

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

LAÍSA CAMERINI DA ROSA

ENGENHARIA TECIDUAL: DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO *SCAFFOLD*
INJETÁVEL PARA A APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Pelotas
2017

LAÍSA CAMERINI DA ROSA

**ENGENHARIA TECIDUAL: DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO *SCAFFOLD*
INJETÁVEL PARA A APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE**

Projeto de pesquisa apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde e Comportamento da
Universidade Católica de Pelotas.

Orientadora: Fernanda Nedel, PhD

Pelotas
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R788e da Rosa, Laísa Camerini
Engenharia tecidual: desenvolvimento de um novo scaffold injetável para a aplicação na área da saúde. / Laísa Camerini Rosa. – Pelotas: UCPEL, 2017.
100 f.
Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Pelotas, BR-RS, 2017.
Orientadora: Fernanda Nedel.
1. carragenina. 2. hidrogel injetável. 3. Gigartina skottsbergii. I. Nedel, Fernanda, or. II. Título.

CDD 610

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Dissertação de Mestrado em memória
de minha amada avó Martha Maria Camerini*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu quero agradecer aos meus pais, Ivete e Luiz Antonio, por serem responsáveis pela pessoa que me tornei, por sempre acreditarem na minha capacidade e agradecer por todos os esforços que fizeram para que eu conseguisse alcançar meus objetivos e terminar mais esta etapa da minha vida.

À minha irmã Manuela, que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, com muito amor, companheirismo, carinho e lutando comigo para ultrapassar todos os obstáculos.

À minha vo Martha e meu irmãozinho Joakim que infelizmente não se encontram mais aqui, mas que se eternizam na minha vida se tornando meus anjos da guarda e companheiros para toda a vida.

À minha dinda Marinez e minha madrinha Mari por serem como duas mães a mais na minha vida, sempre me apoiando e me proporcionando coisas boas, não medindo esforços para me ajudar.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram e deram força para a realização das minhas metas, mesmo muitas vezes distantes. Em especial minha eterna amiga Angela Casaril por dividir comigo os melhores e piores momentos da época de faculdade e a Laís por ser minha fiel companheira, minha dupla, minha outra metade, tanto no laboratório como na vida.

Ao pessoal do LANEK por todos os dias de amizade e companheirismo, cafés e risadas. Em especial a Pamela, Ana, Clarissa, Fabiana, Bertha, Bibi por terem se tornado mais que colegas de trabalho, se tornaram grandes amigas que fizeram meus dias de laboratório mais leves e seguros.

À minha orientadora Fernanda Nedel que é uma pessoa incrível que sempre esteve presente para me guiar e me ajudar em todos os momentos.

Por fim, agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento e a Universidade Católica de Pelotas.

RESUMO

A engenharia tecidual envolve tipicamente três componentes principais, os quais são denominados de pilares da engenharia tecidual: células responsivas (ex. células tronco), *scaffolds* e moléculas sinalizadoras (tais como proteínas e fatores de crescimento). Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais que proporcionam um suporte para as células e servem de guia para a colonização, proliferação e diferenciação celular. Nos últimos anos, polímeros sintéticos e naturais, vêm sendo investigados como biomateriais para ampla gama de aplicações, incluindo regeneração tecidual e engenharia de tecidos. No entanto, biomateriais nacionais, para as mais variadas aplicações, não são disponíveis, levando à dependência de tecnologia externa e fazendo com que um mercado em ampla expansão seja desprestigiado no cenário nacional. Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo desenvolver e caracterizar um novo *scaffold* injetável proveniente da alga rodofícea *Gigartina skottsbergii* encontrada no continente latino americano, o qual juntamente com os seus bioprodutos possa ser empregado em engenharia tecidual e terapia celular, com aplicação inicial na área médica. Para tanto, foi sintetizado e processado um gel a partir da alga *G. Skottsbergii*, o qual foi analisado e testado como um novo *scaffold*. Assim, foi avaliada a viabilidade e capacidade de adesão celular do *scaffold*, utilizando-se o ensaio colorimétrico de WST-1 e microscopia eletrônica de varredura (MEV), frente a uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos embrionários de rato (NIH/3T3). A avaliação dos dados foi realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Neste sentido, foi possível observar a estrutura tridimensional da alga marinha, assim como o comportamento das células NIH/3T3 frente a esta estrutura. Observa-se que as células encontram-se em grande quantidade e fortemente aderidas a estrutura da alga, mantendo uma morfologia alongada e com prolongamentos. Com relação a avaliação da estrutura tridimensional do hidrogel proveniente da alga *G. Skottsbergii* e a morfologia das células NIH/3T3 semeadas sobre este, foram ser observadas grandes áreas para a adesão celular, onde são visualizadas estruturas laminares e filamentosas que se interconectam, aderido a esta estrutura é possível observar células NIH/3T3 com morfologia alongada e prolongamentos. Além disso, observou-se que houve uma maior viabilidade celular no grupo que continha uma diluição de 1/4 do gel proveniente da alga *G. Skottsbergii* com 5 horas e cultivo e com 48 horas de cultivo.

Palavras-chave: carragenina, hidrogel injetável, *Gigartina skottsbergii*

ABSTRACT

Tissue engineering typically involves three major components, which are termed tissue engineering pillars: responsive cells (stem cells), scaffolds and signaling molecules (such as proteins and growth factors). Scaffolds are three-dimensional structures that provide cell support and serve as a guide for cell colonization, proliferation and differentiation. In recent years, synthetic and natural polymers have been investigated as biomaterials for a wide range of applications, including tissue regeneration and tissue engineering. However, natural biomaterials, for the most varied applications, are not available, leading to dependence on external technology and causing an expanding market to be discredited on the national scene. In this sense, the present study aims to develop and characterize a new injectable scaffold from *Gigartina skottsbergii* algae found in the Latin American continent, which together with its bioproducts can be used in tissue engineering and cell therapy, with initial application in the medical area. To do so, a gel was synthesized and processed from *G. Skottsbergii*, which was analyzed and tested as a new scaffold. Thus, the viability and cell adhesion capacity of the scaffold were evaluated using the WST-1 colorimetric assay, and scanning electron microscopy (SEM), against an immortalized mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) cell line. Data evaluation was performed using the two-way ANOVA followed by the Tukey test with a significance level of $p < 0.05$. In this sense, it is possible to observe the three-dimensional structure of the *G. skottsbergii* algae, as well as the NIH/3T3 cells in this structure. It is observed that the cells are in great quantity and strongly adhered to the algae structure, maintaining an elongated morphology and with extensions. In relation to the evaluation of the three-dimensional structure of the hydrogel from the *G. Skottsbergii* algae and the morphology of the NIH/3T3 cells seeded on it, large areas can be observed for the cellular adhesion, and laminar and filamentar structures that interconnect are seen, adhered to this structure it is possible to observe NIH/3T3 cells with elongated morphology and extensions. Also, it is observed that there was a greater cell viability in the group containing a 1/4 dilution of the gel from the *G. Skottsbergii* algae with 5 hours and culture and also with 48 hours of culture.

Keywords: carrageenan, injectable hydrogel, *Gigartina skottsbergii*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tríade da Engenharia Tecidual.....	26
Figura 2 – Ilustracao Esquemática das Abordagens de Engenharia de Tecidos mais Comuns	27
Figura 3 – Classificação das Células-Tronco.....	29
Figura 4 – Localização das DPSCs e SHEDs.....	31
Figura 5 – Ilustração Esquemática de Hidrogel Injetável para Abordagens de Regeneração de Tecidos.....	41
Figura 6 – <i>Gigartina skottsbergii</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Busca bibliográfica realizada na base de dados PubMed	22
Tabela 2 - Busca de registros de patentes realizada na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).....	23
Tabela 3 - Busca de registros de patentes realizada na base de dados do <i>United States Patent and Trademark Office (USPTO)</i>	23
Tabela 4 - Busca de registros de patentes realizada na base de dados do <i>The European Patent Office (EPO)</i>	24
Tabela 5 - Busca de registros de patentes realizada na base de dados do <i>Canadian Intellectual Property Office - CIPO</i>	24
Tabela 6 – Principais hidrogéis naturais em pesquisa e suas aplicações.....	38
Tabela 7 – Cronograma.....	57
Tabela 8 – Orçamento	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP2 – proteína morfogênica óssea (do inglês *bone morphogenetic protein 2*)

BMSCs - células tronco de medula óssea (do inglês *bone marrow stem cells*)

DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's medium*)

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DPSCs – células-tronco da polpa dental de dentes permanentes (do inglês *dental pulp stem cells from permanent teeth*)

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

FBS – soro fetal bovino (do inglês *fetal bovine serum*)

FO-UFPel – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas

HSV-1 – vírus herpes simplex tipo 1 (do inglês *herpes simplex vírus 1*)

HSV-2 – vírus herpes simplex tipo 2 (do inglês *herpes simplex vírus 2*)

iPSC – células-tronco potencialmente induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cells*)

MEC – matriz extracelular

MEV – microscópio eletrônico de varredura

MSCs – células tronco mesenquimais (do inglês *mesenchymal stem cells*)

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio

NIH/3T3 - linhagem celular imortalizada de fibroblastos embrionários de rato

OPN – proteína osteopontina (do inglês *osteopontin protein*)

PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered saline*)

PEG - polietileno glicol

pH – potencial hidrogeniônico

PPF - polipropileno fumarato

PVA - poli álcool vinílico

SHEDs – células-tronco de polpa dental de dentes decíduos exfoliados (do

inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor*)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
PROJETO.....	14
1 IDENTIFICAÇÃO.....	15
1.1 Título	15
1.2 Mestranda	15
1.3 Orientadora	15
1.4 Instituição	15
1.5 Curso	15
1.6 Linha de Pesquisa	15
1.7 Data	15
2 INTRODUÇÃO	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 JUSTIFICATIVA.....	20
5 ESTRATÉGIA DE BUSCA	22
5.1 Descritores	22
5.2 Artigos encontrados	22
5.3 Patentes encontradas	22
6 REVISÃO DE LITERATURA	25
6.1 Engenharia Tecidual.....	25
6.2 Células-Tronco	28
6.3 Células-Tronco Pulpares.....	31
6.4 <i>Scaffolds</i>	33
6.5 <i>Scaffolds</i> Naturais.....	34
6.6 Hidrogéis Naturais.....	36
6.7 Hidrogéis Injetáveis	40

6.8 Alga Marinha <i>Gigartina skottsbergii</i>	43
7 METODOLOGIA	47
7.1 Procedimentos.....	47
7.1.1 Obtenção da Alga <i>Gigartina skottsbergii</i> e Formação do Gel	47
7.1.2 Ensaio Biológicos	47
7.1.2.1 Linhagens Celulares	47
7.1.2.2 Congelamento das Linhagens Celulares	50
7.1.2.3 Cultivo Celular	50
7.1.2.4 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular com MTT.....	51
7.1.2.5 Ensaio de Adesão e Proliferação Celular com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	52
7.1.2.6 Ensaio de Adesão e Viabilidade Celular DAPI	53
7.1.2.7 Ensaio de Adesão e Viabilidade Celular Live/Dead	53
7.1.3 Ensaio Químicos	54
7.1.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	54
7.1.3.2 Espectroscopia de Raman	55
7.1.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹ H e ¹³ C)	55
7.2 Análise dos Dados.....	56
7.3 Aspectos Éticos.....	56
7.4 Cronograma.....	57
7.5 Orçamento.....	58
8 REFERÊNCIAS	59
ARTIGO	75
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
ANEXOS	98

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento (PPGSC). O mesmo encontra-se dividido em três partes, sendo elas: o projeto intitulado: “Engenharia Tecidual: Desenvolvimento de um novo scaffold injetável para a aplicação na área da saúde”, o artigo: “*Development of a New Injectable Scaffold for Application in Health*”, e as considerações finais. O projeto está formatado segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

O trabalho seguiu o modelo de dissertação indicado pelo PPGSC. A primeira parte do mesmo está subdividida em Identificação; Introdução; Objetivos; Justificativa; Estratégia de Busca; Revisão de Literatura; Metodologia, e Referências. A segunda parte consiste no artigo produzido, o qual refere-se ao desenvolvimento de um scaffold a partir da alga marinha *Gigartina skottsbergii*, a invenção agrega em um único gel diversas características capazes de aumentar a adesão e diferenciação celular, o qual juntamente com os seus bioprodutos possa ser empregado em engenharia tecidual e terapia celular; com aplicação inicial tanto na área industrial como na área medica com baixo custo com vistas a abastecer o mercado nacional e internacional. Na terceira parte da dissertação estão as considerações finais, as quais buscam compilar os principais resultados do estudo.

PROJETO

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Engenharia Tecidual: Desenvolvimento de um novo *scaffold* injetável para a aplicação na área da saúde

1.2 Mestranda: Laísa Camerini da Rosa.

1.3 Orientador: Fernanda Nedel, PhD.

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel).

1.5 Curso: Mestrado em Saúde e Comportamento.

1.6 Linha de pesquisa: Avaliação Biológica em Estudos Pré-Clínicos.

1.7 Data: 08 de Dezembro de 2017.

2. INTRODUÇÃO

Desde o seu surgimento, a engenharia tecidual tem evoluído continuamente com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos para restaurar, substituir ou regenerar tecidos defeituosos (CHAN & LEONG, 2008). A engenharia tecidual envolve tipicamente três componentes principais, os quais são denominados de pilares da engenharia tecidual: células responsivas; *scaffolds*, que podem ser naturais ou sintéticos, para proporcionar uma plataforma para função celular, adesão e transplante; e moléculas sinalizadoras, tais como proteínas e fatores de crescimento derivados das funções celulares de interesse (NEDEL et al, 2009).

As células-tronco possuem diferentes aplicações que têm permitido uma constante evolução na área da saúde, com estudos nas áreas de terapia celular e engenharia tecidual. Elas podem ser comumente definidas como clonogênicas, as quais possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação (NEDEL et al, 2009;18). As células-tronco adultas, ou mesenquimais, possuem alta capacidade de migração e diferenciação, podendo contribuir com o tratamento de lesões ou doenças, favorecendo a regeneração tecidual (GRONTHOS et al, 2002). Nesse contexto, as células-tronco adultas são consideradas uma abordagem viável para a prática clínica. Atualmente, essas células têm sido obtidas do tecido pulpar de dentes permanentes e decíduos, sendo denominadas células-tronco de polpa dental de dentes permanentes (DPSCs) (GRONTHOS et al, 2000) e células tronco de polpa dental de dentes decíduos exfoliados (SHEDs) (MIURA et al, 2003). Desta forma, isso indica que a odontologia é a área da saúde com maior possibilidade de aplicações da engenharia tecidual e terapia (NEDEL et al, 2009).

Os biomateriais desempenham um papel importante no avanço do campo da engenharia tecidual e podem servir como *scaffold* projetado para substituir, reparar e manter estruturas de órgãos (PATEL & FISHER, 2008). Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais que proporcionam um suporte e servem de guia para a colonização, proliferação e diferenciação celular, sendo capaz também de fornecer um conjunto variado de sinais fisiológicos para os tecidos em desenvolvimento (DEMARCO et al, 2010; ZHU, 2010). Portanto, os *scaffolds* exercem as funções estruturais e bioquímicas da matriz extracelular (MEC) nativa até o momento em que as células sejam capazes de produzir a sua própria matriz de suporte (WOO et al, 2007).

Além do desenvolvimento de novos e promissores *scaffolds*, pesquisadores tem buscado identificar diferentes componentes naturais que possam servir como sítios de ancoragem celular e que simultaneamente participem ou conduzam processos de sinalização para as células, permitindo assim, que estas migrem, proliferem e se diferenciem (DEMARCO et al, 2010; ANDRIANI et al, 2000; CREVENSTEN et al, 2004; SYKOVÁ et al, 2006). Considerando-se que as células-tronco são capazes de proliferar, se auto-renovar e diferenciar em múltiplas linhagens, tem sido considerado que estas podem ser altamente induzidas por componentes naturais (SUMITA et al, 2006). Nesse contexto, percebe-se que os avanços da engenharia tecidual têm possibilitado uma grande evolução na área da saúde, principalmente aliando-se com uso de células-tronco (NEDEL et al, 2009).

Nos últimos anos, materiais poliméricos sintéticos e naturais, vêm sendo investigados como biomateriais. No entanto, não existem hoje no mercado brasileiro polímeros biodegradáveis disponíveis para a utilização em processos biológicos aplicados à área da saúde, como sistemas para a confecção de *scaffolds* para engenharia tecidual e *scaffolds* injetáveis para diversas aplicações biológicas e regenerativas (DEMARCO et al, 2010). Os materiais atualmente disponíveis são advindos de importação, representando custo elevado e dependência de tecnologia externa. Um dos fatores limitantes em tornar a engenharia tecidual factível em termos clínicos é a produção de insumos de menor custo, principalmente de biomateriais. Assim, há uma dependência de tecnologia externa fazendo com que um mercado em ampla expansão seja desprestigiado e restringido no cenário nacional.

Durante a última década, *scaffolds* de hidrogel injetáveis têm recebido uma atenção considerável devido à sua composição original e semelhanças estruturais com a MEC natural, além de seu quadro desejável para a proliferação e sobrevivência celular (EL-SHERBINY & YACOUB, 2013). A natureza injetável dos hidrogéis fornece a característica atrativa da distribuição celular fácil e homogênea dentro de qualquer defeito de tamanho ou forma antes da gelificação (NUTTELMAN et al, 1998).

Nesse sentido, as algas marinhas têm sido consideradas promissoras em diversas áreas, visto que possuem diversos componentes com potencial aplicabilidade, sendo estes: pigmentos naturais, minerais essenciais, vitaminas, lipídios, enzimas e polissacarídeos (MOHAMED et al, 2012). Com relação à área da

saúde, diversos estudos vêm mostrando sua aplicação em relação a propriedades antivirais, antialérgicas, anticancerígenas, antiinflamatória, e antioxidante (TSAI & SUN, 2012).

O uso de polissacarídeos como sistemas de suporte para a formação de tecidos revela uma tendência crescente no campo biomédico, onde os polissacarídeos originados de algas marinhas, como a carragenina, desempenham papéis importantes em aplicações biomédicas (POPA et al, 2014). As carrageninas são compostos dependentes da temperatura, sendo solúveis em gel a temperaturas entre 30 e 40 °C, abrindo assim perspectivas para desenvolver sistemas de hidrogel a temperatura corporal (NÚNEZ-SANTIAGO et al, 2011).

Nesse sentido, estudos vêm relatando os sistemas de carragenina sintetizados pelas fases nucleares da alga *Gigartina skottsbergii*, uma alga marinha rodofícea (MATULEWICZ et al, 1989; MATULEWICZ et al, 1990). No entanto, as características e as propriedades específicas desse hidrogel derivado de *G. skottsbergii* quanto ao seu potencial de regeneração ainda não foram exploradas.

Assim, tendo em vista as diversas propriedades terapêuticas desta alga, e sabendo da capacidade de gelificação da carragenina e formação de hidrogel, estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa relevaram que a *G. skottsbergii* quando embebida em meio aquoso possui a capacidade de liberar um componente viscoso, condizente com uma consistência em gel, permitindo vislumbrar aspectos interessantes no sentido de possuir potencial capacidade como *scaffold* injetável para a engenharia tecidual na área da saúde.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo tem por objetivo desenvolver e caracterizar um novo *scaffold* injetável proveniente da alga rodofícea *Gigartina skottsbergii*, encontrada no continente latino americano, o qual juntamente com os seus bioprodutos, possa ser empregado em engenharia tecidual e terapia celular, com aplicação inicial na área medica e industrial.

3.2 Específicos

- Sintetizar e processar um novo *scaffold* injetável a partir da alga marinha *G. skottsbergii* para aplicação na área de engenharia tecidual e terapia celular;
- Avaliar a viabilidade celular do *scaffold*, utilizando-se os ensaios de viabilidade celular MTT ((brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5- difeniltetrazólio)), DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) e Live/Dead, frente a uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos embrionários de rato (NIH/3T3), e a duas linhagens de células-tronco pulpares, sendo uma proveniente de dentes descidos (SHEDs) e outro de dentes permanentes (DPSCs);
- Determinar a microestrutura do *scaffold* injetável por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Determinar a adesão celular dos três tipos celulares (NIH/3T3; SHEDs e DPSCs) ao *scaffold* utilizando-se Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), o ensaio de viabilidade celular DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) e o ensaio de viabilidade celular Live/Dead;
- Caracterizar o *scaffold* injetável quanto a seus aspectos químicos.
- Realizar o deposito do novo *scaffold* na plataforma do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

4. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, materiais poliméricos sintéticos e naturais, vêm sendo investigados como biomateriais. No entanto, não existem hoje no mercado brasileiro polímeros biodegradáveis disponíveis para a utilização em processos biológicos aplicados à área da saúde, como sistemas para a confecção de *scaffolds* para engenharia tecidual e *scaffolds* injetáveis para diversas aplicações biológicas e regenerativas (DEMARCO et al, 2010). Os materiais atualmente disponíveis são advindos de importação, representando custo elevado e dependência de tecnologia externa. Um dos fatores limitantes em tornar da engenharia tecidual factível em termos clínicos é a produção de insumos de menor custo, principalmente de biomateriais. Assim, há uma dependência de tecnologia externa fazendo com que um mercado em ampla expansão seja desprestigiado no cenário nacional.

O uso de polissacarídeos como sistemas de suporte para a formação de tecidos revela uma tendência crescente no campo biomédico, onde os polissacarídeos de origem das algas marinhas, como a carragenina, desempenham papéis importantes em aplicações biomédicas (POPA et al, 2014). A presença de grupos sulfato na sua estrutura e a afinidade química com os glicosaminoglicanos de mamíferos possui papel chave na atividade antiviral, anticoagulante, antioxidante e anticancerígena desses polissacarídeos (VERA et al, 2014). As carrageninas são compostos com comportamento de solubilidade termo-responsivo, sendo solúveis em gel a temperaturas corporais, o que abre perspectivas para desenvolver sistemas de hidrogel (NÚNEZ-SANTIAGO et al, 2011).

Nesse sentido, estudos vêm relatando os sistemas de carragenina sintetizados pela alga *Gigartina skottsbergii* (MATULEWICZ et al, 1989; MATULEWICZ et al, 1990). Esta alga já possui potenciais propriedades terapêuticas contra patologias e doenças neurodegenerativas, promovidos pela sua capacidade e desempenho anti-inflamatório e imunomodulatório (LORENTE-CEBRIÁN et al, 2015), e também por apresentar uma atividade de caráter antioxidante (PALANISWAMY et al, 2004). Já a sua porção polissacarídica de carragenina vem sendo estudada com aplicações antivirais (CARLUCCI et al, 1999; PUJOL et al, 2006).

No entanto, as características e propriedades específicas desse hidrogel derivado de *G. skottsbergii* quanto ao seu potencial de regeneração ainda não foram explorados. Assim, tendo em vista as diversas propriedades terapêuticas desta alga,

e sabendo da capacidade de gelificação da carragenina e formação de hidrogel, é possível vislumbrar aspectos interessantes no sentido dos objetivos deste projeto onde a alga *G. skottsbergii* mostra possuir potencial capacidade como *scaffold* injetável para a engenharia tecidual na área da saúde.

5. ESTRATÉGIAS DE BUSCA

5.1 Descritores

Para a realização da busca bibliográfica de trabalhos na área do presente projeto, utilizou-se a base de dados *National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed)*, utilizando-se os seguintes descritores: *tissue scaffolds*, *tissue engineering*, *hydrogel*, *natural tissue scaffolds*, *stem cells*, *adult stem cells*, *cell therapy*, *dental pulp*, *red algae* e *Gigartina skottsbergii*.

5.2. Artigos encontrados

A busca através dos descritores utilizados proporcionou um total de 8.070 artigos na base de dados *PubMed*. Do total de 8.070 artigos encontrados foram selecionados 130 artigos após um refinamento na busca de acordo com a especificidade e objetividade do estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Busca bibliográfica realizada na base de dados PubMed.

Descritores	Total de Artigos	Artigos Selecionados
<i>Tissue Engineering AND Tissue Scaffolds</i>	6.495	25
<i>Natural Tissue Scaffolds AND Adult Stem Cells</i>	642	21
<i>Hydrogel AND Tissue Scaffolds</i>	305	32
<i>Adult Stem Cells AND Cell Therapy AND Tissue Scaffolds</i>	594	26
<i>Dental Pulp AND Stem Cells AND Cell Therapy</i>	17	14
<i>Gigartina skottsbergii</i>	17	12
<i>Gigartina skottsbergii AND Tissue Engineering</i>	0	0
<i>Gigartina skottsbergii AND Tissue Scaffolds</i>	0	0
<i>Gigartina skottsbergii AND Hydrogel</i>	0	0
<i>Gigartina skottsbergii AND Stem Cells</i>	0	0
Total	8.070	130

5.3. Patentes Encontradas

A busca através dos descritores utilizados proporcionou um total de 121 registros de patentes nas bases de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI (Tabela 2), *United States Patent and Trademark Office - USPTO* (Tabela 3), *The European Patent Office - EPO* (Tabela 4) e *Canadian Intellectual Property Office - CIPO* (Tabela 5). Apesar do número de registros encontrados, não

foi identificada nenhuma patente que reúna todas as características da patente proposta nesta dissertação.

Tabela 2. Busca de registros de patentes realizada na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Descritores	Total de Registros
<i>Gigartina skottsbergii</i>	0
<i>Alga marinha</i>	7
<i>Cuero de chancho</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND cuero de chancho</i>	0
<i>Roja luga</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND roja luga</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND hidrogel</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND scaffold</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND fração Lipídica</i>	0
<i>Alga marinha AND hidrogel</i>	0
<i>Alga marinha AND scaffold</i>	0
Total	7

Tabela 3. Busca de registros de patentes realizada na base de dados do *United States Patent and Trademark Office* (USPTO).

Descritores	Total de Registros
<i>Gigartina skottsbergii</i>	22
<i>Gigartina skottsbergii AND sea algae</i>	1
<i>Cuero de chancho</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND cuero de chancho</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii OR cuero de chancho</i>	22
<i>Roja luga</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND roja luga</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii OR roja luga</i>	22
<i>Gigartina skottsbergii AND hydrogel</i>	2
<i>Gigartina skottsbergii AND scaffold</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii AND lipid fraction</i>	0
<i>Sea algae AND hydrogel</i>	24
<i>Sea algae AND scaffold</i>	16
Total	109

Tabela 4. Busca de registros de patentes realizada na base de dados do *The European Patent Office (EPO)*.

Descritores	Total de Registros
<i>Gigartina skottsbergii</i>	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND sea algae	0
Cuero de chancho	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND cuero de chancho	0
Roja luga	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND roja luga	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND hydrogel	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND scaffold	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND lipid fraction	0
Sea algae AND hydrogel	0
Sea algae AND scaffold	0
Total	0

Tabela 5. Busca de registros de patentes realizada na base de dados do *Canadian Intellectual Property Office (CIPO)*.

Descritores	Total de Registros
<i>Gigartina skottsbergii</i>	1
Algae <i>Gigartina skottsbergii</i>	0
Cuero de chancho	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND cuero de chancho	1
<i>Gigartina skottsbergii</i> OR cuero de chancho	0
Roja luga	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND roja luga	1
<i>Gigartina skottsbergii</i> OR roja luga	1
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND hydrogel	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND scaffold	0
<i>Gigartina skottsbergii</i> AND lipid fraction	0
Sea algae AND hydrogel	0
Sea algae AND scaffold	1
Total	5

6. REVISÃO DE LITERATURA

6.1 Engenharia Tecidual

Atualmente, um grande e importante problema de saúde pública é a falência de tecidos e órgãos em função de injúrias ou outros tipos de danos. Quando isso ocorre, existem diferentes possibilidades de tratamento, como transplantes, reparos cirúrgicos, próteses artificiais, dispositivos mecânicos e terapias medicamentosas. Entretanto nem sempre esses tratamentos são eficazes, podendo ter, em alguns casos, efeitos colaterais ou mesmo não ter um potencial de reparo nem de recuperação em longo prazo (LANGER & VACANTI, 1993).

Nesse sentido, surge nos anos de 1980 a engenharia tecidual apresentando-se como uma possível alternativa, tendo como objetivo desenvolver substitutos biológicos para restaurar, substituir ou regenerar tecidos (CHAN & LEONG, 2008). Assim, esta vem emergindo como uma alternativa ou como uma solução complementar, onde o tratamento é abordado através da implantação de tecidos e órgãos naturais que mimetizem ou que desenvolvam gradualmente a funcionalidade da estrutura perdida (VACANTI & LANGER, 1999; LANGER, 2000).

Com a evolução acerca dos conhecimentos da engenharia tecidual foi estabelecido que ela envolve tipicamente três componentes principais, como ilustrado na Figura 1, os quais são denominados de Pilares da Engenharia Tecidual (NEDEL et al, 2009). São estes: células selecionadas e isoladas (células progenitoras ou células tronco de diferentes origens); *scaffolds*, que podem ser naturais ou sintéticos, para proporcionar uma plataforma para a função celular, adesão e transplante; e moléculas sinalizadoras, tais como proteínas e fatores de crescimento derivados das funções celulares de interesse. Além disso, em muitas abordagens de engenharia tecidual pode se fazer necessário a utilização de biorreatores que suportem um ambiente biologicamente ativo para a expansão de células e diferenciação (LANGER & VACANTI, 1993; NEDEL et al, 2009; EL-SHERBINY & YACOUB, 2013).

No entanto, existe ainda a necessidade de uma rede vascular no tecido, formado a partir da engenharia tecidual, o qual auxilia no processo de desenvolvimento do sítio de reparo. A vascularização fornece às células O_2 e nutrientes, e excreção de CO_2 , permitindo a sobrevivência, funcionalidade, organização estrutural e integração entre o tecido formado e o tecido circundante no

sítio de reparo (NEDEL et al, 2009). A grande maioria dos tecidos do organismo depende de um sistema de vasos sanguíneos ramificados, onde somente em alguns tecidos como a pele, a cartilagem e a córnea, podem ser suplementados com nutrientes e oxigênio provenientes de uma rede de vasos sanguíneos próximos por meio da difusão, justificando, assim, o sucesso da engenharia tecidual nas áreas de reconstrução de pele e cartilagem (NEDEL et al, 2009).

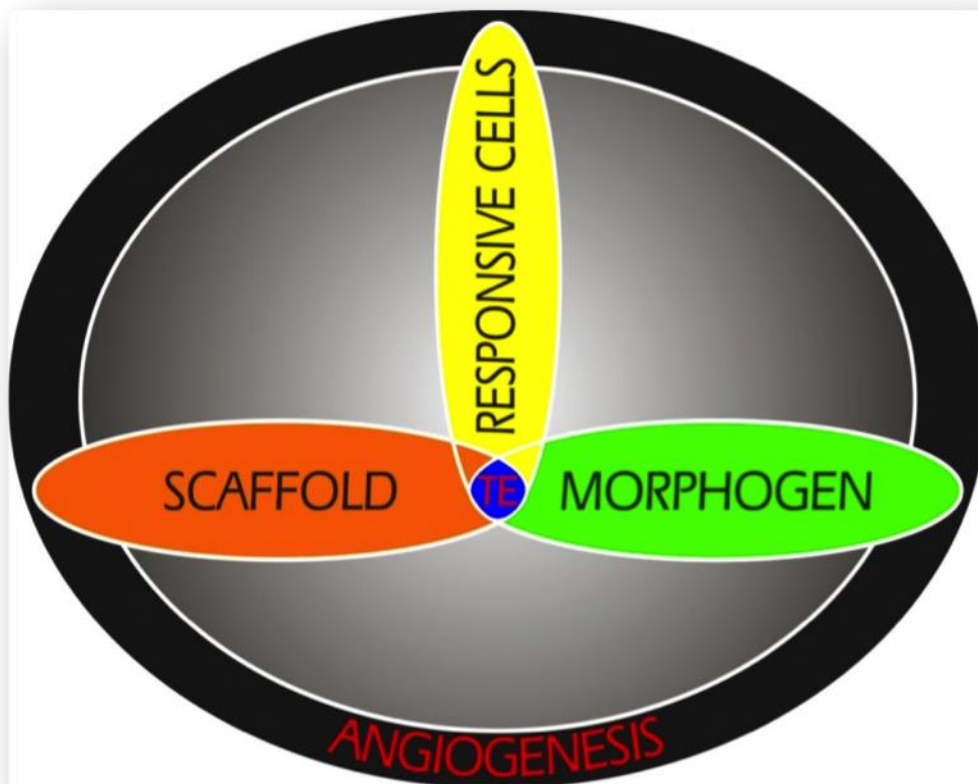


Figura 1. Tríade da Engenharia Tecidual. Os três componentes da engenharia de tecidos são: scaffolds, células com capacidade de resposta e moléculas sinalizadoras. Além disso, a angiogênese desempenha um papel importante na engenharia tecidual sendo necessária para a maioria dos tecidos, pois a ausência do aporte sanguíneo adequado pode desencadear a morte celular, levando a falha da implantação tecidual do tecido bioengenhado. (Fonte: Nedel, 2009).

Os tecidos ou órgãos podem ser potencialmente desenvolvidos através de uma série de abordagens, a abordagem mais comum (Figura 2) envolve: 1 - Isolamento de células de tecidos específicos do paciente, por meio de uma pequena biópsia. 2 - Cultivo e expansão *in vitro* das células isoladas. 3 e 4 - Células são semeadas e expandidas em *scaffolds* tridimensionais que imitam a matriz extracelular (MEC) nativa dos tecidos alvos, exercendo as funções estruturais e

bioquímicas até o momento em que as células sejam capazes de produzir a sua própria matriz de suporte. 5 - Os *scaffolds* carregados de células são subsequentemente transplantados para o paciente, através de injeção direta com o auxílio de uma agulha ou outra técnica de entrega minimamente invasiva, ou por meio de implantação de tecido bioengenhado no local desejado através de um procedimento cirúrgico (LEE & MOONEY, 2001).

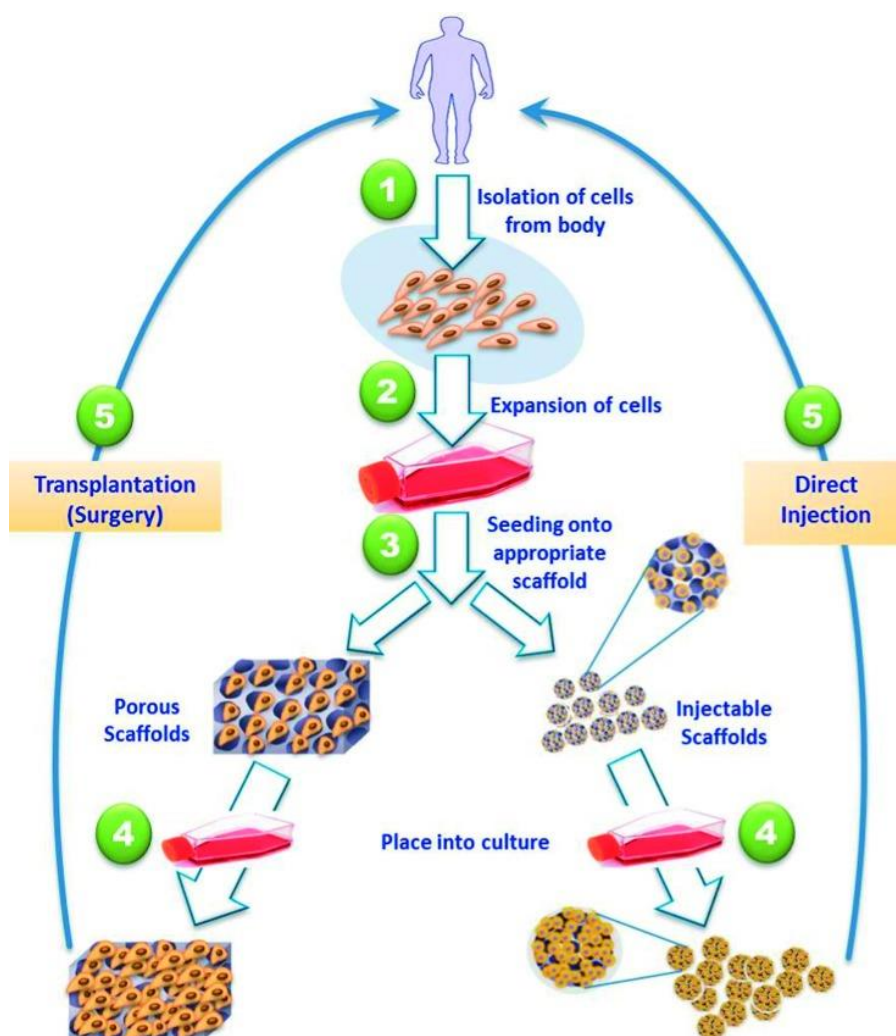


Figura 2. Ilustração esquemática das abordagens de engenharia de tecidos mais comuns. Células de tecidos específicos são isoladas a partir de uma pequena biópsia do paciente, expandidas *in vitro*, semeadas em um scaffold bem concebido e transplantadas para o paciente. Onde: 1) Isolamento de células de tecidos específicos do paciente, por meio de uma pequena biópsia. 2) Cultivo e expansão *in vitro* das células isoladas. 3 e 4) Células são semeadas e expandidas em *scaffolds* tridimensionais que imitam a matriz extracelular (MEC) nativa dos tecidos alvos, exercendo as funções estruturais e bioquímicas até o momento em que as células sejam capazes de produzir a sua própria matriz de suporte. 5) Os *scaffolds* carregados de células são subsequentemente transplantados para o paciente, através de injeção direta com o auxílio de uma agulha ou outra técnica de entrega minimamente invasiva, ou por meio de implantação de tecido bioengenhado no local desejado através de um procedimento cirúrgico. (Fonte: El-Sherbiny & Yacoub, 2013).

Os biomateriais desempenham um papel importante no avanço do campo da engenharia tecidual e resultam da união de diferentes áreas do conhecimento, tais como o da saúde, dos materiais e da engenharia (PATEL & FISHER, 2008). Desta forma, são considerados como materiais utilizados para substituir parte de um sistema vivo ou para funcionar em íntimo contato com tecido vivo (LANGER & TIRRELL, 2004). Nesse sentido, os biomateriais podem servir como scaffold projetado para substituir, reparar e manter tecidos ou órgãos, com uma variedade de aplicações em engenharia tecidual.

6.2 Células-Tronco

Atualmente, a área da saúde, em especial a que engloba abordagens como a terapia celular, a biologia molecular e a engenharia tecidual, têm investido em estudos com células-tronco devido ao seu potencial terapêutico. Estas células possuem uma ampla gama de aplicações, o que tem permitido uma constante evolução na área pré-clínica e conseqüentemente na área clínica e de saúde pública (LIU et al, 2016; MENASCHÉ & VANNEAUX, 2016; ZHANG et al, 2016). As células-tronco são definidas cientificamente como sendo clonogênicas, as quais possuem um grande potencial de auto-renovação, isto é, com capacidade de gerar uma cópia idêntica a si mesma; e diferenciação em múltiplas linhagens celulares (D'ALQUINO et al, 2009; NEDEL et al, 2009). Estas propriedades, por sua vez, vêm instigando a comunidade científica a investir em estudos relacionados a regeneração tecidual (LIU et al, 2016), a processos inflamatórios (SEO & JUNG, 2016), a tratamentos ortopédicos (KHAN et al, 2012) e a doenças autoimunes (ARRUDA et al, 2016).

As células-tronco possuem diferentes classificações (Figura 3), podendo ser: - Totipotentes, aquelas que são capazes de diferenciarem-se em todos os 216 tecidos que formam o corpo humano (FORTIER, 2005); - Pluripotentes ou Multipotentes, aquelas células capazes de diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos, com exceção da placenta e anexos embrionários (FISCHBACH & FISCHBACH, 2004); - Oligotentes, aquelas células que se diferenciam em poucos tecidos (FORTIER, 2005); - Unipotentes, aquelas células que se diferenciam em um único tecido (FORTIER, 2005). Além disso, as células-tronco podem ser classificadas de acordo com a sua origem em: Embrionárias, Pluripotentes Induzidas e Adultas (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; MORGANI et al, 2013). Desta forma, torna-se essencial conhecer cada tipo de célula-tronco a fim de justificar que, apesar das distintas

fontes, as células-tronco originadas da polpa dental podem mostrar-se vantajosas quando comparadas as células-tronco de outras fontes, visto que possuem um método de isolamento não invasivo e de rápida expansão *in vitro* (DE MENDONÇA COSTA et al, 2008).

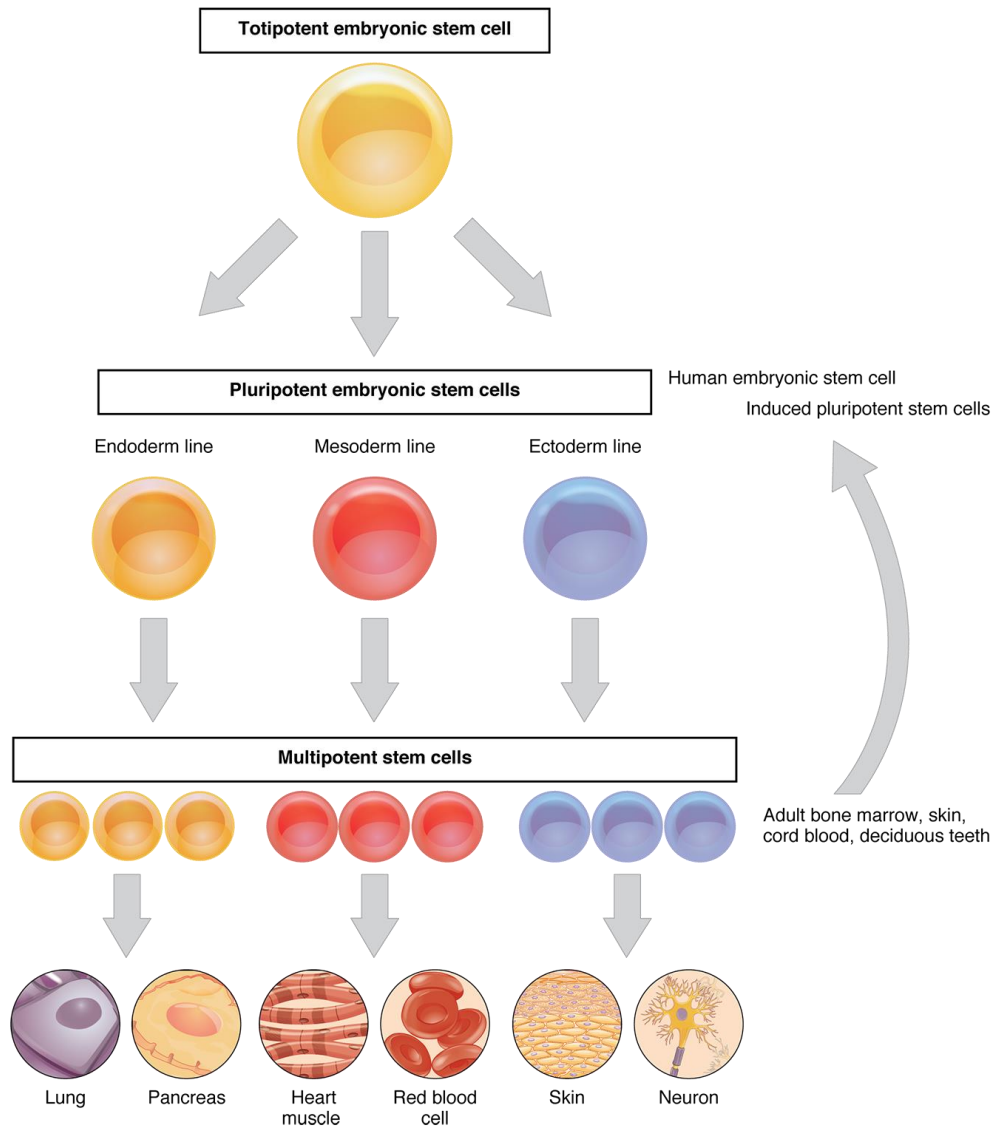


Figura 3. Classificação das Células-Tronco. As células tronco Totipotentes são aquelas que são capazes de diferenciarem-se em todos os 216 tecidos que formam o corpo humano. As Pluripotentes ou Multipotentes, são aquelas células capazes de diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos, com exceção da placenta e anexos embrionários. As Oligotentes, são aquelas células que se diferenciam em poucos tecidos, e as Unipotentes, são aquelas células que se diferenciam em um único tecido (Fonte: <http://oerpub.github.io/epubjs-demo-book/content/m46036.xhtml>).

As células-tronco embrionárias são pluripotentes (CASAGRANDE et al, 2011) e possuem a sua origem na massa interna de blastocistos, podendo ser chamadas dessa forma de células primitivas (MORGANI et al, 2013). Apesar de serem consideradas ideologicamente como o melhor tipo de célula-tronco para se

trabalhar, devido a sua capacidade de diferenciação pluripotente, o emprego de células-tronco embrionárias possui obstáculos éticos, pois a sua utilização acarreta na destruição do blastocisto. Desta forma, as células-tronco adultas tornam-se uma abordagem mais viável para a prática clínica e científica (NEDEL et al, 2009).

E visto dos obstáculos éticos recentemente mencionados, foram desenvolvidas as células-tronco potencialmente induzidas, também chamadas de iPSCs (do inglês *induced pluripotent stem cells*) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). De forma resumida, Takahashi e Yamanaka (2006) transformaram células diferenciadas em células semelhantes às células-tronco embrionárias, através da inserção de um conjunto de fatores de transcrições (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4) no genoma da célula diferenciada, os quais convertem o estado transcricional e epigenético para um estado pluripotente (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). No entanto, surgiu assim outro obstáculo, limitando as aplicações das iPSCs, visto que estas células possuem um alto potencial tumorigênico quando comparadas com as células-tronco embrionárias (BAUMANN, 2013).

Por fim, as células-tronco adultas, como todas as células-tronco, podem dar origem a tipos de células maduras que têm morfologias características e funções especializadas (ROBEY, 2000). Suas funções primárias são manter o estado estável e funcional de uma célula, função essa chamada de homeostase e, com limitações, substituir as células que morrem por causa de lesão ou doença (HOLTZER, 1978). Além disso, as células-tronco adultas são dispersas nos tecidos e comportam-se de forma muito diferente, dependendo do seu local (WEISSMAN, 2000). Por exemplo, as células-tronco hematopoéticas estão constantemente sendo gerados na medula óssea, onde se diferenciam em tipos maduros de células sanguíneas (DOMEN & WEISSMAN, 1999). Idealmente, as células-tronco adultas também devem ser clonogênicas, ou seja, uma única célula-tronco adulta deve ser capaz de gerar uma linha de células geneticamente idênticas, que então dá origem a todos os tipos celulares diferenciados apropriados do tecido em que reside, entretanto essa diferenciação é limitada em comparação aos outros tipos de células-tronco (LEBLOND, 1964).

Dentre os diferentes tipos de células-tronco adultas encontram-se as células-tronco mesenquimais, as quais possuem como origem a crista neural durante o desenvolvimento embrionário, e têm grande capacidade de migração e diferenciação. Mesmo após a morfogênese, as características de células-tronco

ainda podem ser encontradas em diversos tecidos, contribuindo com o tratamento de lesões e doenças; e favorecendo a regeneração tecidual (MAO et al, 2006). Estas células influenciam na morfogênese do tecido ósseo, cartilaginoso, muscular, ligamentar, periodontal e dental, participando, segundo os achados de Gronthos (2002), ativamente na formação de praticamente todas as estruturas craniofaciais (GRONTHOS et al, 2002). Estudos a partir do ano de 2000, identificaram que as células-tronco mesenquimais podem ser obtidas do tecido pulpar de dentes permanentes, sendo denominadas DPSCs (*dental pulp stem cells*) (GRONTHOS et al, 2000) e decíduos, sendo denominadas SHEDs (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) (MIURA et al, 2003) (Figura 4), o que possibilitou um novo olhar para aplicações em terapia celular e engenharia tecidual.



Figura 4. Localização das DPSCs e SHEDs. As células tronco DPSCs (células tronco da polpa dental de dentes permanentes) e SHEDs (células tronco da polpa dental de dentes decíduos exfoliados) estão localizadas na polpa dental de dentes permanentes e decíduos, respectivamente. (Fonte: Liu, 2015).

6.3 Células-Tronco Pulpaes

As primeiras células-tronco pulpaes a serem isoladas foram as DPSCs, há cerca de uma década e meia (GRONTHOS et al, 2000). Os estudos identificaram que as DPSCs apresentam, *in vitro*, uma alta frequência na formação de colônias, e alta taxa de proliferação, sendo estas, segundo os estudos, maiores que as taxas apresentadas pelas células tronco mesenquimais da medula óssea (GRONTHOS et al, 2000). Desta forma, a justificativa para a diferença quantitativa na proliferação dos tipos celulares reside no fato de que os dentes usados para a obtenção das DPSCs são geralmente os terceiros molares, ou seja, os últimos dentes a se desenvolverem plenamente, possuindo assim um maior perfil de células-tronco (GRONTHOS et al, 2000).

As perspectivas para aplicações terapêuticas clínicas utilizando as DPSCs têm sido animadoras, em parte devido ao seu alto potencial osteogênico. Estudos

focados na formação de tecido ósseo ao redor de implantes dentários (ITO et al, 2011) e tratamento de reabsorções ósseas (D'ALQUINO et al, 2009) são alguns dos diversos exemplos que podem ser citados. Entretanto, as perspectivas do uso destas células não são apenas para a área odontológica, visto que as DPSCs podem também se diferenciar em células hepáticas (ISHKITIEV et al, 2010), musculares (KARAOZ et al, 2011), adipogênicas (KARAOZ et al, 2011), neuronais (KARAOZ et al, 2011), condrogênicas (KARAOZ et al, 2011) e em células vasculares endoteliais (KARAOZ et al, 2011). Desta forma, as DPSCs se tornam um tipo de célula-tronco de grande aplicabilidade e futuro na terapia celular e engenharia tecidual.

Apenas três anos depois de isoladas as DPSCs, houve a descoberta e isolamento das SHEDs (MIURA et al, 2003) (Figura 4). Esta descoberta foi de grande valia para a área clínica de terapia celular, visto que se pôde assim obter uma fonte celular com dentes naturalmente perdidos, sendo esta uma forma de obtenção minimamente invasiva (MIURA et al, 2003).

É importante ressaltar que existem diferenças com relação à proliferação celular entre as DPSCs e as SHEDs, onde a segunda têm demonstrado um maior potencial proliferativo (MIURA et al, 2003). Desta forma, as SHEDs têm contribuído para o avanço de tratamentos médicos, como por exemplo, atuando em conjunto com o fator de crescimento de fibroblasto básico (b-FGF), o que possibilita a realização de terapias para a cicatrização de feridas (NISHINO et al, 2011).

Nesse contexto, células-tronco adultas são consideradas uma abordagem viável visando a transição para a prática clínica (NEDEL et al, 2009), sendo as células-tronco pulpares uma das células com maior possibilidade de aplicações na engenharia tecidual (CHEN et al, 2012) e terapia celular (VALKO et al, 2007). Um exemplo disso é a capacidade de regeneração da polpa dental, que, apesar de ser limitada, em resposta a estímulos tem a habilidade de ativar células presentes no interior do tecido para se diferenciarem em células odontoblasto-*símile*, e assim produzir dentina regenerativa (ARANA-CHAVEZ et al, 2004).

Assim, um estudo com o objetivo de regeneração da polpa dental, verificou que scaffolds poderiam influenciar na proliferação e na diferenciação das DPSCs (DEMARCO et al, 2010). Foi observado que as células aderiram e proliferaram em scaffolds com porosidades cúbicas ou arredondadas, havendo, porém, um aumento

da expressão de marcadores de diferenciação quando foi realizada a funcionalização da superfície com a deposição de colágeno (DEMARCO et al, 2010).

De posse destes conhecimentos, os resultados obtidos até então indicam que em curto prazo, a odontologia poder ser a área da saúde com maior perspectiva de aplicações das abordagens terapêuticas envolvendo células-tronco, transladando as suas potencialidades para as diferentes áreas médicas (GRONTHOS et al, 2000; NEDEL et al, 2009). Alguns exemplos futuros incluem o uso das células-tronco pulpares onde os tecidos encontram-se cercados por tecido ósseo, como nas articulações e no cérebro, além da possibilidade de serem empregadas em tecido conjuntivo localizado em outras regiões (NOR, 2006).

6.4 Scaffolds

Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais que possuem como finalidade proporcionar suporte, além de serem guias para a colonização, proliferação e diferenciação celular, sendo capazes também de fornecer sinalizações fisiológica para os tecidos em desenvolvimento (NÖR, 2006; DEMARCO et al, 2010). Os materiais para a construção de *scaffolds* podem ser sintéticos ou biológicos, degradáveis ou não degradáveis, dependendo do uso pretendido (DHANDAYUTHAPANI et al, 2011).

Funções análogas em relação a MEC de *scaffolds* na engenharia tecidual incluem fornecer suporte estrutural para células aplicadas exogenamente ou endógenas se aderirem, crescerem, migrarem e se diferenciarem *in vitro* e *in vivo*; proporcionar a forma, a estabilidade mecânica e a rigidez para o defeito tecidual; servir como veículo de entrega e de reservatório para fatores estimuladores de crescimento aplicados exogenamente; e fornecer um volume vazio para a vascularização e a formação de um novo tecido durante a remodelação (LANGER & TIRRELL, 2004).

Neste sentido, a engenharia tecidual tem desenvolvido e aprimorado *scaffolds* que mimetizam a própria MEC, utilizando-a como modelo e padrão ouro. Portanto, os *scaffolds* exercem as funções estruturais e bioquímicas da MEC nativa até o momento em que as células sejam capazes de produzir a sua própria matriz de suporte (WOO et al, 2003; WOO et al, 2007).

A MEC, por sua vez, é uma mistura de proteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos que proporciona para as células um ambiente tridimensional

dinâmico com uma arquitetura em nano-escala. O colágeno fibroso, que é um dos componentes da MEC, é composto por estruturas nanométricas tornando possível o contato direto de uma única célula com várias fibras da MEC, através de ligações com proteínas de membranas, como as integrinas. Assim, estas interações entre as fibras da MEC e as células são essenciais para a migração, proliferação, diferenciação, estabilidade mecânica, além da sinalização celular (BARNES et al, 2007; JOHNSON et al, 2011).

No entanto, antes de desenvolver um *scaffold* para a aplicação na engenharia tecidual, as propriedades físico-químicas e biológicas têm de ser avaliadas. Para tanto, torna-se importante um conjunto de aspectos fundamentais na concepção ou determinação da adequabilidade deste *scaffold*. O primeiro aspecto fundamental é biocompatibilidade; as células devem aderir normalmente, migrando para a superfície e/ou através do *scaffold*; onde devem começar a proliferar antes de estabelecer uma nova matriz (PATEL & FISHER, 2008). Não menos importante, os *scaffolds* desenvolvidos devem possuir uma boa biodegradabilidade, visto que estes geralmente não são planejados para serem implantes permanentes, onde o *scaffold* deve permitir que as células produzam a sua própria MEC (GILBERT et al, 2007; VAN AMERONGEN et al, 2006).

No que tange as propriedades físico-químicas, o *scaffold* deve ter características consistentes com a localização anatômica onde será implantado e, a partir de um ponto de vista prático, tem de ser rígido/flexível o suficiente para permitir a manipulação cirúrgica durante a implantação. Por fim, uma adequada arquitetura do *scaffold* é fundamental, onde o mesmo deve ter uma estrutura de alta porosidade, onde os poros encontram-se interconectados, para assegurar a infiltração celular e viabilizar uma adequada difusão de nutrientes, O₂ e CO₂ (HOLLISTER et al, 2002). Sendo assim, um equilíbrio entre propriedades mecânicas, arquitetura porosa, biocompatibilidade e biodegradabilidade, são chaves para o sucesso de qualquer *scaffold*.

6.5 Scaffolds Naturais

Biomateriais sintéticos ainda vêm sendo amplamente utilizados como *scaffolds*, onde as principais classes incluem derivados de ácido glicólico, derivados de ácido láctico e derivados de poliéster, como polietileno glicol (PEG), poli álcool vinílico (PVA), polipropileno fumarato (PPF) e polipeptídeos, que estão entre os

polímeros sintéticos mais amplamente utilizados para hidrogéis. (DRURY & MOONEY, 2003). Outros estudos vêm avaliando o potencial da associação entre polímeros sintéticos, como o *scaffold* copolímero de L-lítido e L-caprolactona (50:50) semeado com células de medula óssea autólogas para aplicações na engenharia de tecidos cardiovasculares pediátricos (SHIN'OKA et al, 2005).

Entretanto, apesar da vasta pesquisa para o desenvolvimento de *scaffolds* sintéticos, atualmente diversos pesquisadores têm buscado identificar compostos naturais que possam servir como sítios de ancoragem celular, além de conduzir processos de sinalização para as células permitindo a migração, proliferação e diferenciação das mesmas (CHEN et al, 2005; SILVA et al, 2008; D'ALQUINO et al, 2009). Nesse sentido, já é consolidado que os produtos naturais têm sido muito utilizados na indústria farmacêutica, onde possuem a capacidade de modular a resposta celular em alguns estados patológicos (MEINEL et al, 2004; KIM et al, 2013). Considerando-se que as células-tronco são capazes de proliferar, se auto-renovar e diferenciar em múltiplas linhagens, tem sido considerado que estas podem ser altamente induzidas por componentes naturais (NEDEL et al, 2009).

Scaffolds naturais são compostos de proteínas ou hidratos de carbono, com propriedades estruturais, bioquímicas e mecânicas particulares. Eles podem ser derivados de fontes vegetais ou animais, e são principalmente biocompatíveis e biodegradáveis. Estes *scaffolds* têm uma maior vantagem devido à presença de grupos multifuncionais nas suas superfícies, o qual pode ser adaptado de acordo com as aplicações específicas. Por exemplo, o colágeno (BÖHM et al, 2017), a quitosana (WESTIN et al, 2017), o ácido hialurônico (SADLIK et al, 2017), a fibrina (SOLEIMANNEJAD et al, 2017), a gelatina (HUH et al, 2017) e o alginato (HIRSCH et al, 2017) são todos *scaffolds* naturais, que foram aplicados para a reparação e reconstrução de tecidos.

A utilização de produtos naturais com intuito de modular o comportamento celular, vêm mostrando que o extrato Acemannan, proveniente da Aloe vera, pode aumentar significativamente a atividade de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), BMP-2 (proteína morfogênica óssea), e fosfatase alcalina, além de aumentar a expressão de BSP (sialoproteína óssea) e OPN (proteína osteopontina) e da atividade da ATPase das células-tronco de medula óssea (BMSCs) (BOONYAGUL et, 2014). Estes dados sugerem que o extrato Acemannan poderia funcionar como uma molécula bioativa induzindo a formação óssea por meio da

estimulação da diferenciação das BMSCs em osteoblastos e síntese de matriz extracelular, sendo assim um biomaterial candidato natural para a regeneração óssea (BOONYAGUL et, 2014).

Além disso, o Icarin, um flavonóide da erva *Epimedium*, pode estimular a proliferação e aumentar a diferenciação osteogênica das BMSCs (CHEN et al, 2005). Outro grupo de pesquisadores identificou que a ginsenoside Rg1, contida no ginseng, era capaz de promover a proliferação das BMSCs através do receptor de estrogênio (LU et al, 2008). Kim e colaboradores descobriram que a *Aconiti lateralis Radix Preparata* possuía a capacidade de induzir a taxa de proliferação das BMSCs de 122.24% a mais em relação ao grupo controle (KIM et al, 2013).

Além de realizar um efeito indutor sobre as células, os produtos naturais têm sido identificados como importantes fatores de adesão. Neste sentido, Silva (2008) demonstrou que o gel da Aloe Vera associado com quitosana contribui para uma melhora na adesão celular de fibroblastos na superfície destas membranas. O mesmo grupo tentou então mimetizar o ambiente natural da cartilagem por meio da adição de hidrogel composto de quitosana e genipina, um agente de ligação isolado da planta *Gardenia jasminoides Ellis* (nome popular Gardênia). Os resultados mostraram que a genipina promoveu a formação de uma estrutura estável com elevada aderência, proliferação e produção de matriz por células semelhantes à condrócitos (SILVA et al, 2008).

Outro biomaterial que vêm sendo muito estudado é a fibroína de seda, um polímero de proteína produzida por *Bombyx mori* (bicho da seda). As fibras de seda já vêm sendo utilizadas durante muitos anos como um material de sutura e possuem fortes características para serem usadas como *scaffolds* para engenharia de tecidos, uma vez que estas podem ser transformadas em vários formatos, incluindo matrizes porosas. Além disso, a taxa de degradação pode ser controlada e têm tanto uma resistência mecânica quanto tenacidade. Estes *scaffolds* têm sido utilizados junto de células-tronco mesenquimais humanas com sucesso para gerar uma variedade de tecidos, tais como osso e cartilagem (MEINEL et al, 2004 A; MEINEL et al, 2004 B).

6.6 Hidrogeis Naturais

A criação de um *scaffold* com ótimas características é um dos componentes chave para uma engenharia tecidual bem sucedida (FISHER et al, 2010). Durante a última década, *scaffolds* de hidrogel têm recebido uma atenção considerável devido

à sua composição original e semelhança estrutural com a MEC natural. Ainda, apresentam características desejáveis para a proliferação e sobrevivência celular (EL-SHERBINY et al, 2013), visto que podem imitar as propriedades físicas, químicas, elétricas e biológicas da maioria dos tecidos biológicos (SLAUGHTER et al, 2008).

O aparecimento de hidrogéis data de mais de 50 anos, quando Wichterle (1960), desenvolveu e investigou um hidrogel baseado em polimetacrilato de 2-hidroxietil na aplicações de lentes de contato (SLAUGHTER et al, 1960). Durante a última década, novas aplicações para os hidrogéis têm surgido especialmente na engenharia tecidual, imunomodulação, terapias celulares e moleculares, e pesquisa do câncer (DISCHER et al, 2009; TIBBITT et al, 2009).

Os hidrogéis são redes tridimensionais compostos de polímeros hidrofílicos reticulados através de ligações covalentes ou mantidos juntos através de atrações físicas inter e intramoleculares (FISHER et al, 2004). Hidrogéis podem absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos e inchar facilmente sem se dissolverem (KAIHARA et al, 2008). A elevada hidrofiliabilidade dos hidrogéis é particularmente devido à presença de porções hidrofílicas tais como carboxila, amida, amina e grupos hidroxila distribuídos ao longo da espinha dorsal de cadeias poliméricas (MOREAU et al, 2007). No estado inchado, os hidrogéis são macios e elásticos, assemelhando-se, em grande parte aos tecidos vivos. Além disso, muitos hidrogéis naturais têm mostrado biocompatibilidade desejável e vêm sendo pesquisados para aplicações na área de engenharia tecidual, como mostra a Tabela 2 (Kyung et al, 2002; ANDRIANI et al, 2000). Ainda, as aplicações desses hidrogéis biodegradáveis estão agora cobrindo usos tanto biomédicos e não-biomédicos (FERRETTI et al, 2006).

Tabela 6. Principais hidrogéis naturais em pesquisa e suas aplicações.

Tipo de hidrogel	Aplicação	Referência
Ácido Hialurônico	Condrogênese a partir de células-tronco derivadas de tecido adiposo	Amann <i>et al.</i> , 2017
Alginato	Cultivo de células de músculo esquelético	Pollot <i>et al.</i> , 2017
Alginato/colágeno	Diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo	Cheng <i>et al.</i> , 2017
Colágeno	Cultivo de células neuronais	Antman-Passig <i>et al.</i> , 2017
Colágeno	Engenharia de tecido de polpa dental	Galler <i>et al.</i> , 2017
Colágeno	Cultivo de células de músculo esquelético	Pollot <i>et al.</i> , 2017
Colágeno	Cultivo de células tronco do líquido amniótico para reparo de danos diafragmáticos em neonatos	Shieh <i>et al.</i> , 2017
Colágeno Quitosana	Cultivo de células de músculo esquelético	Pollot <i>et al.</i> , 2017
Fibrina	Engenharia de tecido de polpa dental	Galler <i>et al.</i> , 2017
Fibrina	Cultivo de células de músculo esquelético	Pollot <i>et al.</i> , 2017
Quitosana	Reparo de danos em cartilagem	Comblain <i>et al.</i> , 2017
Quitosana	<i>Scaffold</i> para transplante de células tronco mesenquimais em ratos	Xu <i>et al.</i> , 2017
Quitosana/celulose	Proliferação de células osteoblásticas MC3T3-E1	Wang <i>et al.</i> , 2017

Foi descoberto que os hidrogéis, além de servirem como *scaffolds*, poderiam ser usados com sucesso para encapsular células, criando um ambiente célula-*scaffold*, (YOON & FISHER, 2006; YOON et al, 2007), e ser utilizado na entrega de drogas. Neste sentido, um estudo recente avaliou a eficácia de um hidrogel de Aloe vera, sob a forma de um emplastro bioadesivo para o tratamento de estomatite aftosa (feridas na boca) em pacientes pediátricos (ANDRIANI et al, 2000). Uma melhora da sintomatologia começou no 2º dia de tratamento em 74% dos pacientes e os resultados deste estudo sublinham a boa eficácia e conformidade para o tratamento da estomatite aftosa (ANDRIANI et al, 2000).

Da mesma forma, tem sido utilizado a suspensão de células em hidrogel para a injeção e entrega de células, onde os estudos de Crevensten (2004) exploraram o uso de células-tronco mesenquimais para a regeneração de discos intervertebrais em um modelo *in vivo* para investigar a viabilidade da liberação, retenção e sobrevivência de células exógenas no espaço de disco pressurizado, a partir da injeção das células-tronco mesenquimais em discos coccígeos de rato utilizando gel de hialuronano a 15% como um transportador (CREVENSTEN et al, 2004). Os resultados mostraram uma tendência de aumento da altura do disco em comparação com o gel em branco, o que sugere um aumento na síntese da matriz, indicando assim que as células-tronco mesenquimais podem manter a viabilidade e proliferar dentro do disco intervertebral do rato (CREVENSTEN et al, 2004).

Já os estudos de Sykova (2006) examinaram o efeito do transplante autólogo de células-tronco adultas, bem como o uso de *scaffolds* na regeneração da medula espinhal. O autor comparou uma injeção intravenosa de células-tronco mesenquimais e a injeção de uma fração mononuclear recentemente preparada de células de medula óssea no tratamento de uma lesão de compressão da medula espinhal aguda ou crônica induzida por balão em ratos, onde os hidrogéis semeados com as células foram implantados em ratos com medula espinhal hemisectada (SYKOVÁ et al, 2006). O estudo concluiu que o tratamento com diferentes populações de células da medula óssea teve um efeito positivo no resultado comportamental e na avaliação histopatológica após a medula espinhal hemisectada em ratos, onde esse

efeito positivo foi mais acentuado após o tratamento com células-tronco mesenquimais (SYKOVÁ et al, 2006).

6.7 Hidrogéis Injetáveis

Hidrogéis injetáveis são promissores substratos para a aplicação na engenharia tecidual, devido ao alto teor de água, a capacidade de encapsular homoganeamente células, propriedades físicas facilmente manipuláveis e entrega minimamente invasiva (DRURY & MOONEY, 2003). Muitos esforços têm sido realizados para aprimorar hidrogéis injetáveis e, assim, promover o desenvolvimento de tecidos naturais e mais funcionais. O precursor de hidrogel carregado com fatores de crescimento e/ou células alvo pode ser injetado no local do ferimento e experimentar uma transição de solução para gel *in situ* devido a estímulos físicos ou químicos (HOU et al, 2004). A natureza injetável dos hidrogéis fornece a característica atrativa da fácil e homogênea distribuição celular dentro de qualquer defeito no tamanho ou na forma antes da gelificação (NUTTELMAN et al, 2008).

Hidrogéis altamente hidratados podem melhor imitar os ambientes químicos e físicos da MEC e, portanto, são microambientes celulares ideais para a proliferação e diferenciação celular (TAN & MARRA, 2010). Mais importante ainda, os hidrogéis injetáveis têm estrutura semelhante à MEC e permitem uma boa integração física, podendo evitar procedimentos de cirurgia, facilitando, assim, a utilização de abordagens minimamente invasivas para o material e a distribuição de célula (BRANDL et al, 2007). Dessa forma, as células encapsuladas crescem dentro do hidrogel e secretam nova MEC para restaurar o tecido danificado (NICODEMUS et al, 2008). A Figura 5 descreve este processo.

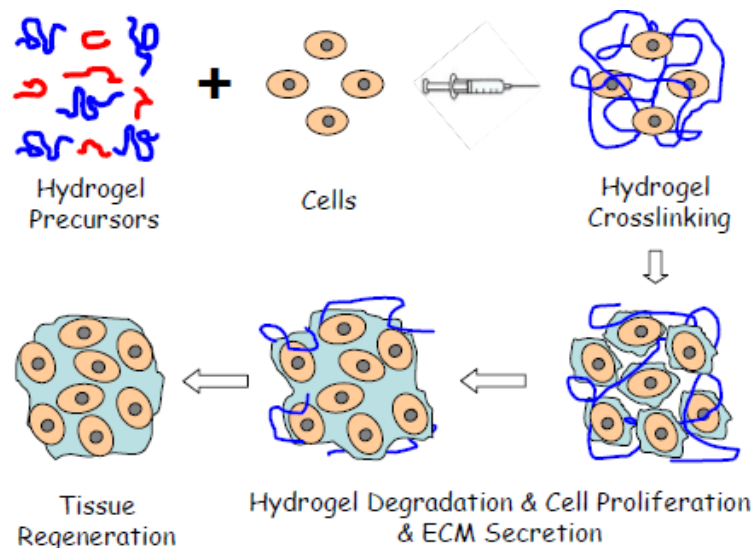


Figura 5. Ilustração esquemática de um hidrogel injetável para abordagens de regeneração tecidual. As células são isoladas a partir de uma pequena biópsia, expandidas *in vitro*, e inseridas em precursores de hidrogel, que são subsequentemente transplantados no paciente por injeção, utilizando uma agulha. O hidrogel proporciona o suporte estrutural inicial e retém as células na área defeituosa para o crescimento celular, metabolismo e síntese de nova MEC. O hidrogel é facilmente degradado quando as células secretam MEC. Esta estratégia permite ao clínico transplantar células e fatores de crescimento em um scaffold de hidrogel de uma forma minimamente invasiva (Fonte: Tan & Marra, 2010).

A necessidade de hidrogéis injetáveis e biodegradáveis em aplicações biomédicas é imensa. Um exemplo é o uso de hidrogéis em regeneração da cartilagem (HOLLAND et al, 2004). As propriedades físicas do hidrogel podem ser facilmente projetadas para coincidir com aquelas da cartilagem articular além de combinar propriedades mecânicas do *scaffold* com o tecido nativo (CREVENSTEN et al, 2004). Outras aplicações para hidrogéis incluem a regeneração de tecido mole após a remoção de tumor ou trauma. Um número de investigadores vêm estudando a combinação de hidrogéis injetáveis e microesferas biodegradáveis para a entrega controlada de fármacos em engenharia tecidual, onde quando expostas ao meio adipogênico ou osteogênico, as células diferenciaram-se em adipócitos e osteoblastos, respectivamente, enquanto estavam ligados às microesferas (RUBIN et al, 2007).

Ao longo da última década, uma variedade de materiais têm sido utilizados para formar hidrogéis injetáveis para aplicações em engenharia tecidual, onde polímeros naturais têm sido amplamente pesquisados devido à excelente biocompatibilidade e propriedades macromoleculares semelhantes a MEC natural (DRURY & MOONEY, 2003; TAN et al, 2007). No entanto, os

hidrogéis derivados de polímeros naturais frequentemente são submetidos a uma rápida degradação quando em contato com fluidos corporais, portanto, as limitações de hidrogéis naturais têm motivado abordagens para modificar estes polímeros (YOO et al, 2005). Uma estratégia é incorporar espécies bioativas, tais como células, fatores de crescimento, peptídeos e proteínas no material, resultando em *scaffolds* de hidrogel biomiméticos com funções bioativas para uma ótima resposta celular. Polímeros naturais representativos incluem colágeno, gelatina, quitosana, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, agarose, fibrina e alginato (PATEL et al, 2006).

O alginato é um polissacárido linear e hidrofílico que é principalmente derivado de algas e bactérias marrons (ROWLEY et al, 1999). Uma gelificação simples pode ser formada quando cátions bivalentes, tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Sr^{2+} , interagem cooperativamente ou interagem com blocos de monômeros para formar pontes iônicas (CAO et al, 2005). O hidrogel de alginato tem sido utilizado em uma variedade de aplicações médicas, incluindo o encapsulamento celular, a engenharia tecidual e entrega de drogas, visto que o mesmo gelifica sob condições suaves, tem baixa toxicidade e é facilmente disponível (STEVENS et al, 2004).

Neste sentido, um estudo publicado por Santana e colaboradores em 2012 avaliou um novo método de síntese de nano-/microfibras de dióxido de titânio (nfTD) e hidroxiapatita (nfHY) e a sua incorporação ao hidrogel de alginato (HA). Com este estudo, demonstrou-se que houve a formação de um ambiente propício para a adesão e proliferação celular de uma linhagem imortalizada de fibroblasto de camundongo (3T3/NIH), visto que estas nano-/microfibras assemelham-se a estrutura natural do colágeno, além de não apresentarem citotoxicidade (SANTANA et al, 2012). Além disso, quando as nano-/micro fibras foram associadas ao HA verificou-se que não houve alterações nas características químicas do *scaffold* e houve um aumento na viabilidade celular (SANTANA et al, 2012).

Entretanto, apesar das suas características vantajosas, o alginato pode não ser um candidato ideal para a engenharia tecidual, visto que o mesmo possui uma baixa taxa de degradação enzimática em mamíferos (AUGST et al, 2006) e especialmente uma reduzida capacidade de adesão celular (SANTANA et al, 2012), comprometendo assim o desenvolvimento do

tecido, havendo assim a necessidade de mais pesquisas em busca de melhores candidatos a *scaffolds* injetáveis naturais (KONG et al, 2004).

6.8 Alga Marinha *Gigartina skottsbergii*

As algas marinhas têm sido consideradas promissoras em diversas áreas, visto que possui diversos componentes com potencial aplicabilidade, sendo estes: pigmentos naturais, minerais essenciais, vitaminas, lipídios, enzimas e polissacarídeos (MOHAMED et al, 2012). Com relação à área da saúde, diversos estudos vêm mostrando sua aplicação em relação a propriedades antivirais (CARLUCCI et al, 1999; PUJOL et al, 2006), anti-inflamatória (LORENTE-CEBRIÁN et al, 2015), e antioxidante (TSAI & SUN, 2012). Nesse sentido, mecanismos de ação antioxidantes como a doação e o recebimento de elétrons, a eliminação de radicais livres e a capacidade de interferir em processos de peroxidação lipídica vêm sendo propostos em extratos de algas marinhas (ROCHA et al, 2007).

Do ponto de vista quantitativo, o grupo de espécies marinhas mais numeroso pertence às algas vermelhas (COLLÉN et al, 2013). Estas demonstram estrutura com presença de tilacóides desempilhados, desprovimento de centríolos e flagelos e a presença de receptores constituídos de ficobiliproteínas (COLLÉN et al, 2013). A estrutura de parede celular é composta de um complexo formado por celulose, galactanas sulfatadas, sendo estas a carragenina e ágar, além de várias hemiceluloses (POPPER et al, 2011).

Um mercado significativo economicamente de algas vermelhas foi implementado principalmente pela sua porção de conteúdo polissacarídeo, utilizando como exemplo a carragenina, por sua aplicabilidade na texturização de alimentos (BIXLER & PORSE, 2011), assim como o lucrativo segmento de mercado com vendas diretamente para o consumo humano (BLOUIN et al, 2013).

O uso de polissacarídeos como sistemas de suporte para a formação de tecidos revela uma tendência crescente no campo biomédico, onde os polissacarídeos de origem das algas marinhas, como a carragenina, desempenham papéis importantes em aplicações biomédicas (POPA et al, 2014). Estudos revelam ainda que a presença de grupos sulfato na sua

estrutura e a afinidade química com os glicosaminoglicanos de mamíferos desempenham papéis importantes na atividade antiviral, anticoagulante, antioxidante e anticancerígena desses polissacarídeos (VERA et al, 2011).

As carrageninas são compostos dependentes da temperatura, sendo solúveis em água acima de 60 °C e apresentando conformação em gel a temperaturas entre 30 e 40 °C, designada assim como um hidrogel físico. A gelificação da carragenina, sensível à temperatura, é induzida pela formação reversível de ligações de hidrogênio intermoleculares e uma transição conformacional enrolável para hélice seguida de agregação de hélice (MANGIONE et al, 2003). Assim, o comportamento de solubilidade termo-responsivo e a gelificação promovida por cations monovalentes, como íons de potássio, abre perspectivas para desenvolver sistemas de hidrogel a temperatura corporal (MATULEWICZ et al, 1989).

A carragenina está presente nos gêneros *Chondrus*, *Gigartina* e *Iridaea*, todos pertencentes à família Gigartinaceae nas algas vermelhas. Nesse sentido, estudos vêm relatando os sistemas de carragenina sintetizados pela alga *Gigartina skottsbergii* (MATULEWICZ et al, 1989; MATULEWICZ et al, 1990).

A *G. skottsbergii* é uma alga rodofícea, conhecida comumente por “cuero de chancho” ou “roja luga” (MANSILLA et al, 2012), presente endemicamente na região sul do continente latino americano (Ramírez et al, 1991) (Figura 6). Encontrada pela costa da Argentina, estendendo-se em direção as ilhas subantárticas e na costa chilena (RAMÍREZ et al, 1991). A principal região de produção de biomassa proveniente da *G. skottsbergii* é a localidade de Magalhães, no Chile, com uma extração e produção em torno de vinte mil toneladas da alga seca (MANSILLA et al, 2012).

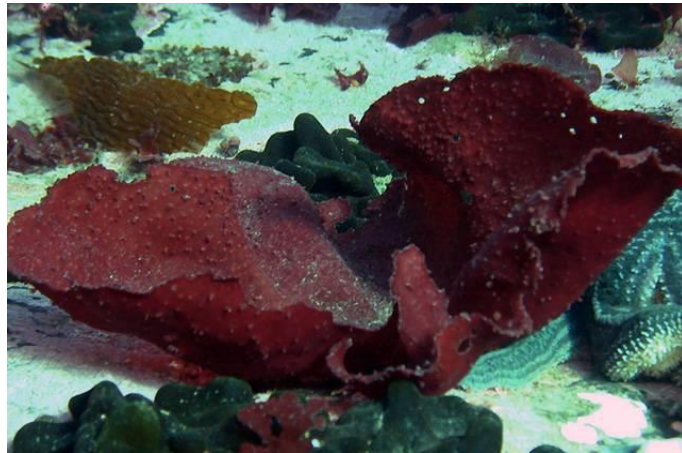


Figura 6. Alga *Gigartina skottsbergii*. Fotografia da alga *Gigartina skottsbergii* em meio ao seu habitat (**Fonte:** © Dirk Schories).

A alga *G. skottsbergii* dispõem-se horizontalmente sobre os substratos por estruturas basais especializadas de ancoragem, que proporcionam o crescimento e fixação à superfícies de pedras, rochas e conchas bivalves (MANSILLA et al, 2012). Na porção da sua fronda assume variados tamanhos e organiza-se na forma orbicular, podendo chegar a uma largura de 1,5 metros, e dependendo da localização geográfica são capazes de desenvolver-se em profundidades que variam de 4 a 30 metros. Apresentam-se em estruturas grossas, com um ciclo de vida isomorfo, com uma coloração vermelha-púrpura (MANSILLA et al, 2012).

Avaliando as características de ácidos graxos específicos em algas da Antártida e da região Ártica, Graeve (2002), identificou pela primeira vez diferentes taxas de lipídios em diversas espécies para utilizações como potenciais agentes terapêuticos. A análise da ordem *gigartinales* representada pela *G. skottsbergii* mostrou uma quantidade de 28,4% de ácido palmítico, 22,2% de ácido araquidônico e 25,2% de ácido eicosapentaenóico (EPA). A literatura relata potenciais propriedades terapêuticas para o EPA no contexto de exercer ação contra patologias e doenças neurodegenerativas, promovidos pela sua capacidade e desempenho anti-inflamatório e imunomodulatório (LORENTE-CEBRIÁN et al, 2015); onde o trabalho ilustra o conhecimento atual sobre a eficácia de n-3 LC-PUFAs; ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosa-hexaenóico (DHA), na prevenção e/ou tratamento de várias doenças inflamatórias crônicas, como doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatóide, e seus potenciais benefícios em doenças neurodegenerativas

(LORENTE-CEBRIÁN et al, 2015); e também por apresentar uma atividade de caráter antioxidante (PALANISWAMY et al, 2004), onde os autores relatam que O EPA apresenta propriedades antioxidantes e compete com o ácido araquidônico em fosfolípidios de membrana e produz derivados anti-inflamatórios da EPA; uma vez que ambos os EPA e seus derivados foram relatados para melhorar o mecanismo antioxidante (PALANISWAMY et al, 2004).

Já a sua porção polissacarídica de carragenina, como mencionado anteriormente, vem sendo estudada com aplicações antivirais, onde estudos têm identificado diversos tipos estruturais de carrageninas naturais, isolados da alga *G. skottsbergii*, como inibidores seletivos de HSV-1 (vírus herpes simplex tipo 1) e HSV-2 (vírus herpes simplex tipo 2), tanto em células Vero quanto em células neurais em estudos *in vitro* (CARLUCCI et al, 1999), e em modelo murino em estudos *in vivo* (PUJOL et al, 2006).

Além disso, hidrogéis de carragenina têm sido utilizados principalmente como sistemas de administração de fármaco ou fator de crescimento (ROCHA et al, 2011) , imobilização de enzimas (DESAI et al, 2004) e em formulações farmacêuticas (SIPAHIGIL et al, 2001). Ainda, a carragenina tem sido utilizada para o encapsulamento de células-tronco derivadas de adipócitos humano e condrócitos nasais humanos (POPA et al, 2012).

No entanto, as características e propriedades específicas desde hidrogel derivado de *G. skottsbergii* quanto ao seu potencial de aplicação nas áreas de regeneração e engenharia tecidual ainda não foram exploradas. Assim, tendo em vista as diversas propriedades terapêuticas desta alga, e sabendo da capacidade de gelificação da carragenina e formação de hidrogel, estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa (GPCell- grupo de pesquisa em células tronco e engenharia tecidual) relevaram que a *G. skottsbergii* quando embebida em meio aquoso possui a capacidade de liberar um componente viscoso, condizente com uma consistência em gel, permitindo vislumbrar aspectos interessantes no sentido dos objetivos deste projeto, onde a alga *G. skottsbergii* mostrou possuir potencial capacidade como *scaffold* injetável para a engenharia tecidual na área da saúde.

7. METODOLOGIA

7.1 Procedimentos

7.1.1 Obtenção da Alga *Gigartina skottsbergii* e Formação do Gel

A alga *Gigartina skottsbergii* foi cedida pela Universidad de Magallanes localizada no Chile. A fração liofilizada da *G. skottsbergii* foi previamente obtida mediante cooperação dos Programas de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas e de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas.

Para a formação do gel, foi estabelecido, a partir de experimentos previamente realizados, uma relação de 0,9646 g de alga para 40 mL de meio de cultivo DMEM para que o gel se forme na consistência adequada, obtendo-se desta forma 0,024115 g/mL de alga. Assim, será pesada aproximadamente 0,9646 g de alga colocando-a em uma placa de petri e a mesma será esterilizada com luz UV na capela de fluxo laminar por 80 minutos. Será adicionado em intervalos de 20 minutos, com esterilização por luz UV, 40 mL de meio de cultivo DMEM na placa de petri a fim de formar o gel. O volume de meio deverá ser ajustado de acordo com a variação na pesagem da alga. Entre os intervalos serão cortados os pedaços da alga para que aumente a área de contato com o DMEM e maior quantidade de gel seja liberada. Após a placa será incubada por 48 horas na estufa até a formação final do gel.

7.1.2 Ensaio Biológicos

7.1.2.1 Linhagens Celulares

NIH/3T3

Uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos embrionários de rato (NIH/3T3) obtida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 2% de L-glutamina, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/mL) (Gibco-BRL, Grand Island, NY) a 37°C numa atmosfera umidificada de

5% de CO₂ até que uma subconfluência foi alcançada, como descrito anteriormente (HENN et al, 2011; NEDEL et al, 2012).

DPSCs e SHEDs

As DPSCs (células-tronco da polpa de dentes permanentes) e SHEDs (células-tronco da polpa dental de dentes decíduos) foram previamente isoladas e congeladas de acordo com Ferrúa e colaboradores em 2013 e 2015, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FO-UFPel, sob o número de protocolo 38/2013.

Brevemente, os dentes coletados, foram extraídos por alunos estagiários do Centro de Especialidades Odontológicas de Cirurgia da FO-UFPel. Imediatamente após a exodontia, os dentes foram apanhados pela coroa e limpos com uma gaze estéril embebida em clorexidina 0,2%. Em seguida, foram feitas duas canaletas com ponta diamantada estéril, número 4138 (KG Sorensen), e caneta de alta rotação sob irrigação constante de água MiliQ estéril. Cada canaleta mediu aproximadamente 2 mm, sendo uma na face oclusal e outra em uma das faces proximais em direção ao longo eixo do dente.

Subsequentemente, os dentes foram armazenados em tubos cônicos de 50 mL contendo 15 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco acrescido de antibiótico (DMEM; Cultilab, Campinas, SP, Brasil), enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS – Fetal Bovine Serum; Hyclone) e colocados no interior de uma caixa de isopor com gelo para serem transportados ao laboratório. No laboratório os dentes foram retirados, com auxílio de uma pinça estéril, do interior dos tubos cônicos e colocados sobre gazes. Um cinzel foi apoiado sobre a canaleta proximal e com auxílio de um martelo, uma linha de fratura foi realizada no dente.

Rapidamente, as partes dos dentes foram aproximadas e levadas ao interior da capela de fluxo laminar. As polpas foram removidas da câmara pulpar com curetas de dentina estéreis e colocadas sobre placas de petri plástica, onde havia 0,5 mL de meio DMEM/Ham F12, suplementado com 15% de FBS (Hyclone), 1% de antibiótico (Penicilina, Estreptomicina e Glutamina) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 1% de aminoácidos não essenciais (AANE) (Gibco, Grand Island, NY, EUA). Nas placas de petri, sob o meio específico

para células tronco e usando curetas de dentina e lâmina de bisturi número 15, as polpas foram fragmentadas em explantes.

Em placas de 6 poços, foram feitas ranhuras no fundo de cada poço com uma lâmina de bisturi número 15. Os explantes foram transferidos para as placas, de modo a obter-se um explante por ranhura. Foram adicionados 2 mL de meio DMEM/F12 a cada poço e as placas foram incubadas em estufa, por 14 dias, sob temperatura de 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO².

Após duas semanas, as placas foram analisadas em um microscópio invertido TS100 TS100-F da Nikon, onde se observou a migração celular oriunda dos explantes. Um acompanhamento da morfologia e do crescimento celular foi realizado através de repetidas análises microscópicas. No momento em que houve cerca de 80% de confluência celular, os explantes foram retirados dos poços com uma pinça e transferidos para as garrafas de cultivo de 25 cm² de superfície. Para tanto, nas paredes inferiores das garrafas (paredes de adesão celular) foram feitas duas ranhuras com sonda exploradora, sob as quais os explantes foram assentados. Colocaram-se as garrafas na estufa por cerca de 5 min, de modo a permitir uma melhor adesão dos explantes.

Retornando à capela de fluxo laminar, adicionou-se 5 mL de meio de cultura e transferiu-se as garrafas para a incubação em uma estufa sob temperatura de 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO². Após a transferência dos explantes das placas para as garrafas, o meio foi sugado do interior dos poços com pipeta de 1000 uL e desprezado. Em seguida, as células aderidas nas placas foram lavadas com 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 1%. Adicionou-se 2 mL de solução 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para que as células desaderissem dos poços, esta etapa foi acompanhada por microscopia óptica. Quando o agregado celular estava em pequenos grumos, inativou-se a ação da tripsina adicionando-se 2 mL de meio de cultivo e ressuspensando o meio para desagregar completamente as células. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para garrafas de cultura (Passagem 0 - P0). Colocou-se 1 mL de meio de cultivo nos poços, que foi ressuspensado e transferido para as garrafas, repetindo duas vezes essa etapa e totalizando 6 mL de meio em P0, este processo garantiu a completa remoção das células presentes nos poços.

As garrafas foram transferidas para a incubação em estufa, sob temperatura de 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO².

7.1.2.2 Congelamento das Linhagens Celulares

Quando se obteve confluência de 80% nas garrafas de cultivo foi possível realizar o congelamento celular. Primeiro dispensou-se o meio de cultivo consumido, lavou-se as células com PBS, em concentração de 1%. Adicionou-se 3 mL de 0,25% Tripsina-EDTA para a desadesão celular e realizou-se o acompanhamento no microscópio invertido. Inativou-se a ação enzimática acrescentando 3 mL de meio de cultivo. Dos 6 mL totais, 3 mL foram mantidos nas garrafas e acrescido mais 7 ml de meio, para prosseguir o cultivo. Dos 3 mL restantes, 20 uL foram removidos para a realização da contagem celular, a qual foi realizada utilizando-se o microscópio invertido e a câmara de Neubauer. O restante foi colocado em um tubo cônico de 15 mL e levado a centrifuga, por 10 min a 1200 rpm. Em seguida, dispensou-se o sobrenadante e dissolveu-se o pellet em meio de congelamento, sendo este composto de 70% de meio DMEM/ Ham F12, 10% de DMSO e 20% de FBS. A quantidade de meio foi definida a partir da contagem celular, de modo que fosse possível obter-se 5 x 10⁵ células/ mL. Distribuiu-se a suspensão celular em meio de congelamento em criotubos de 2 mL, os quais foram colocados no Mr. Frosty (ThermoScientific) e levados ao ultra freezer de - 80°C (Indrel). Após 24 horas, os microtubos foram transferidos para um botijão de nitrogênio líquido.

7.1.2.3 Cultivo Celular

Para a realização dos ensaios, as NIH/3T3, DPSCs e SHEDs, armazenadas no interior do botijão de nitrogênio líquido, serão descongeladas. Para tanto, será retirado um tubo criogênico contendo as células NIH/3T3, um tubo contendo as DPSCs e outro com as SHEDs do interior do botijão, onde os mesmos serão colocados em banho-maria a 37°C até o conteúdo tomar a forma líquida. Em seguida, no interior da capela de fluxo laminar as células serão transferidas para o interior de uma garrafa de cultivo (TPP, St. Louis, MO, EUA) com 25 cm² de superfície. Então as garrafas serão supridas com meio de cultivo DMEM/ Ham F12 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil)

suplementado com 15% de FBS (Gibco, Grand Island, NY, EUA), 1% de antibiótico (Penicilina, Estreptomicina e Glutamina) (Gibco, Grand Island, NY, EUA), e 1% de aminoácidos não essenciais (AANE) (Gibco, Grand Island, NY, EUA). As garrafas serão levadas para a estufa sob a temperatura de 37°C, em condição de atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 24 horas, tendo havido adesão celular na parede de fundo das garrafas de cultivo, a troca do meio será realizada.

As trocas do meio de cultura serão realizadas quando o meio apresentar alteração de cor, indicando alteração no pH, assim como quando houver muitas células em suspensão. Para tanto, o meio de cultivo pré-existente será retirado, utilizando-se pipetas de 10 mL, e após o mesmo será desprezado. As células aderidas nas garrafas serão lavadas utilizando o PBS (Gibco, Grand Island, NY, EUA) na concentração de 1%, o mesmo será removido e 10 mL de meio de cultivo novo será adicionado.

Ao atingir 80% de confluência será realizado o repique celular. Inicialmente o meio de cultivo pré-existente no interior das garrafas será desprezado e as células serão lavadas com 2 mL de 1% PBS. Será adicionado 2 mL de 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para proceder a desadesão celular e será realizado o acompanhamento no microscópio invertido TS100 TS100-F da marca Nikon (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A ação enzimática será inativada acrescentando 2 mL de meio de cultivo com SFB, e então será realizada a ressuspensão do meio para desagregar completamente as células. Em sequência, será adicionado 8 mL de meio, ressuspensando-se o líquido total e será feita a passagem celular, na razão de 1:2. As garrafas serão, então, levadas para estufa sob a temperatura de 37°C, em condição de atmosfera úmida e 5% de CO₂. Nas passagens seguintes, o processo de repique será realizado em razão de 1:3. Trocas do meio de cultura serão realizadas quando o meio apresentar alteração de cor ou quando houver muitas células em suspensão.

7.1.2.4. Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular com MTT

O protocolo experimental será realizado no intuito de avaliar se o gel da alga *G. skottsbergii* possuirá capacidade de agir como um possível scaffold para a adesão e proliferação das células NIH/3T3, DPSCs e SHEDs. Após as

48 horas de processo da formação do gel, no fluxo, serão feitas diluições do gel a partir da concentração mãe (CM) em razões de CM 1:2, CM 1:4 e CM 1:8 com meio de cultivo DMEM. Serão adicionados, em três placas de 96 poços, 50 μL de gel por poço e as mesmas serão esterilizadas com luz UV por 40 minutos.

Após será adicionado 50 μL de células em cada poço, em uma densidade de 1.10^4 células/poço, completando assim 100 μL . Os grupos controles consistirão de poços contendo apenas meio de cultivo, apenas células + meio de cultivo e apenas o gel + meio de cultivo. Subsequentemente as placas serão incubadas na estufa durante 5; 24 e 48 horas nas condições de 5% de CO_2 e temperatura de 37°C .

A proliferação celular será analisada através de um ensaio colorimétrico de MTT (NEDEL et al, 2012). Após 5, 24 e 48 horas serão adicionados aos 100 μL de gel e células preexistentes 10 μL de MTT, os quais serão mantidos em contato com as células por 4 horas na estufa. Após as 4 horas será realizada então a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) em um comprimento de onda de 450 nm.

7.1.2.5 Ensaio de Adesão e Proliferação Celular com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O protocolo experimental será realizado no intuito de avaliar, através de MEV, se o gel da alga *G. skottsbergii* possuirá capacidade de agir como um possível scaffold para a adesão e proliferação das células NIH/3T3, DPSCs e SHEDs. Após as 48 horas de processo da formação do gel, no fluxo serão adicionados, em duas placas de 24 poços, 250 μL de gel por poço e as mesmas serão esterilizadas com luz UV por 40 minutos. Após, será adicionado 250 μL de célula em cada poço, em uma densidade de 5.10^4 células/poço, completando assim 500 μL . Os grupos controles consistirão de poços contendo apenas o gel + meio de cultivo. Subsequentemente as placas serão incubadas na estufa durante 12 e 14 horas nas condições de 5% de CO_2 e temperatura de 37°C .

Após o tempo de incubação será retirado o excesso de meio e as células serão lavadas com 500 μL de PBS duas vezes. As células serão então fixadas utilizando o método de congelamento e liofilização, conforme estabelecido por

Santana e colaboradores em 2015. Após cada período de incubação as placas serão diretamente congeladas a temperatura de -20°C por 3 horas, e então transferidas e congeladas a uma temperatura de -80°C por 24 horas. As amostras serão então liofilizadas (L101, Liobras, Brazil) por 24 horas. Por fim, as amostras serão coradas com ouro e analisadas com o MEV 15kV (Shimatzu SSX-550-Japan), em diferentes magnitudes (200 to 500 Mag) (SANTANA et al, 2015).

7.1.2.6 Ensaio de Adesão e Viabilidade Celular com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

Após as 48 horas de processo da formação do gel, no fluxo, será feita uma diluição do gel a partir da concentração mãe (CM) em razão de CM 1:4 com meio de cultivo DMEM. Será adicionado em uma placa de 96 poços 90 μL de gel por poço e a mesma será esterilizada com luz UV por 40 minutos.

Após será adicionado 10 μL de células em cada poço, em uma densidade de 1.10^4 células/poço, completando assim 100 μL . Os grupos testes consistirão de gel concentrado + célula/meio e gel diluído + célula/meio. Os controles negativos consistirão de poços contendo apenas gel concentrado + meio de cultivo DMEM, apenas gel diluído + meio de cultivo DMEM. O controle positivo consistirá de células sem a presença de gel. Subsequentemente a placa será incubada na estufa durante 24 horas nas condições de 5% de CO_2 e temperatura de 37°C .

A adesão e a viabilidade celular serão analisadas através do ensaio DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), segundo Fogaça (2016) com modificações; o qual forma complexos fluorescentes na fita-dupla do DNA. As células semeadas no gel serão coradas com uma solução de DAPI em temperatura ambiente no escuro sem lavagem prévia com PBS. A adesão ao gel e a morfologia nuclear das células será examinada através do microscópio de fluorescência Olympus IX71 (Olympus Optical Co.) (FOGAÇA et al, 2016).

7.1.2.7 Ensaio de Adesão e Viabilidade de Membrana Celular com Live/Dead

Após as 48 horas de processo da formação do gel, no fluxo, será feita uma diluição do gel a partir da concentração mãe (CM) em razão de CM 1:4

com meio de cultivo DMEM. Será adicionado em uma placa de 96 poços 90µl de gel por poço e a mesma será esterilizada com luz UV por 40 minutos.

Após será adicionado 10 µL de células em cada poço, em uma densidade de 1.10^4 células/poço, completando assim 100 µL. Os grupos testes consistirão de gel concentrado + célula e gel diluído + célula. Os controles negativos consistirão de poços contendo apenas gel concentrado + meio de cultivo DMEM, apenas gel diluído + meio de cultivo DMEM. O controle positivo consistirá de células sem a presença de gel. Subsequentemente a placa será incubada na estufa durante 24 horas nas condições de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

O ensaio de viabilidade de membrana celular Live/Dead® (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) será conduzido segundo as instruções do fabricante e Fogaça (2016) A análise do ensaio Live/Dead será realizada através de microscópio de fluorescência Olympus IX71 (Olympus Optical Co.) por imagem multicolor. As células mortas serão detectadas por um sinal fluorescente vermelho (546nm), enquanto que as células vivas serão detectadas por emissão de luz fluorescente verde (488nm) (FOGAÇA et al, 2016).

7.1.3 Ensaios Químicos

Os ficocolóides, polissacarídeos presentes na parede celular de algas vermelhas ou pardas, especialmente carragenina, serão identificados a partir do gel, por técnicas como de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, Espectroscopia Raman e Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C).

7.1.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Esta tem sido a técnica mais utilizada para a identificação de ficocolóides, através da qual é possível identificar a natureza dos diferentes tipos de carragenina. A partir da identificação de bandas características já classificadas na literatura, é possível identificar as principais carrageninas.

Os espectros FTIR serão obtidos num espectrômetro IFS 55, usando um sistema “*Golden Gate single reflection diamond ATR*”, sem necessidade de preparação prévia da amostra. Os espectros são o resultado da média de duas

contagens, com 128 “scans” cada e uma resolução de 2 cm¹ (PEREIRA et al, 2003; PEREIRA et al, 2004).

7.1.3.2 Espectroscopia de Raman

Esta técnica proporciona espectros semelhantes aos de infravermelho, sendo utilizada como uma técnica complementar à identificação por FTIR. Bandas que aparecem com baixa nitidez na análise por espectroscopia de infravermelho, podem ser facilmente identificadas na Espectroscopia de Raman.

Os espectros de Raman serão obtidos num espectrômetro Bruker RFS-1000, usando um laser nd-YAG com excitação ao comprimento de onda de 1064 nm. Cada espectro resultará de duas medições repetidas de 150 “scans” cada e uma resolução de 2 cm⁻¹ (PEREIRA et al, 2003).

7.1.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C)

As análises realizadas por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C possuem grande confiabilidade. Com esta ferramenta, é possível identificar a estrutura química das carrageninas. Desde o trabalho pioneiro de Usov e colaboradores (YAROTSKY et al, 1977; USOV, 1984), a espectroscopia de RMN tem vindo a ser progressivamente usada como técnica preferencial na determinação e quantificação da composição de amostras laboratoriais e industriais de carragenina.

Os espectros de ¹H-RMN serão obtidos num espectrômetro Bruker AMX600, operando a 500.13 MHz e a uma temperatura de 65 °C. As amostras serão preparadas do seguinte modo (VAN DE VELDE et al, 2002; VAN DE VELDE et al, 2004):

a) Dissolução (5 mg ml⁻¹) em D₂O contendo um sal *standard*, 20 mM de Na₂HPO₄, 80 °C.

b) Sonicação de 1 hora (3x) num banho sonicador (Branson 2510).

c) Análise por ¹H-RMN, 64 “scans”, atraso de interpulso de 5 s.

Para determinar os deslocamentos químicos (δ) das principais carrageninas serão adicionados sais *standard* internos. A atribuição dos deslocamentos químicos aos respectivos prótons anoméricos será feita com base nos dados sumariados por Van de Velde et al. (2004).

7.2 Análise de Dados

A avaliação dos dados será realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de $p < 0,05$. Para a elaboração dos gráficos será utilizado o Programa GraphPadPrism, versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

7.3 Aspectos Éticos

As DPSCs e SHEDs foram previamente isoladas e congeladas de acordo com Ferrúa e colaboradores em 2013 e 2015, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FO-UFPel, sob o número de protocolo 38/2013.

7.5 Orçamento

Tabela 8. Orçamento.

Material de Consumo	Valor (R\$)	Quantidade	Valor Total (R\$)
DMEM/Ham F12 (500ml)	250,00	10	2.500,00
DMEM, Cultilab (500 ml)	150,00	10	1.500,00
Tampão Fosfato Salino (PBS), Gibco (500ml)	310,00	1	310,00
Tripsina/EDTA 0,25%, Cultilab (500ml)	300,00	2	600,00
Soro Fetal Bovino, Gibco (500ml)	295,00	2	590,00
DMSO, Synth (1000ml)	54,00	1	54,00
MTT, Sigma Aldrich, (250 mg)	164,00	1	164,00
Frascos e Placas de Cultivo Celular	-	-	3.000,00
Falcon 15 ml (100 unidades)	42,00	2	84,00
Falcon 50 ml (50 unidades)	35,00	2	70,00
Reagente DAPI (10mg)	423,00	1	423,00
Reagente Live/Dead (1 kit)	1.862,00	1	1.862,00
Valor Total (R\$)			11.157,00

8. REFERÊNCIAS

AMANN, Elisabeth et al. Hyaluronic acid facilitates chondrogenesis and matrix deposition of human adipose derived mesenchymal stem cells and human chondrocytes co-cultures. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 52, p.130-144, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.064>.

ANDRIANI, e et al. The effectiveness and acceptance of a medical device for the treatment of aphthous stomatitis. Clinical observation in pediatric age. **Minerva Pediatrics**, -, v. 1-2, n. 52, p.15-20, jan. 2000.

ANTMAN-PASSIG, Merav et al. Mechanically Oriented 3D Collagen Hydrogel for Directing Neurite Growth. **Tissue Engineering Part A**, [s.l.], v. 23, n. 9-10, p.403-414, maio 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0185>.

ARANA-CHAVEZ, Victor e; MASSA, Luciana F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 36, n. 8, p.1367-1373, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.006>.

ARRUDA, L.c.m. et al. Resetting the immune response after autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. **Current Research In Translational Medicine**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.107-113, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.retram.2016.03.004>.

AUGST, Alexander D.; KONG, Hyun Joon; MOONEY, David J.. Alginate Hydrogels as Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.623-633, 7 ago. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.200600069>.

BARNES, Catherine P. et al. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 59, n. 14, p.1413-1433, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.022>.

BARROS, Diana Luz Pessoa de. Contribuições de Bakhtin às teorias do discurso. In: FARACO, Carlos Alberto; TEZZA, Cristóvão; CASTRO, Gilberto de. **Diálogos com Bakhtin**. Curitiba: Editora Ufpr, 2001. p. 27-38.

BAUMANN, K. Stem cells: No limits to iPS cells? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, -, v. 7471, n. 502, p.340-345, 17 out. 2013.

BIXLER, Harris J.; PORSE, Hans. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.321-335, 22 maio 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9529-3>.

BLOUIN, Nicolas A. et al. Porphyra: a marine crop shaped by stress. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.29-37, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.10.004>.

BOONYAGUL, Sani et al. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. **Odontology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.310-317, 12 jan. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10266-012-0101-2>.

BRANDL, Ferdinand; SOMMER, Florian; GOEPFERICH, Achim. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.134-146, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.017>.

CARLUCCI, M.j.; SCOLARO, L.a.; DAMONTE, E.b.. Inhibitory Action of Natural Carrageenans on Herpes simplex Virus Infection of Mouse Astrocytes. **Chemotherapy**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.429-436, 1999. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000007236>.

CARLUCCI, Maria J. et al. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.97-105, abr. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-8130\(96\)01145-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-8130(96)01145-2).

CASAGRANDE, L et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, Brasil, v. 1, n. 99, p.1-7, jan. 2011.

CHAN, B. P.; LEONG, K. W.. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **European Spine Journal**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.467-479, 13 nov. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>.

CHEN, Bo et al. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. **Biomaterials**, [s.l.], v. 33, n. 20, p.5023-5035, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.057>.

CHENG, W et al. Effects of alginate/collagen scaffold on cell proliferation and differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, China, v. 4, n. 52, p.259-264, 9 abr. 2017.

COLLEN, J. et al. Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 13, p.5247-5252, 15 mar. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1221259110>.

COMBLAIN, Fanny et al. Chitosan: A promising polymer for cartilage repair and viscosupplementation. **Bio-medical Materials And Engineering**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.209-215, 30 mar. 2017. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/bme-171643>.

COSTA, André de Mendonça et al. Reconstruction of Large Cranial Defects in Nonimmunosuppressed Experimental Design With Human Dental Pulp Stem Cells. **The Journal Of Craniofacial Surgery**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.204-210, jan. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer - Health). <http://dx.doi.org/10.1097/scs.0b013e31815c8a54>.

CREVENSTEN, Gwen et al. Intervertebral Disc Cell Therapy for Regeneration: Mesenchymal Stem Cell Implantation in Rat Intervertebral Discs. **Annals Of Biomedical Engineering**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.430-434, mar. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:abme.0000017545.84833.7c>.

D'AQUINO, Riccardo et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. **Journal Of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, [s.l.], v. 312, n. 5, p.408-415, 15 jul. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.b.21263>.

DEMARCO, Flavio F. et al. Effects of Morphogen and Scaffold Porogen on the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. **Journal Of Endodontics**, [s.l.], v. 36, n. 11, p.1805-1811, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.031>.

DESAI, P.d.; DAVE, A.m.; DEVI, Surekha. Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 31, n. 4-6, p.143-150, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.08.004>.

DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. **International Journal Of Polymer Science**, [s.l.], v. 2011, p.1-19, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/290602>.

DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W.. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. **Science**, [s.l.], v. 324, n. 5935, p.1673-1677, 25 jun. 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171643>.

DOMEN, Jos; WEISSMAN, Irving L.. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. **Molecular Medicine Today**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.201-208, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-4310\(99\)01464-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-4310(99)01464-1).

DRURY, Jeanie L.; MOONEY, David J.. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, [s.l.], v. 24, n. 24, p.4337-4351, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00340-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00340-5).

EL-SHERBINY, Ibrahim M.; YACOUB, Magdi H.. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. **Global Cardiology: Science and Practice**, Giza, Egypt, v. 3, p.316-342, 1 nov. 2013.

FERRETTI, Mario et al. Controlled in vivo Degradation of Genipin Crosslinked Polyethylene Glycol Hydrogels within Osteochondral Defects. **Tissue Engineering**, [s.l.], v. 12, n. 9, p.2657-2663, set. 2006. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.12.2657>.

FISCHBACH, Gerald D.; FISCHBACH, Ruth L.. Stem cells: science, policy, and ethics. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 114, n. 10, p.1364-1370, 15 nov. 2004. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci200423549>.

FISHER, John P. et al. Thermoreversible hydrogel scaffolds for articular cartilage engineering. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.268-274, 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30148>.

FISHER, Omar Z. et al. Bioinspired Materials for Controlling Stem Cell Fate. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.419-428, 16 mar. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ar900226q>.

FOGAÇA, Tatiana B. et al. Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.156-161, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.10.003>.

FORTIER, Lisa A.. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. **Veterinary Surgery**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.415-423, set. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-950x.2005.00063.x>.

FRIMBERGER, Dominic; LIN, Hk; KROPP, Bradley P. The use of tissue engineering and stem cells in bladder regeneration. **Regenerative Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.425-435, jul. 2006. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/17460751.1.4.425>.

GALLER, Kerstin M. et al. Suitability of Different Natural and Synthetic Biomaterials for Dental Pulp Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part A**, [s.l.], p.0-0, 20 jul. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0555>.

GILBERT, Thomas W.; STEWART-AKERS, Ann M.; BADYLAK, Stephen F.. A quantitative method for evaluating the degradation of biologic scaffold materials. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.147-150, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.022>.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 97, n. 25, p.13625-13630, 21 nov. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.240309797>.

GRONTHOS, S. et al. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. **Journal Of Dental Research**, [s.l.], v. 81, n. 8, p.531-535, ago. 2002. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910208100806>.

HARRISON, Benjamin S. et al. Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 31, p.4628-4634, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.003>.

HENN, Sandrina et al. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 8, p.1797-1802, 14 jun. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-011-4364-x>.

HOLLAND, Theresa A. et al. Transforming growth factor- β 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v.

94, n. 1, p.101-114, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.007>.

HOLLISTER, S.j.; MADDOX, R.d.; TABOAS, J.m.. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. **Biomaterials**, [s.l.], v. 23, n. 20, p.4095-4103, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00148-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00148-5).

HOLTZER, H. **Cell lineages, stem cells and the 'quantal' cell cycle concept**: In: Stem cells and tissue homeostasis. New York: Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1978. 28 p.

HOU, Qingpu; BANK, Paul A. de; SHAKESHEFF, Kevin M.. Injectable scaffolds for tissue regeneration. **Journal Of Materials Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 13, p.1915-1923, 2004. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b401791a>.

ISHKITIEV, Nikolay et al. Deciduous and Permanent Dental Pulp Mesenchymal Cells Acquire Hepatic Morphologic and Functional Features In Vitro. **Journal Of Endodontics**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.469-474, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.12.022>.

ITO, K et al. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. **The International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants**, -, v. 5, n. 26, p.947-954, set. 2011.

JOHNSON, Todd D; LIN, Stephen y; CHRISTMAN, Karen L. Tailoring material properties of a nanofibrous extracellular matrix derived hydrogel. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 22, n. 49, p.494015-494015, 21 nov. 2011. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/22/49/494015>.

JP, Vacanti; R, Langer. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **Lancet**, Eua, v. 354, n. 1, p.32-34, 1999.

JU, Hee Kyung; KIM, So Yeon; LEE, Young Moo. PH/temperature-responsive behaviors of semi-IPN and comb-type graft hydrogels composed of alginate and poly(N -isopropylacrylamide). **Polymer**, [s.l.], v. 42, n. 16, p.6851-6857, jul. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-3861\(01\)00143-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-3861(01)00143-4).

KAIHARA, Sachiko; MATSUMURA, Shuichi; FISHER, John P.. Synthesis and characterization of cyclic acetal based degradable hydrogels. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.67-73, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.05.019>.

KARAÖZ, Erdal et al. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Histochemistry And Cell Biology**, [s.l.], v. 136, n. 4, p.455-473, 31 ago. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-011-0858-3>.

KHAN, Wasim S. et al. Stem Cell and Tissue Engineering Applications in Orthopaedics and Musculoskeletal Medicine. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2012, p.1-2, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/403170>.

KIM, do Rim et al. Aconiti Lateralis Preparata Radix Activates the Proliferation of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Induces Osteogenic Lineage Differentiation through the Bone Morphogenetic Protein-2/Smad-Dependent Runx2 Pathway. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2013, p.1-10, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/586741>.

KM, Chen; BF, Ge; AL, Ma Hp Et. Icariin, a flavonoid from the herb Epimedium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells. **Pharmazie**, Ohio Eua, v. 12, n. 60, p.939-942, dez. 2005.

KONG, H. J. et al. Controlling Degradation of Hydrogels via the Size of Crosslinked Junctions. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 16, n. 21, p.1917-1921, 4 nov. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200400014>.

LANGER, R; VACANTI, J.. Tissue engineering. **Science**, [s.l.], v. 260, n. 5110, p.920-926, 14 maio 1993. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.8493529>.

LANGER, Robert. Tissue Engineering. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.12-15, jan. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.1999.0003>.

LANGER, Robert; TIRRELL, David A.. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, [s.l.], v. 428, n. 6982, p.487-492, 1 abr. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02388>.

LAPORTE, Laura de; SHEA, Lonnie D.. Matrices and scaffolds for DNA delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 59, n. 4-5,

p.292-307, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.017>.

LEBLOND, Cp. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. **Journal Of The National Cancer Institute: Monographs**, -, p.119-150, 14 maio 1964.

LEE, K.y. et al. Hydrogel Formation via Cell Crosslinking. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 15, n. 21, p.1828-1832, 4 nov. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200305406>.

LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J.. Hydrogels for Tissue Engineering. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 101, n. 7, p.1869-1880, jul. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr000108x>.

LIU, Shan et al. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.982-982, 21 jun. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060982>.

LORENTE-CEBRIÁN, Silvia et al. An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. **Journal Of Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.341-349, 11 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-015-0395-y>.

LU, Xin-zheng et al. Ginsenoside Rg1 promotes bone marrow stromal cells proliferation via the activation of the estrogen receptor-mediated signaling pathway1. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.1209-1214, out. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00874.x>.

MANGIONE, M.r et al. Thermoreversible gelation of κ -Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 104, n. 1, p.95-105, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00341-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00341-1).

MANSILLA, Andrés; ÁVILA, Marcela; YOKOYA, Nair S.. Current knowledge on biotechnological interesting seaweeds from the Magellan Region, Chile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.760-767, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2012005000074>.

MAO, J.j. et al. Craniofacial Tissue Engineering by Stem Cells. **Journal Of Dental Research**, [s.l.], v. 85, n. 11, p.966-979, nov. 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910608501101>.

MATULEWICZ, Maria C. et al. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 28, n. 11, p.2937-2941, jan. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80257-2](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(89)80257-2).

MATULEWICZ, Maria C. et al. Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 29, n. 11, p.3407-3410, jan. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85247-d](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)85247-d).

MEINEL, Lorenz et al. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.25-34, 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30117>.

MEINEL, Lorenz et al. Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.379-391, 18 out. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20252>.

MENASCHÉ, P.; VANNEAUX, V.. Stem cells for the treatment of heart failure. **Current Research In Translational Medicine**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.97-106, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.retram.2016.04.003>.

MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 10, p.5807-5812, 25 abr. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0937635100>.

MJ, Carlucci; LA, Scolaro; EB, Damonte. Inhibitory action of natural carrageenans on Herpes simplex virus infection of mouse astrocytes. **Chemotherapy**, Buenos Aires, v. 45, p.429-436, nov. 1999.

MOHAMED, Suhaila; HASHIM, Siti Nadia; RAHMAN, Hafeedza Abdul. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.83-96, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.001>.

MOREAU, Jennifer L.; KESSELMAN, Dafna; FISHER, John P.. Synthesis and properties of cyclic acetal biomaterials. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.594-602, 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31104>.

MORGANI, Sophie m. et al. Totipotent Embryonic Stem Cells Arise in Ground-State Culture Conditions. **Cell Reports**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.1945-1957, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.034>.

NAKABAYASHI, Nobuo. Dental biomaterials and the healing of dental tissue. **Biomaterials**, [s.l.], v. 24, n. 13, p.2437-2439, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00112-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00112-1).

NEDEL, Fernanda et al. Antiproliferative Activity of Flower Hexane Extract Obtained from *Mentha spicata* Associated with *Mentha rotundifolia* Against the MCF7, KB, and NIH/3T3 Cell Lines. **Journal Of Medicinal Food**, [s.l.], v. 15, n. 11, p.955-958, nov. 2012. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2011.0340>.

NEDEL, Fernanda et al. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. **The Journal Of Contemporary Dental Practice**, Pelotas Brasil, v. 10, n. 4, p.90-96, 2009.

NICODEMUS, Garret D.; BRYANT, Stephanie J.. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.149-165, jun. 2008. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2007.0332>.

NISHINO, Yudai et al. Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells With Basic Fibroblast Growth Factor Enhance Wound Healing of Skin Defect. **Journal Of Craniofacial Surgery**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.438-442, mar. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/scs.0b013e318207b507>.

NUÑEZ-SANTIAGO, M.c. et al. Rheology and microstructure of κ -carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.32-41, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.003>.

NUTTELMAN, Charles R. et al. Macromolecular monomers for the synthesis of hydrogel niches and their application in cell encapsulation and tissue engineering. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.167-179, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.09.006>.

NÖR, J. E.. Buonocore Memorial Lecture. **Operative Dentistry**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.633-642, nov. 2006. Operative Dentistry. <http://dx.doi.org/10.2341/06-000>.

PALANISWAMY, Kalai Selvi; VISHWANADHA, Vijaya Padma; SINGARAVELU, Saranya Ramalingam. Fish oil rich in eicosapentaenoic acid protects against oxidative stress-related renal dysfunction induced by TCDD in Wistar rats. **Cell Stress And Chaperones**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.409-419, 11 out. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-013-0470-7>.

PATEL, M; FISHER, Jp. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. **Pediatric Research**, Maryland, v. 5, n. 63, p.497-501, maio 2008.

PATEL, Minal et al. Video-Gait Analysis of Functional Recovery of Nerve Repaired with Chitosan Nerve Guides. **Tissue Engineering**, [s.l.], v. 12, n. 11, p.3189-3199, nov. 2006. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.12.3189>.

PEREIRA, Leonel et al. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, [s.l.], v. 20, n. 4-6, p.223-228, jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-0344\(03\)00058-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-0344(03)00058-3).

PEREIRA, Leonel & MESQUISA JF. Population studies and carrageenan properties of *Chondrachantus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v.16, n.5, p.369-383, 2004.

POLLOT, Beth E. et al. Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s.l.], p.0-0, mar. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.33859>.

POPA, Elena Geta; REIS, Rui Luís; GOMES, Manuela Estima. Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.410-424, 19 mar. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2014.889079>.

POPA, Elena; REIS, Rui; GOMES, Manuela. Chondrogenic phenotype of different cells encapsulated in α -carrageenan hydrogels for cartilage regeneration strategies. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s.l.], v.

59, n. 2, p.132-141, mar. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1007>.

POPPER, Zoë A. et al. Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. **Annual Review Of Plant Biology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.567-590, 2 jun. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>.

PUJOL, C. A. et al. Antiviral Activity of a Carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against Intraperitoneal Murine Herpes simplex Virus Infection. **Planta Medica**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.121-125, nov. 2006. Thieme Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-373168>.

RAMÍREZ, Maria Eliana; SANTELICES, Bernabé. **Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del pacífico de Sudamérica**. Chile: Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, 1991. 437 p.

ROBEY, Pamela Gehron. Series Introduction: Stem cells near the century mark. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 105, n. 11, p.1489-1491, 1 jun. 2000. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci10256>.

ROCHA, Fabíola Dutra et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.631-639, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2007000400024>.

ROCHA, Pedro M et al. Encapsulation of adipose-derived stem cells and transforming growth factor- β 1 in carrageenan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal Of Bioactive And Compatible Polymers**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.493-507, set. 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0883911511420700>.

ROLLO, John et al. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.73-84, 1 fev. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1042/ba20060134>.

RUBIN, J Peter. et al. Collagenous Microbeads as a Scaffold for Tissue Engineering with Adipose-Derived Stem Cells. **Plastic And Reconstructive Surgery**, [s.l.], v. 120, n. 2, p.414-424, ago. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.prs.0000267699.99369.a8>.

SANTANA, Bianca et al. Comparing Different Methods to Fix and to Dehydrate Cells on Alginate Hydrogel Scaffolds Using Scanning Electron Microscopy. **Microscopy Research And Technique**, Pelotas Brasil, v. 78, n. 7, p.553-561, 2015.

SANTANA, Bianca Palma et al. Nano-/microfiber scaffold for tissue engineering: Physical and biological properties. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 100, n. 11, p.3051-3058, 19 jun. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.34242>.

SEO, Bommie Florence; JUNG, Sung-no. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in Prevention or Treatment of Excessive Scars. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2016, p.1-8, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6937976>.

SHIEH, Hester F. et al. Comparisons of human amniotic mesenchymal stem cell viability in FDA-approved collagen-based scaffolds: Implications for engineered diaphragmatic replacement. **Journal Of Pediatric Surgery**, [s.l.], v. 52, n. 6, p.1010-1013, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.03.024>.

SHIN'OKA, Toshiharu et al. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. **The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery**, [s.l.], v. 129, n. 6, p.1330-1338, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2004.12.047>.

SILVA, Simone S. et al. Novel Genipin-Cross-Linked Chitosan/Silk Fibroin Sponges for Cartilage Engineering Strategies. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.2764-2774, 13 out. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bm800874g>.

SIPAHIGIL, O.; DORTUNÇ, B.. Preparation and in vitro evaluation of verapamil HCl and ibuprofen containing carrageenan beads. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 228, n. 1-2, p.119-128, out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00814-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00814-6).

SLAUGHTER, Brandon V. et al. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 21, n. 32-33, p.3307-3329, 4 set. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200802106>.

STEVENS, M. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.887-894, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.07.002>.

SUMITA, y et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 17, p.3238-3248, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.055>.

SYKOVÁ, Eva et al. Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogels—Two Strategies for Spinal Cord Injury Repair. **Cellular And Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 26, n. 7-8, p.1111-1127, 22 abr. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-006-9007-2>.

TAN, Huaping et al. Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 18, n. 10, p.1961-1968, 7 jun. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3095-5>.

TAN, Huaping; MARRA, Kacey G.. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Materials**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.1746-1767, 10 mar. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma3031746>.

TIBBITT, Mark W.; ANSETH, Kristi S.. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 103, n. 4, p.655-663, 1 jul. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22361>.

TSAI, Cheng-jung; PAN, Bonnie Sun. Identification of Sulfoglycolipid Bioactivities and Characteristic Fatty Acids of Marine Macroalgae. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 34, p.8404-8410, 29 ago. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf302241d>.

USOV, A.I. Nmr-Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides - Agars, Carrageenans, and Xylans. **Botanica Marina**, v.27, n.5, p.189-202, 1984.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.44-84, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

VAN AMERONGEN, Machteld J. et al. The enzymatic degradation of scaffolds and their replacement by vascularized extracellular matrix in the murine myocardium. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 10, p.2247-2257, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.002>.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S.H.; USOV, A.I.; ROLLEMA, H.S. et al. H-1 and C-13 high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, n.3, p.73-92, 2002.

VELDE, Fred van de; PEREIRA, Leonel; ROLLEMA, Harry S.. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 339, n. 13, p.2309-2313, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2004.07.015>.

VERA, Jeannette et al. Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.2514-2525, 29 nov. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md9122514>.

WANG, Yaping et al. Novel hydroxyethyl chitosan/cellulose scaffolds with bubble-like porous structure for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 167, p.44-51, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.030>.

WEISSMAN, II. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, -, v. 1, n. 100, p.157-168, 7 jan. 2000.

WICHTERLE, O.; LÍM, D.. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, [s.l.], v. 185, n. 4706, p.117-118, jan. 1960. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/185117a0>.

WOO, Kyung Mi et al. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.335-343, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.013>.

WOO, Kyung Mi; CHEN, Victor J.; MA, Peter X.. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.531-537, 14 out. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.10098>.

XU, Bin et al. Chitosan hydrogel improves mesenchymal stem cell transplant survival and cardiac function following myocardial infarction in rats. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.588-594, 5 jan. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2017.4026>.

YAMANAKA, K Takahashi; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined fa. **Cell**, Kyoto, v. 4, n. 126, p.663-676, 25 ago. 2006.

YAROTSKY, S.V.; SHASHKOV, A.S.; USOV, A.I. Analysis of C-13-Nmr Spectra of Some Red Seaweed Galactans. **Bioorganicheskaia Khimiia Akademiia nauk**, v.3, n.8, p.1135-1137, 1977.

YOO, Hyuk Sang et al. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 26, n. 14, p.1925-1933, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.021>.

YOON, Diana M. et al. Effect of construct properties on encapsulated chondrocyte expression of insulin-like growth factor-1. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.299-306, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.039>.

YOON, Dm; FISHER, Jp. Chondrocyte signaling and artificial matrices for articular cartilage engineering. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, -, v. -, n. 585, p.67-86, Não é um mês valido!/Não é um mês valido! 2006.

ZHANG, Jun et al. The Preclinical Research Progress of Stem Cells Therapy in Parkinson's Disease. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2016, p.1-6, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5683097>.

ZHU, Junmin. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 31, n. 17, p.4639-4656, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044>.

ARTIGO

Development of a New Injectable Scaffold for Application in Health

Laísa Camerini da Rosa¹, Laís Andrade Ferreira², Camila Perelló Ferrúa¹, Bruna Pacheco³, Claudio Martin Pereira de Pereira³, Fernanda Nedel^{1*}

¹Catholic University of Pelotas. Graduate Program in Health and Behaviour.

²Federal University of Pelotas. Undergraduate Program in Biotechnology.

³Federal University of Pelotas. Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting.

* Corresponding author:

Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas, Rua Gonçalves Chaves, 377 – sala 411 prédio C, CEP. 96015-560, Pelotas, RS, Brazil

Tel.: +55 53 2128 8408; fax: +55 53 2128 8229.

E-mail address: fernanda.nedel@gmail.com (Fernanda Nedel).

Abstract

Tissue engineering typically involves three major components, which are termed tissue engineering pillars: responsive cells (stem cells), scaffolds and signaling molecules (such as proteins and growth factors). Scaffolds are three-dimensional structures that provide cell support and serve as a guide for cell colonization, proliferation and differentiation. In recent years, synthetic and natural polymers have been investigated as biomaterials for a wide range of applications, including tissue regeneration and tissue engineering. However, natural biomaterials, for the most varied applications, are not available, leading to dependence on external technology and causing an expanding market to be discredited on the national scene. In this sense, the present study aims to develop and characterize a new injectable scaffold from *Gigartina skottsbergii* algae found in the Latin American continent, which together with its bioproducts can be used in tissue engineering and cell therapy, with initial application in the medical area. To do so, a gel was synthesized and processed from *G. Skottsbergii*, which was analyzed and tested as a new scaffold. Thus, the viability and cell adhesion capacity of the scaffold were evaluated using the WST-1 colorimetric assay, and scanning electron microscopy (SEM), against an immortalized mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) cell line. Data evaluation was performed using the two-way ANOVA followed by the Tukey test with a significance level of $p < 0.05$. In this sense, it is possible to observe the three-dimensional structure of the *G. skottsbergii* algae, as well as the NIH/3T3 cells in this structure. It is observed that the cells are in great quantity and strongly adhered to the algae structure, maintaining an elongated morphology and with extensions. In relation to the evaluation of the three-dimensional structure of the hydrogel from the *G. Skottsbergii* algae and the morphology of the NIH/3T3 cells seeded on it, large areas can be observed for the cellular adhesion, and laminar and filamentar structures that interconnect are seen, adhered to this structure it is possible to observe NIH/3T3 cells with elongated morphology and extensions. Also, it is observed that there was a greater cell viability in the group containing a 1/4 dilution of the gel from the *G. Skottsbergii* algae with 5 hours and culture and also with 48 hours of culture.

Keywords: carrageenan, injectable hydrogel, *Gigartina skottsbergii*

1 Introduction

Since its emergence, tissue engineering has evolved continuously with the aim of developing biological substitutes to restore, replace or regenerate defective tissues (CHAN & LEONG, 2008). Tissue engineering typically involves three main components, which are termed the pillars of tissue engineering: responsive cells; scaffolds, which may be either natural or synthetic, to provide a platform for cell function, adhesion and transplantation; and signaling molecules, such as proteins and growth factors derived from cellular functions of interest (NEDEL et al, 2009).

Biomaterials play an important role in advancing the field of tissue engineering and can serve as a scaffold designed to replace, repair and maintain organ structures (PATEL & FISHER, 2008). Scaffolds are three-dimensional structures that provide support and serve as a guide for cell colonization, proliferation and differentiation, and are also able to provide a varied set of physiological signals for developing tissues (DEMARCO et al., 2010; ZHU, 2010). Therefore, scaffolds exert the structural and biochemical functions of the native extracellular matrix (ECM) until the cells are able to produce their own support matrix (WOO et al, 2007).

In addition to development of new and promising scaffolds, researchers have sought to identify different natural components that can serve as cell anchorage sites and that simultaneously participate or conduct signaling processes for the cells, thus allowing them to migrate, proliferate and differentiate (DEMARCO et al, 2010; ANDRIANI et al, 2000; CREVENSTEN et al, 2004; SYKOVÁ et al, 2006). Considering that stem cells are able to proliferate, self renew and differentiate into multiple lineages, it has been considered that these can be highly induced by natural components (SUMITA et al, 2006). In this context, it can be seen that advances in tissue engineering have made possible a great evolution in health, mainly in combination with the use of stem cells (NEDEL et al, 2009).

In recent years, synthetic and natural polymer materials have been investigated as biomaterials. However, there are no natural biodegradable polymers available today for use in biological processes applied to health, such as systems for making scaffolds for tissue engineering and injectable scaffolds for various biological and regenerative applications (DEMARCO et al, 2010).

The materials currently available come from importation, representing high cost and reliance on external technology. One of the limiting factors in making tissue engineering feasible in clinical terms is the production of lower cost inputs, mainly in biomaterials. Thus, there is a dependence on external technology, causing a market in large expansion to be discredited and restricted in the national scenario.

During the last decade, injectable hydrogel scaffolds have received considerable attention because of their unique composition and structural similarities with natural ECM, in addition to their desirable framework for cell proliferation and survival (EL-SHERBINY & YACOUB, 2013). The injectable nature of the hydrogels provides the attractive feature of easy and homogeneous cell distribution within any defect of size or shape prior to gelation (NUTTELMAN et al, 1998).

In this sense, marine algae have been considered promising in several areas, since they have several components with potential applicability, being these natural pigments, essential minerals, vitamins, lipids, enzymes and polysaccharides (MOHAMED et al, 2012). Regarding the health, several studies have shown its application in relation to antiviral, anti-allergic, anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties (TSAI & PAN, 2012).

The use of polysaccharides as support systems for tissue formation reveals a growing tendency in the biomedical field, where polysaccharides from algae such as carrageenan play important roles in biomedical applications (POPA et al, 2014). Carrageenans are temperature dependent compounds, being soluble in gel at temperatures between 30 and 40°C, thus opening perspectives to develop hydrogel systems at body temperature (NÚÑEZ-SANTIAGO et al, 2011).

In this sense, studies have been reporting the carrageenan systems synthesized by the nuclear phases of the alga *Gigartina skottsbergii*, a red marine algae (MATULEWICZ et al, 1989; MATULEWICZ et al, 1990). However, the characteristics and specific hydrogel properties derived from *G. skottsbergii* as to their regeneration potential have not yet been explored.

Thus, in view of the various therapeutic properties of this algae, and knowing the ability of gelation of carrageenan and hydrogel formation, preliminary studies of our research group showed that *G. skottsbergii* when

immersed in aqueous medium has the ability to release a viscous component, consistent with a gel consistency, allowing to glimpse interesting aspects in the sense of having a potential capacity as an injectable scaffold for tissue engineering in health.

2 Materials and Methods

2.1 Obtainment of *Gigartina skottsbergii* algae

The *Gigartina skottsbergii* algae was supplied by the Universidad de Magallanes located in Chile. The freeze-dried fraction of *G. skottsbergii* was previously obtained through cooperation from the Graduate Program in Health and Behavior of the Catholic University of Pelotas and Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting of the Federal University of Pelotas.

2.2 Gel Formation

For gel formation, a ratio of 0.9646 g of algae to 40 ml of DMEM culture medium was established from previously experiments for the proper consistency on gel formation, obtaining this way 0.024115 g/mL algae.

Thus, 0.9646 g of algae was weighed by placing it in a petri dish and sterilized with UV light in the laminar flow hood for 80 minutes. The 40 ml of DMEM culture medium was added in the petri dish in 20 minute intervals with sterilization by UV light for gel formation. The volume of medium was adjusted according to the variation in algae weighing. Between the intervals the pieces of the algae were cut so that the contact area increased and more gel was released. After that, the plate was incubated for 48 hours until gel formation.

2.3 Cell Line

An immortalized mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) cell line obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) (Gibco-BRL, Grand Island, NY) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO² until a subconfluence was achieved, as previously described (HENN et al., 2011; NEDEL et al., 2012).

2.4 Cell Adhesion and Proliferation Assay with Scanning Electron Microscopy (SEM) – Algae

Based on the three-dimensional structure offered by *G. skottsbergii*, the study model aimed to support cell growth in a firm structure but with malleability, which can be used in tissue engineering approaches and in regeneration processes. In that way, fragments of the hydrated algae were added to two 24-well plates and after that, 250 μL of cell was added to each well at a density of $5 \cdot 10^4$ cells/well. Control groups consisted of wells containing only the fragments and culture medium. Subsequently the plates were incubated for 3 and 5 hours under the conditions of 5% CO_2 and a temperature of 37°C .

Cells were then fixed using the freeze-drying and lyophilization method as established by Santana et al., in 2015, where after each incubation period the plates were directly frozen at -20°C for 3 hours, then transferred and frozen at a temperature of -80°C for 24 hours. The samples were then lyophilized (L101, Liobras, Brazil) for 24 hours. Finally, the samples were stained with gold and analyzed with the 15kV SEM (Shimatzu SSX-550-Japan), in different magnitudes (200-500 Mag) (SANTANA et al., 2015).

2.5 Cell Adhesion and Proliferation Assay with Scanning Electron Microscopy (SEM) – Gel

The second model consisted on cell culture in the gel formed by the algae. After the 48 hours of the gel formation process in the flow, 250 μL of gel per well was added in a 24-well plate and the same was sterilized with UV light for 40 minutes. After that, 250 μL of cell was added to each well at a density of $5 \cdot 10^4$ cells/well, thus completing 500 μL . Subsequently the plate was incubated for 5 hours under conditions of 5% CO_2 and temperature of 37°C .

Cells were then fixed using the freeze-drying and lyophilization method as established by Santana et al., in 2015, where after incubation period the plates were directly frozen at -20°C for 3 hours, then transferred and frozen at a temperature of -80°C for 24 hours. The samples were then lyophilized (L101, Liobras, Brazil) for 24 hours. Finally, the samples were stained with gold and

analyzed with the 15kV SEM (Shimatzu SSX-550-Japan), in different magnitudes (200-500 Mag) (SANTANA et al., 2015).

2.6 Cell Viability and Proliferation Assay with WST-1

The experimental protocol for cell viability and proliferation with WST-1 was carried out with the aim of evaluating whether the gel of the *G. skottsbergii* algae is capable of acting as a possible scaffold for the adhesion and proliferation of NIH/3T3 cells. After 48 hours of gel formation, in the flow, dilutions of the gel were made from the mother concentration (MC) in ratios of MC 1:2, MC 1:4 and MC 1:8 with DMEM culture medium. 50 µl of gel per well were added to two 96 wells plates and sterilized with UV light for 40 minutes. After that, 50 µl of cells were added in each well, at a density of 1.10^4 cells/well, thereby completing 100 µl. Control groups consisted of wells containing only culture medium, only cells and only gel. Subsequently the plates were incubated for 5 and 48 hours under the conditions of 5% CO² and 37°C.

Cell proliferation was analyzed by a WST-1 colorimetric assay (NEDEL et al., 2012). After 5 and 48 hours, 10 µL of WST-1 were added to the 100 µL of gel and pre-existing cells, which were kept in contact with the cells for 4 hours. After 4 hours the absorbance reading in the spectrophotometer (Thermo Plate TP-Reader) was then performed at a wavelength of 450 nm.

2.7 Statistical Analysis

Data were evaluated using the two-way ANOVA followed by the Tukey's test for multiple comparisons, with a significance level of $p < 0.05$. GraphPadPrism, version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) was used for the elaboration of the graphs.

3. Results

3.1 Cell Adhesion and Proliferation Assay with Scanning Electron Microscopy (SEM) – Algae

The first model had as purpose to support the cellular growth in a firm structure but with malleability, being able to be used in tissue engineering approaches and regeneration processes. In this sense, by scanning electron

microscopy (SEM) it is possible to observe the three-dimensional structure of the *G. skottsbergii* algae, as well as the behavior of the mouse fibroblasts (NIH/3T3) in this structure. It is observed that the cells are in great quantity and strongly adhered to the algae structure, maintaining an elongated morphology and with extensions as can be observed in Figures 1 and 2.

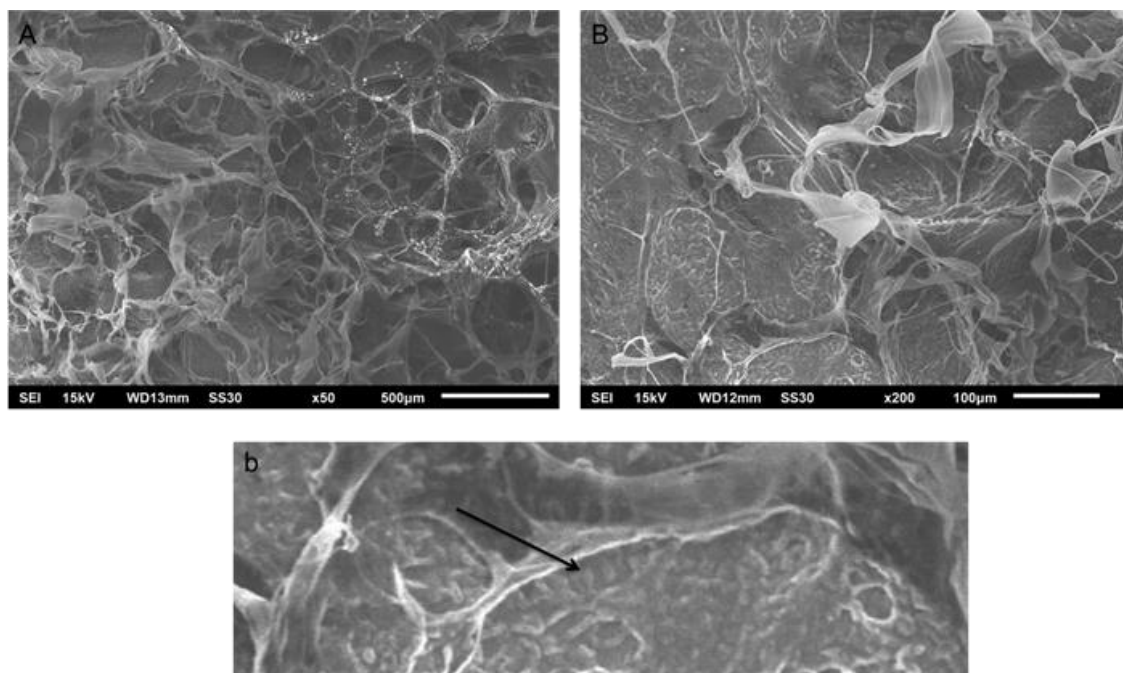


Figure 1. SEM micrographs of the scaffold from *G. skottsbergii* algae seeded with NIH/3T3 cells for 3h. A: x50 magnification. B: x200 magnification; b: amplification showing cell adhesion to scaffold structure (arrows indicate cells).

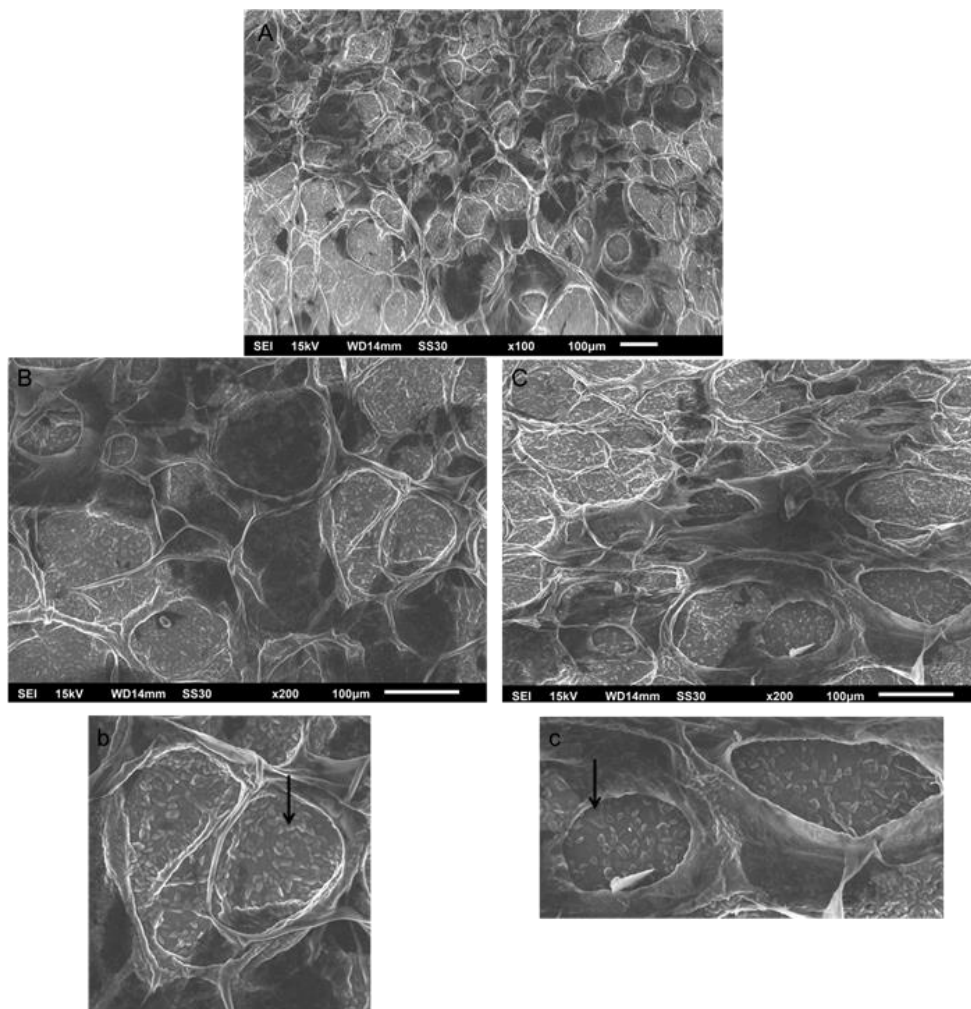


Figure 2. SEM micrographs of the scaffold from *G. skottsbergii* algae seeded with NIH/3T3 cells for 5h. A: x100 magnification. B: x200 magnification; b and c: amplifications of B and C, respectively, showing cell adhesion to the structure of the scaffold (the arrows indicate cells).

3.2 Cell Adhesion and Proliferation Assay with Scanning Electron Microscopy (SEM) – Gel

The other approach consisted in the development of a hydrogel from the gel released by *G.skottsbergii*, which would allow its application in regions where adaptation to the insertion medium and malleability are key points.

In this sense, in relation to the evaluation of the three-dimensional structure of the hydrogel from the *G. Skottsbergii* algae and the morphology of the NIH/3T3 cells seeded on it, in Figure 3 large areas can be observed for the cellular adhesion, and laminar and filamentar structures that interconnect are seen. Adhered to this structure it is possible to observe NIH/3T3 cells with elongated morphology and extensions (Figure 3b and 3c, indicated by arrows), with only 5 hours of contact.

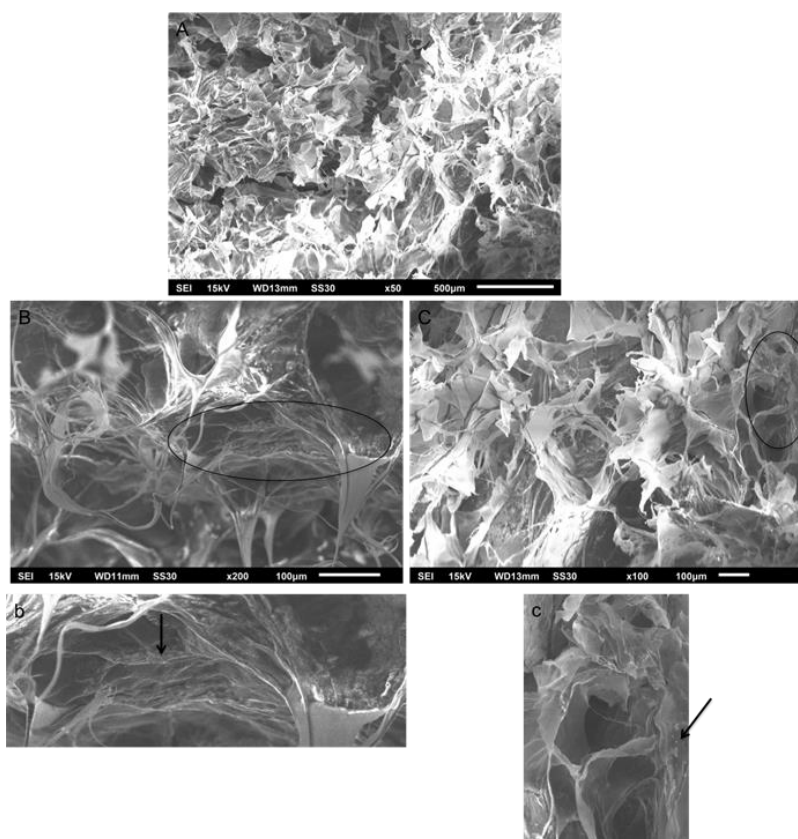


Figure 3. SEM micrographs of the hydrogel scaffold from *G. skottsbergii* algae seeded with NIH/3T3 cells for 5 hours. A: x50 magnification; B: x200 magnification; C: x100 magnification; b and c: amplifications of B and C, respectively, showing cell adhesion to the scaffold structure (arrows indicate cells).

3.3 Cell Viability and Proliferation Assay with WST-1

Cell viability test was performed with different concentrations of the gel from *G. skottsbergii* (Figure 3). It is observed that there was a greater cell viability in the group containing a 1/4 dilution of the gel from the *G. Skottsbergii* algae with 5 hours and culture and also with 48 hours of culture.

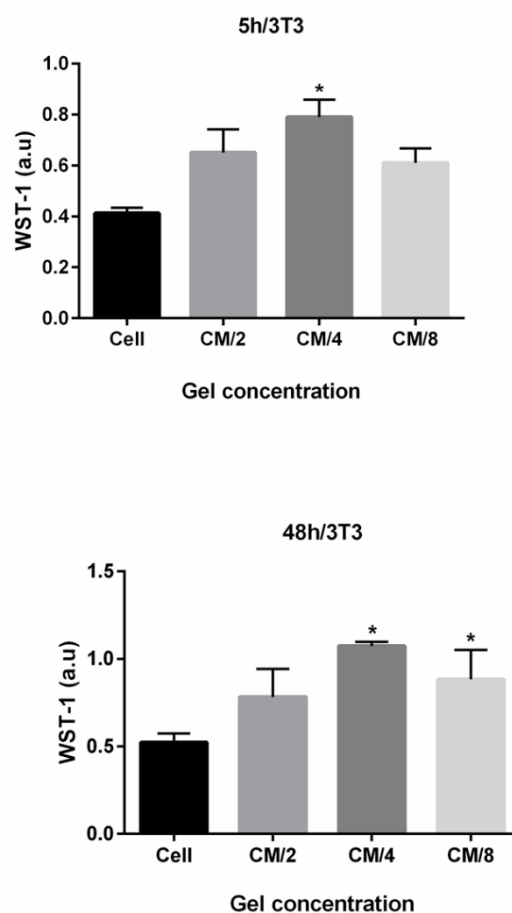


Figure 4. Cell viability of NIH/3T3 cells in 5 and 48 hours when in contact with the hydrogel scaffold from *G. skottsbergii* algae. Data are expressed as mean \pm SEM. A value of $p < 0.05$ was considered significant (Tukey's test).

4 Discussion

The present article has developed a new injectable scaffold from the *Gigartina skottsbergii* red algae, found in the Latin American continent, which together with its bioproducts can be used in tissue engineering and cell therapy, with initial application in the medical and industrial area.

The invention is distinguished by the development of injectable bioactive materials, where the application of such materials can be applied to areas of bone regeneration, cartilage and joints. Furthermore, the incorporation of natural extracts can optimize cell proliferation and adhesion and improve the tissue-scaffold interface, enabling the development of an innovative material and with greater similarity with the native extracellular matrix.

Scaffolds are three-dimensional structures that are intended to provide support, as well as being guides for colonization, cell proliferation and

differentiation, and are also able to provide physiological signals for developing tissues (DEMARCO et al., 2010). In this sense, tissue engineering has developed and improved scaffolds that mimic the ECM itself, using it as a model and gold standard. (WOO et al, 2003; WOO et al, 2007).

Currently, several researchers have sought to identify natural compounds that could serve as cell-anchoring sites, as well as to conduct signaling processes to the cells, allowing the migration, proliferation, and differentiation of these compounds (SILVA et al., 2005; ALQUINO et al., 2009). In this sense, it is already established that natural products have been widely used in the pharmaceutical industry, where they have the capacity to modulate the cellular response in some pathological conditions (MEINEL et al, 2004; KIM et al, 2013).

The use of natural products to modulate cellular behavior has shown that the Acemannan extract from Aloe vera could function as a bioactive molecule inducing bone formation by stimulating the differentiation of BMSCs into osteoblasts and extracellular matrix synthesis, thus being a natural biomaterial candidate for bone regeneration (BOONYAGUL et, 2014).

In addition to performing an inducing effect on cells, natural products have been identified as important adhesion factors. In this sense, Silva et al., demonstrated that the Aloe Vera gel associated with chitosan contributes to an improvement in cellular adhesion of fibroblasts on the surface of these membranes (SILVA et al, 2008).

Hydrogel scaffolds have received considerable attention due to their unique composition and structural similarity to the natural ECM. In addition, they exhibit desirable characteristics for cell proliferation and survival (EL-SHERBINY et al, 2013), since they may mimic the physical, chemical, electrical and biological properties of most biological tissues (SLAUGHTER et al, 2008).

The appearance of hydrogels dates back more than 50 years, when Slaughter et al., developed and investigated a hydrogel based on 2-hydroxyethyl polymethacrylate in contact lens applications (SLAUGHTER et al, 1960). During the last decade, new applications for hydrogels have arisen especially in tissue engineering, immunomodulation, cellular and molecular therapies, and cancer research (DISCHER et al, 2009; TIBBITT et al, 2009).

In this sense, a study evaluated the effectiveness of an Aloe vera hydrogel in the form of a bioadhesive plaster for the treatment of aphthous stomatitis (mouth sores) in pediatric patients (ANDRIANI et al, 2000). An improvement in symptomatology began on day 2 of treatment in 74% of patients and the results of this study emphasize good efficacy and compliance for the treatment of aphthous stomatitis (ANDRIANI et al., 2000).

Similarly, hydrogel cell suspension has been used for cell injection and delivery, where studies by Crevensten have explored the use of mesenchymal stem cells for the regeneration of intervertebral discs in an in vivo model to investigate the viability of the release, retention and survival of exogenous cells in pressurized disk space, from the injection of mesenchymal stem cells into coccygeal disks of mice using 15% hyaluronan gel as a carrier (CREVENSTEN et al, 2004). The results showed a tendency to increase disk height compared to the blank gel, which suggests an increase in matrix synthesis, thus indicating that mesenchymal stem cells can maintain viability and proliferate within the rat intervertebral disc (CREVENSTEN et al., 2004).

Injectable hydrogels are promising substrates for application in tissue engineering, due to the high water content, the ability to homogeneously encapsulate cells, easily manipulated physical properties and minimally invasive delivery (DRURY & MOONEY, 2003). More importantly, injectable hydrogels have a structure similar to ECM and allow a good physical integration, avoiding surgical procedures, thus facilitating the use of minimally invasive approaches to the material and the distribution of cells (BRANDL et al, 2007).

The need for injectable and biodegradable hydrogels in biomedical applications is immense. An example is the use of hydrogels in cartilage regeneration (HOLLAND et al, 2004). The physical properties of the hydrogel can be easily designed to match those of the articular cartilage in addition to combining mechanical properties of the scaffold with the native tissue (CREVENSTEN et al., 2004). Other applications for hydrogels include regeneration of soft tissue after removal of tumor or trauma. A number of researchers have been studying the combination of injectable hydrogels and biodegradable microspheres for the controlled delivery of drugs in tissue engineering, where when exposed to the adipogenic or osteogenic medium,

cells differentiated into adipocytes and osteoblasts, respectively, while they were bound to the microspheres (RUBIN et al, 2007).

However, hydrogels derived from natural polymers often undergo rapid degradation when in contact with body fluids, so the limitations of natural hydrogels have motivated approaches to modify these polymers (YOO et al, 2005).

A representative natural polymer is alginate, a linear and hydrophilic polysaccharide that is primarily derived from brown algae bacteria (ROWLEY et al, 1999). Alginate hydrogel has been used in a variety of medical applications, including cell encapsulation, tissue engineering and drug delivery, since it gels under mild conditions, has low toxicity and is readily available (STEVENS et al., 2004).

However, despite its advantageous characteristics, alginate may not be an ideal candidate for tissue engineering, since it has a low rate of enzymatic degradation in mammals (AUGST et al, 2006) and especially a reduced cell adhesion capacity (SANTANA et al., 2012), thus compromising tissue development requiring more research of better candidates for natural injectable scaffolds (KONG et al, 2004).

It is important to note that marine algae have been found to be promising in many areas, since they have several components with potential applicability, such as natural pigments, essential minerals, vitamins, lipids, enzymes and polysaccharides (MOHAMED et al., 2012). In the present study, a number of studies have been carried out to evaluate the anti-inflammatory properties (LORENTE-CEBRIÁN et al, 2015) and antioxidant properties (TSAI & SUN, 2012).

An economically significant market for red algae was implemented primarily for its portion of polysaccharide content, using as an example carrageenan (BIXLER & PORSE, 2011). The use of polysaccharides as support systems for tissue formation reveals an increasing trend in the biomedical field (POPA et al, 2014). Studies have also shown that the presence of sulfate groups in their structure and chemical affinity with mammalian glycosaminoglycans play important roles in the antiviral, anticoagulant, antioxidant and anticancer activity of these polysaccharides (VERA et al, 2011).

Carrageenans are temperature dependent compounds exhibiting gel conformation at temperatures between 30 and 40°C, thus designated as a physical hydrogel (MANGIONE et al, 2003). Thus, thermo-responsive solubility behavior and gelation promoted by monovalent cations, such as potassium ions, opens perspectives for the development of hydrogel systems at body temperature (MATULEWICZ et al, 1989). In this sense, studies have reported the carrageenan systems synthesized by the *Gigartina skottsbergii* algae (MATULEWICZ et al, 1989; MATULEWICZ et al., 1990).

G. skottsbergii is an endemic algae present in the southern region of the Latin American continent (MANSILLA et al, 2012). Its polysaccharide portion of carrageenan, as mentioned previously, has been studied with antiviral applications, where studies have identified several structural types of natural carrageenans, isolated from *G. skottsbergii*, as selective inhibitors of HSV-1 (herpes simplex virus type 1) and herpes simplex virus type 2, both in Vero cells and in neural cells in *in vitro* studies (CARLUCCI et al, 1999), and in murine model in *in vivo* studies (PUJOL et al, 2006).

In addition, carrageenan hydrogels have been used primarily as drug delivery or growth factor systems (ROCHA et al, 2011), enzyme immobilization (DESAI et al, 2004) and pharmaceutical formulations (SIPAHIGIL et al, 2001). Furthermore, carrageenan has been used to encapsulate stem cells derived from human adipocytes and human nasal chondrocytes (POPA et al, 2012).

However, the characteristics and specific properties of this the hydrogel derived from *G. skottsbergii* as to their application potential in the areas of regeneration and tissue engineering have not yet been explored. Thus, we take into account the diverse therapeutic properties of this algae, and knowing of the gelling ability of carrageenan and hydrogel formation, our studies showed that *G. skottsbergii* when immersed in aqueous medium has the ability to release a viscous component, consistency in gel, where the *G. skottsbergii* showed to possess potential capacity as an injectable scaffold for tissue engineering in health.

Regarding the fundamental physical-chemical and biological properties to the design or determination of the suitability of this scaffold, the hydrogel developed from *G. skottsbergii* proved to be biocompatible, where the cells

adhered normally migrating to the surface and through the scaffold; where they must begin to proliferate before establishing a new matrix.

Regarding the physical-chemical properties, the scaffold has the characteristics consistent with the anatomical location where it can be implanted, since it is an injectable hydrogel, allowing an easy and minimally invasive manipulation during the implantation.

In addition, the scaffold showed to have an adequate architecture, which has a structure of high porosity, where the pores are interconnected, to assure the cellular infiltration and to make possible an adequate diffusion of nutrients, O² and CO².

It is important to note that developed scaffolds must have good biodegradability, since these are generally not designed to be permanent implants, where the scaffold must allow the cells to produce their own ECM (GILBERT et al, 2007; VAN AMERONGEN et al, 2006). Thus, it is understood that the chemical and mechanical analysis of the hydrogel scaffold developed need to be performed to confirm this property, in addition to confirming the content of carrageenan present in this gel.

5 Conclusion

It is worth noting that synthetic and natural polymeric materials have been investigated as biomaterials. However, there are no national biodegradable polymers available today for use in biological processes applied in health, such as systems for making scaffolds for tissue engineering and injectable scaffolds for various biological and regenerative applications (DEMARCO et al, 2010) . The materials currently available come from importation, representing high cost and reliance on external technology.

In this sense, this invention allows us to advance towards the development of new structures in the area of tissue engineering and regeneration, contributing to the development of national scaffolds. It is worth noting that the group is currently seeking new funding for the physicochemical characterization of the scaffold exposed above, as well as tests with confocal microscopy, flowering microscopy and gene expression.

6 References

ANDRIANI, e et al. The effectiveness and acceptance of a medical device for the treatment of aphthous stomatitis. Clinical observation in pediatric age. **Minerva Pediatrics**, -, v. 1-2, n. 52, p.15-20, jan. 2000.

AUGST, Alexander D.; KONG, Hyun Joon; MOONEY, David J.. Alginate Hydrogels as Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.623-633, 7 ago. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.200600069>.

BOONYAGUL, Sani et al. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. **Odontology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.310-317, 12 jan. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10266-012-0101-2>.

BRANDL, Ferdinand; SOMMER, Florian; GOEPFERICH, Achim. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.134-146, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.017>.

CARLUCCI, M.j.; SCOLARO, L.a.; DAMONTE, E.b.. Inhibitory Action of Natural Carrageenans on Herpes simplex Virus Infection of Mouse Astrocytes. **Chemotherapy**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.429-436, 1999. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000007236>.

CHAN, B. P.; LEONG, K. W.. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **European Spine Journal**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.467-479, 13 nov. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>.

CREVENSTEN, Gwen et al. Intervertebral Disc Cell Therapy for Regeneration: Mesenchymal Stem Cell Implantation in Rat Intervertebral Discs. **Annals Of Biomedical Engineering**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.430-434, mar. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:abme.0000017545.84833.7c>.

D'AQUINO, Riccardo et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. **Journal Of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, [s.l.], v. 312, n. 5, p.408-415, 15 jul. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.b.21263>.

DEMARCO, Flavio F. et al. Effects of Morphogen and Scaffold Porogen on the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. **Journal Of Endodontics**, [s.l.], v. 36, n. 11, p.1805-1811, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.031>.

DESAI, P.d.; DAVE, A.m.; DEVI, Surekha. Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 31, n. 4-6, p.143-150, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.08.004>.

DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W.. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. **Science**, [s.l.], v. 324, n. 5935, p.1673-1677, 25 jun. 2009. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171643>.

DRURY, Jeanie L.; MOONEY, David J.. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, [s.l.], v. 24, n. 24, p.4337-4351, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00340-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00340-5).

EL-SHERBINY, Ibrahim M.; YACOUB, Magdi H.. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. **Global Cardiology: Science and Practice**, Giza, Egypt, v. 3, p.316-342, 1 nov. 2013.

GILBERT, Thomas W.; STEWART-AKERS, Ann M.; BADYLAK, Stephen F.. A quantitative method for evaluating the degradation of biologic scaffold materials. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.147-150, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.022>.

HOLLAND, Theresa A. et al. Transforming growth factor- β 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.101-114, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.007>.

KIM, do Rim et al. Aconiti Lateralis Preparata Radix Activates the Proliferation of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Induces Osteogenic Lineage Differentiation through the Bone Morphogenetic Protein-2/Smad-Dependent Runx2 Pathway. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2013, p.1-10, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/586741>.

KONG, H. J. et al. Controlling Degradation of Hydrogels via the Size of Crosslinked Junctions. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 16, n. 21, p.1917-1921, 4 nov. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200400014>.

LORENTE-CEBRIÁN, Silvia et al. An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. **Journal Of Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.341-349, 11 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-015-0395-y>.

MANGIONE, M.r et al. Thermoreversible gelation of κ -Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 104, n. 1, p.95-105, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00341-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00341-1).

MANSILLA, Andrés; ÁVILA, Marcela; YOKOYA, Nair S.. Current knowledge on biotechnological interesting seaweeds from the Magellan Region, Chile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.760-767, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2012005000074>.

MATULEWICZ, Maria C. et al. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 28, n. 11, p.2937-2941, jan. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80257-2](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(89)80257-2).

MATULEWICZ, Maria C. et al. Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 29, n. 11, p.3407-3410, jan. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85247-d](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)85247-d).

MEINEL, Lorenz et al. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.25-34, 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30117>.

MOHAMED, Suhaila; HASHIM, Siti Nadia; RAHMAN, Hafeedza Abdul. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.83-96, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.001>.

NEDEL, Fernanda et al. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. **The Journal Of Contemporary Dental Practice**, Pelotas Brasil, v. 10, n. 4, p.90-96, 2009.

NÖR, J. E.. Buonocore Memorial Lecture. **Operative Dentistry**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.633-642, nov. 2006. Operative Dentistry. <http://dx.doi.org/10.2341/06-000>.

NUÑEZ-SANTIAGO, M.c. et al. Rheology and microstructure of κ -carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.32-41, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.003>.

NUTTELMAN, Charles R. et al. Macromolecular monomers for the synthesis of hydrogel niches and their application in cell encapsulation and tissue engineering. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.167-179, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.09.006>.

PATEL, M; FISHER, Jp. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. **Pediatric Research**, Maryland, v. 5, n. 63, p.497-501, maio 2008.

PUJOL, C. A. et al. Antiviral Activity of a Carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against Intraperitoneal Murine Herpes simplex Virus Infection. **Planta Medica**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.121-125, nov. 2006. Thieme Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-373168>.

POPA, Elena; REIS, Rui; GOMES, Manuela. Chondrogenic phenotype of different cells encapsulated in κ -carrageenan hydrogels for cartilage regeneration strategies. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.132-141, mar. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1007>.

POPA, Elena Geta; REIS, Rui Luís; GOMES, Manuela Estima. Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.410-424, 19 mar. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2014.889079>

ROCHA, Pedro M et al. Encapsulation of adipose-derived stem cells and transforming growth factor- β 1 in carrageenan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal Of Bioactive And Compatible Polymers**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.493-507, set. 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0883911511420700>.

RUBIN, J Peter. et al. Collagenous Microbeads as a Scaffold for Tissue Engineering with Adipose-Derived Stem Cells. **Plastic And Reconstructive Surgery**, [s.l.], v. 120, n. 2, p.414-424, ago. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.prs.0000267699.99369.a8>.

SANTANA, Bianca et al. Comparing Different Methods to Fix and to Dehydrate Cells on Alginate Hydrogel Scaffolds Using Scanning Electron Microscopy. **Microscopy Research And Technique**, Pelotas Brasil, v. 78, n. 7, p.553-561, 2015.

SILVA, Simone S. et al. Novel Genipin-Cross-Linked Chitosan/Silk Fibroin Sponges for Cartilage Engineering Strategies. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.2764-2774, 13 out. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bm800874g>.

SIPAHIGIL, O.; DORTUNÇ, B.. Preparation and in vitro evaluation of verapamil HCl and ibuprofen containing carrageenan beads. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 228, n. 1-2, p.119-128, out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00814-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00814-6).

SLAUGHTER, Brandon V. et al. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 21, n. 32-33, p.3307-3329, 4 set. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200802106>.

STEVENS, M. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.887-894, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.07.002>.

SUMITA, y et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 17, p.3238-3248, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.055>

SYKOVÁ, Eva et al. Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogels—Two Strategies for Spinal Cord Injury Repair. **Cellular And Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 26, n. 7-8, p.1111-1127, 22 abr. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-006-9007-2>.

TIBBITT, Mark W.; ANSETH, Kristi S.. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 103, n. 4, p.655-663, 1 jul. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22361>.

TSAI, Cheng-jung; PAN, Bonnie Sun. Identification of Sulfoglycolipid Bioactivities and Characteristic Fatty Acids of Marine Macroalgae. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 34, p.8404-8410, 29 ago. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf302241d>.

VAN AMERONGEN, Machteld J. et al. The enzymatic degradation of scaffolds and their replacement by vascularized extracellular matrix in the murine myocardium. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 10, p.2247-2257, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.002>.

VERA, Jeannette et al. Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.2514-2525, 29 nov. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md9122514>.

WOO, Kyung Mi; CHEN, Victor J.; MA, Peter X.. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.531-537, 14 out. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.10098>.

WOO, Kyung Mi et al. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.335-343, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.013>.

YOO, Hyuk Sang et al. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 26, n. 14, p.1925-1933, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.021>.

ZHU, Junmin. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 31, n. 17, p.4639-4656, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044>.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação teve por objetivo desenvolver e caracterizar um novo *scaffold* injetável proveniente da alga rodofícea *Gigartina skottsbergii*, encontrada no continente latino americano, o qual juntamente com os seus bioprodutos, possa ser empregado em engenharia tecidual e terapia celular, com aplicação inicial na área medica e industrial.

Assim, a invenção diferencia-se por apresentar o desenvolvimento de materiais bioativos injetáveis, o que é de grande relevância para engenharia do tecido pulpar num primeiro momento, em função da necessidade de se injetar o *scaffold* no interior da câmara pulpar ou no canal radicular. Posteriormente, a aplicação de materiais injetáveis pode ser ampliada para áreas de regeneração óssea, cartilagens e articulações. Ainda, a incorporação de extratos naturais podem otimizar a proliferação e adesão celular e aprimorar a interface tecido-*scaffold*, viabilizando o desenvolvimento de um material inovador e com maior similaridade com a matriz extracelular nativa.

Neste sentido, esta invenção nos permite avançar em direção ao desenvolvimento de novas estruturas na área de engenharia e regeneração tecidual, contribuindo para o desenvolvimento de *scaffolds* nacionais, uma vez que, em sua maioria, os materiais disponíveis são advindos de importação representando custo elevado e dependência de tecnologia externa.

Vale salientar que o grupo neste momento busca novos financiamentos para a realização dos ensaios de viabilidade celular e microscopia eletrônica de varredura (MEV) das duas linhagens de células-tronco pulpares DPSCs e SHEDs, além do ensaio de viabilidade celular DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) e LiveDead das três linhagens celulares. Por fim, realizar também a caracterização físico-química do *scaffold*.

ANEXOS**Anexo A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Termo de consentimento ético para pesquisa em seres humanos

Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Odontologia

Autorização para Pesquisa e Execução de Tratamento

Projeto: Isolamento e caracterização de células-tronco de tecido pulpar dental.

Responsável: Prof. Flávio Fernando Demarco

NOME DO PACIENTE:

FICHA N.º: _____

Por este instrumento que atende às exigências legais, o (a) senhor (a) _____, portador (a) da cédula de identidade nº _____, SSP/_____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo (s) profissional (is) em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma seu CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, sem ser prejudicado no tratamento, e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Pelotas, _____ de _____ de 201_:

Assinatura do paciente

Responsável pelo estudo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Carta de Informação ao Paciente

Este estudo englobará pacientes que utilizam os serviços do setor de Cirurgia Buco-maxilofacial e Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia, e que por necessidade clínicas e terapêuticas necessitarão remover os terceiros molares e molares decíduos hígidos.

Uma vez indicado a necessidade de remoção do(s) dente(s) (terceiro molar) pelos professores responsáveis do setor de Cirurgia Buco-maxilofacial e Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia, o(s) mesmo(s) será(ão) removido(s) e armazenado(s) em um meio de cultivo até o seu processamento no laboratório. As células no interior do dente (tecido pulpar) serão então isoladas, cultivadas e caracterizadas por uma série de etapas laboratoriais. Este trabalho tem por finalidade adquirir estas células para que possamos estudar novas formas de tratamento que possibilitem curar o tecido no interior do dente, que por algum motivo tenha sofrido algum dano. É importante, porém ressaltar que o paciente não terá um benefício imediatos, pois este projeto visa resultados a longo prazo em função da sua complexidade.

Desta forma, estando informado do estudo que será realizado, dou pleno consentimento à Faculdade de Odontologia de Pelotas para que, por intermédio de seus professores, alunos de pós-graduação e graduação devidamente autorizados, utilizem o material biológico coletado, de acordo com os conhecimentos científicos e de forma ética.

Concordo também, que a documentação relativa ao estudo deverá ser arquivada na Faculdade de Odontologia e mantida sob a guarda dos autores do projeto de pesquisa, que se comprometem a manter sigilo dos dados coletados, não relacionando as células obtidas com qualquer dado dos pacientes, garantir que as informações geradas pelos resultados desse trabalho serão divulgadas apenas com finalidade científica e de ensino, como na redação de artigos e confecção de aulas, preservando-se, totalmente, o anonimato dos pacientes. Assim dou aos autores deste projeto de pesquisa, plenos direitos de uso, para fins de ensino e divulgação, respeitando os respectivos códigos de ética.

Contato em caso de dúvidas: Faculdade de Odontologia, rua Gonçalves Chaves, 457 CEP: 96015-560 - Pelotas - RS
Fones: (53) 32256741/ (53) 32224162/ (53) 32226690/ (53) 32224439/ (53) 32224305.

Pelotas, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do paciente

Documento: _____

N.º _____

Anexo B. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

PELOTAS, 15 de julho de 2013

PARECER Nº 38 /2013

O projeto de pesquisa intitulado **“Isolamento e caracterização de células-tronco de tecido pulpar dental”**, está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, PARECER APROVADO.

Prof. Dr. Renato Fabrício de Andrade Waldemarin

Coordenador do CEP- FOP/UFPEL