 binds to and activates endothelial cell functions and acts as an angiogenic molecule in vivo. *Blood*. 2000 Dec 15;96(13):4039-45.

62. Klueh U, Dorsky DI, Kreutzer DL. Enhancement of implantable glucose sensor function in vivo using gene transfer-induced neovascularization. *Biomaterials*. 2005 Apr;26(10):1155-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.017.

63. Hiebl B, Mrowietz C, Goers J, Bahramsoltani M, Plendl J, Kratz K. et al. In vivo evaluation of the angiogenic effects of the multiblock copolymer PDC using the hen's egg chorioallantoic membrane test. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010;46(2-3):233-8. doi: 10.3233/CH-2010-1350.

64. Handel M, Hammer TR, Nooeaid P, Boccaccini AR, Hofer D. 45S5-Bioglass(®)-based 3D-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the CAM angiogenesis assay. *Tissue Eng Part A*. 2013 Dec;19(23-24):2703-12. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0707.

65. Gigliobianco G, Chong CK, MacNeil S. Simple surface coating of electrospun poly-L-lactic acid scaffolds to induce angiogenesis. *J Biomater Appl*. 2015 Jul;30(1):50-60. doi: 10.1177/0885328215569891.

66. Woloszyk A, Liccardo D, Mitsiadis TA. Three-Dimensional Imaging of the Developing Vasculature within Stem Cell-Seeded Scaffolds Cultured in ovo. *Front Physiol*. 2016 Apr 21;7:146. doi: 10.3389/fphys.2016.00146.

67. Freyre-Fonseca V, Medina-Reyes EI, Téllez-Medina DI, et al. Influence of shape and dispersion media of titanium dioxide nanostructures on microvessel network and ossification. *Colloids Surf* 2018 Feb;162:193-201. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.11.049.

68. Czekanska EM, Geng J, Glinka M, White K, Kanczler J, Evans ND, et al. Combinatorial delivery of bioactive molecules by a nanoparticle-decorated and functionalized biodegradable scaffold. *J. Mater. Chem. B*. 2018;6(27):4437-45. doi: 10.1039/c8tb00474a.

69. Winter, R., Dungal, P, Reischies, FMJ. et al. Photobiomodulation (PBM) promotes angiogenesis in-vitro and in chick embryo chorioallantoic membrane model. *Sci Rep* 8, 17080 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35474-5>.

70. Dünker N, Jendrossek V. Implementation of the Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Radiation Biology and Experimental Radiation Oncology Research. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 7;11(10):1499. doi: 10.3390/cancers11101499.

71. Ferreira NN, L MBF, Miranda-Goncalves V, Reis RM, Seraphim TV, Borges JC, et al. Alginate hydrogel improves anti-angiogenic bevacizumab activity in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;119:271-82. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.06.028.
72. Strnadová K, Španko M, Dvořánková B, et al. Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of cancer cell behaviour. *Histochemistry and Cell Biology.* 2020 Aug;154(2):177-188. doi: 10.1007/s00418-020-01872-y.
73. DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu HC, Harrington DA, Yu W. et al. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res.* 2018 Aug 1;8(8):1642-60.
74. Ribatti D. The use of the chick embryo chorioallantoic membrane as experimental model to study virus growth and to test the clonal selection hypothesis. The contribution of Sir Mac Farlane Burnet. *Immunol Lett.* 2018 Aug;200:1-4. doi: 10.1016/j.imlet.2018.05.005.
75. Comşa Ş, Ceaşu RA, Popescu R, Cîmpean AM, Raica M. The Human Mesenchymal Stem Cells and the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: The Key and the Lock in Revealing Vasculogenesis. *In Vivo.* 2017 Nov-Dec;31(6):1139-44. doi: 10.21873/invivo.11180.
76. Spänzel-Borowski, K. The chick chorioallantoic membrane as test system for biocompatible materials. *Res. Exp. Med.* 1989; 189:69–75. doi: 10.1007/BF01856032.
77. Prescott MJ, Lidster K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab Anim (NY).* 2017 Mar 22;46(4):152-6. doi: 10.1038/labanim.1217.
78. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. (2020) Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 18(7): e3000411. doi: 10.1371/journal.pbio.3000411
79. Baiguera S, Macchiarini P, Ribatti D. Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue-engineered construct biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 Jul;100(5):1425-34. doi: 10.1002/jbm.b.32653.

80. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev.* 2016 Aug;141:70-7. doi: 10.1016/j.mod.2016.05.003.
81. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD. et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells.* 2008 Mar;26(3):638-45. doi: 10.1634/stemcells.2007-0484.
82. Oskowitz A, McFerrin H, Gutschow M, Carter ML, Pochampally R. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Res.* 2011 May;6(3):215-25. doi: 10.1016/j.scr.2011.01.004. Epub 2011 Jan 31. PMID: 21421339; PMCID: PMC4920087.
83. Woloszyk A, Buschmann J, Waschkies C, Stadlinger B, Mitsiadis TA. Human Dental Pulp Stem Cells and Gingival Fibroblasts Seeded into Silk Fibroin Scaffolds Have the Same Ability in Attracting Vessels. *Front Physiol.* 2016 Apr 19;7:140. doi: 10.3389/fphys.2016.00140.
84. Ma J, Zhao Y, Sun L, Sun X, Zhao X, Sun X. et al. Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Jan;6(1):51-9. doi: 10.5966/sctm.2016-0038.
85. Ma T, Chen, Y, Chen, Y, Meng, Q, Sun, J, Shao, L. et al. MicroRNA-132, Delivered by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes, Promote Angiogenesis in Myocardial Infarction. *Stem Cells International*, vol. 2018, Article ID 3290372, 11 pages, 2018. doi: 10.1155/2018/3290372
86. Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev.* 2010 May;19(5):607-14. doi: 10.1089/scd.2009.0345.
87. Andrukhov O, Behm C, Blufstein A, Rausch-Fan X. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells: Implication in disease and tissue regeneration. *World J Stem Cells.* 2019 Sep 26;11(9):604-17. doi: 10.4252/wjsc.v11.i9.604.
88. Diniz IM, Teixeira KI, Araújo PV, Araújo MS, Marques MM, Poletto LT. et al. Evaluation of antibacterial photodynamic therapy effects on human dental pulp cell cultures. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Sep;11(3):300-6. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.03.010.

89. Huang I. Análise histomorfológica e imuno-histoquímica de fragmento de gengiva inserido em membrana corioalantóica de ovos fecundados de galinha: São Paulo, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2018.
90. Yu Y, Chen R, Sun Y, Pan Y, Tang W, Zhang S. et al. Manipulation of VEGF-induced angiogenesis by 2-N, 6-O-sulfated chitosan. *Acta Biomater.* 2018 Apr 15;71:510-521. doi: 10.1016/j.actbio.2018.02.031.
91. Woloszyk A, Mitsiadis TA. Angiogenesis within Stem Cell-Seeded Silk Scaffolds Cultured on the Chorioallantoic Membrane and Visualized by 3D Imaging. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2017 May 16;41:1F.19.1-9. doi: 10.1002/cpsc.27.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Continuação do Parecer: 2.865.414

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os termos obrigatórios de forma adequada.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1103445.pdf	07/08/2018 15:33:10		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco.pdf	08/05/2018 14:59:51	Natacha Kalline de Oliveira	Aceito
Outros	laboratorio.pdf	17/04/2018 15:59:14	Natacha Kalline de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_auxilio.pdf	12/04/2018 18:53:14	Natacha Kalline de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	12/04/2018 18:50:13	Natacha Kalline de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Continuação do Parecer: 2.865.414

SAO PAULO, 31 de Agosto de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

ANEXO B – Autorização para utilização do laboratório

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA NO LABORATÓRIO DE PESQUISAS BÁSICAS "EDMIR MATSON" DO DEPARTAMENTO DE DENTÍSTICA DA FOUSP

TÍTULO DA PESQUISA:

Potencial de vascularização e osteogênese de células-tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre scaffolds de PCL/Poli(rotaxano): estudos *in ovo* e *in vivo*.

PESQUISADOR: Natacha Kalline de Oliveira

ORIENTADOR/PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

OBJETIVO PRINCIPAL DA PESQUISA: Verificar se o *scaffold* polimérico apresenta estrutura físico química que permita a angiogênese e que promova a neoformação óssea em defeitos críticos bicorticais após sua funcionalização por células tronco de polpa dentária humana.

Autorizo a utilização do laboratório de pesquisas básicas "Edmir Matson" do Departamento de Dentística da FOUSP para a pesquisa acima descrita.

São Paulo, 17/04/2018

Prof. Dra. Miriam Lacalle Turbino
Chefe do Departamento de Dentística

Obs.: Lembramos da necessidade da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa trazendo cópia do parecer e assinalando os dias de utilização da Clínica Odontológica para a pesquisa.

S. Paulo, 17/04/2018

Prof. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

Natacha Kalline de Oliveira

ANEXO C – Autorização para utilização do Biobanco da Faculdade de Odontologia da USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

BIOBANCO DA FOUSP

AUTORIZAÇÃO

O **Biobanco da FOUSP** – O Laboratório Edmir Matson compromete-se a fornecer amostras de células tronco de polpa dentária humana, para a execução do trabalho de pesquisa intitulado: "Potencial de vascularização e osteogênese de células-tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre *scaffolds* de PCL/Poli(rotaxano)" a ser realizado pelos pesquisadores Prof^a Dr^a Maria Cristina Zindel Deboni e Natacha Kalline de Oliveira, após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São Paulo, 08 de Maio de 2018

 Prof(a) Dr(a) Márcia Martins Marques
 Responsável pelo Laboratório

 Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior
 Prof. Coordenador do Biobanco da FOUSP

Informações importantes:

Biobanco da FOUSP – (Registro CONEP B-444 – aprovado em 11/02/2016):

- Laboratório de Biologia Celular da Disciplina de Patologia Bucal
- Laboratório de DNA Forense
- Centro de Pesquisa em Biologia Oral
- Laboratório de Patologia Molecular (LPM)
- Centro de Atendimento a Pacientes Especiais
- Biorepositório da Disciplina de Periodontia
- Laboratório de Antropologia e Odontologia Forense
- Banco de Dentes

OBS: Documento elaborado em duas vias sendo: 1ª via-Biobanco da FOUSP – 2ª via Laboratório

Biobanco da FOUSP-11/02/2016

ANEXO D – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Potencial de vascularização e osteogênese de células-tronco de polpa dentária humana cultivadas sobre scaffolds de PCL/Poli(rotaxano): estudo *in ovo* e *in vivo*." registrada com o nº 009/2018, sob a responsabilidade de Maria Cristina Zindel Deboni, Luciana Correa e Natacha Kalline de Oliveira que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 09/04/2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/04/2018 A 09/04/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico Wistar
Nº de animais	24
Peso/idade	200-250g / 45 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB - USP

São Paulo, 12 de abril de 2018.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP