



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

CECÍLIA BUZATTO WESTIN

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS
TERMOSENSÍVEIS CONTENDO AGENTES BIOATIVOS PARA
ENGENHARIA DE TECIDO CARTILAGINOSO**

*DEVELOPMENT OF POLYMERIC THERMOSENSITIVE HYDROGELS CONTAINING
BIOACTIVE AGENTS FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING*

CAMPINAS

2020

CECÍLIA BUZATTO WESTIN

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS
TERMOSENSÍVEIS CONTENDO AGENTES BIOATIVOS PARA
ENGENHARIA DE TECIDO CARTILAGINOSO**

*Tese de doutorado apresentada à Faculdade
de Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Engenharia Química.*

Orientadora: Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel J. Kelly

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CECÍLIA
BUZATTO WESTIN E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ÂNGELA MARIA MORAES

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Westin, Cecília Buzatto, 1987-
W527d Desenvolvimento de hidrogéis poliméricos termossensíveis contendo agentes bioativos para engenharia de tecido cartilaginoso / Cecília Buzatto Westin. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Coorientador: Daniel John Kelly.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Hidrogel. 2. Compostos bioativos. 3. Liberação controlada de fármacos. 4. Cartilagem articular. 5. Polímeros. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Kelly, Daniel John. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of polymeric hydrogels containing bioactive agents for cartilage tissue engineering **Palavras-chave em inglês:**

Hydrogel

Bioactive compounds

Drug controlled release

Articular cartilage

Polymer

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Daniele Ribeiro de Araujo

Ana Rita Morales

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Mariana Agostini de Moraes

Data de defesa: 27-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8713-8760>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2940159880441731>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Defesa de Tese de Doutorado defendida por Cecília Buzatto Westin aprovada em 27 de fevereiro de 2020, pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

Profa. Dra. Ângela Maria Mores – Presidente e Orientadora

FEQ/UNICAMP

Profa. Dra. Ana Rita Morales

FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

IB / UNICAMP

Dra. Mariana Agostini de Moraes

Universidade Federal de São Paulo

Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

Universidade Federal do ABC

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, especialmente aos meus pais, Fred e Márcia, por sempre acreditarem no meu potencial e apoiarem minhas decisões.

Aos meus queridos irmãos e cunhadas, Daniel, Diego e Marianas pelas orientações de vida que indiretamente me concedem e pelas infinitas companhias de finais de semana.

Ao Caio Henrique Bos Loureiro, pelo apoio, compreensão e amor demonstrados.

À família Buzatto, Westin e Bos pelo carinho, pela torcida e exemplos de humildade, honestidade e união. Meu carinho especial à minha vovó Edna, guerreira.

À professora Dra. Ângela Maria Moraes, pelos anos compartilhados de muito trabalho, pelos esclarecimentos, pela dedicação a nossa carreira internacional e, principalmente, pela orientação dedicada e esclarecedora.

Aos meus prezados amigos de laboratório, Re, Fer, Luizinha, Dani, Monize, Mari, Ana e Paulinha pela amizade, auxílio, cafezinhos e boa prosa proporcionados.

Ao pessoal da R-Crio, especialmente ao Rafa Maza, pela atenção e disponibilidade sempre que requisitada.

Ao LABMOCA, sobretudo às minhas queridas amigas Carol e Ingrid, que sempre me estendem a mão na necessidade.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

Às professoras Dra. Ana Rita Morales e Dra. Glaucia Tech dos Santos, pela participação nas minhas duas qualificações de doutorado.

À equipe do LRAC, principalmente ao Hugo Teixeira, Lucélia Silva e Celso Camargo, pelos ensaios realizados e esclarecimentos prestados.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia Química que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao *Trinity College Dublin*, principalmente ao professor Dr. Daniel J. Kelly, meu coorientador,

Aos amigos “Irlandeses”, que me trouxeram luz neste país cinzento, Elaine, Tarantino, Youry, Jaque, Paulinho, Aglécia, Shani, Promita e Inês.

À UNICAMP e ao Programa de Pós-Graduação da FEQ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A osteoartrite é a mais frequente das doenças designadas como reumatismos, e lidera as causas de invalidez crônica. Atualmente, diversas estratégias baseadas na engenharia de tecidos estão em desenvolvimento com vistas ao tratamento desta enfermidade, explorando a incorporação de células e/ou fármacos específicos em suportes que, em conjunto, seriam capazes de restabelecer gradualmente o tecido à condição livre de lesão. Neste trabalho, buscou-se a obtenção de hidrogéis responsivos a estímulos térmicos projetados especificamente para a engenharia do tecido cartilaginoso. Os hidrogéis foram produzidos combinando-se polissacarídeos biocompatíveis e biodegradáveis e a eles foram incorporados os fármacos ácido gálico, dexametasona e diclofenaco de sódio, e nas formulações mais promissoras, células-tronco mesenquimais. A produção dos hidrogéis foi realizada pela mistura física de 5 a 10% (m/v) de metilcelulose (M), de 0,5 a 2% (m/v) de goma xantana (X), de 0,5 a 2% (m/v) de carboximetil quitosana (Q) e de 5 a 10% (v/v) de glicerol, incorporando-se nas matrizes os fármacos por adição direta em concentrações determinadas por análises prévias de citotoxicidade às células mesenquimais. Após a incorporação dos fármacos nos hidrogéis, foram selecionadas as formulações com perfis de liberação considerados mais adequados para a finalidade pretendida. Posteriormente à esterilização dos hidrogéis por calor úmido, verificou-se que a coloração dos hidrogéis foi alterada, porém o comportamento de gelificação foi mantido em temperaturas apropriadas. A capacidade de absorção de fluidos e a estabilidade do material quanto à perda de massa mostraram-se compatíveis com o esperado deste tipo de matriz, indicando que o cultivo de células pode ser favorável nas formulações propostas. As propriedades mecânicas indicaram que, provavelmente, o ácido gálico reticula os hidrogéis, resultando em módulos de compressão maiores, tornando os hidrogéis mais resistentes. Os hidrogéis escolhidos para o estudo não apresentam citotoxicidade indireta e direta por um curto período de tempo quando expostos às células-tronco. Após o cultivo dessas células em meios condrogênicos, verificou-se que as mesmas são capazes de se diferenciar em condrócitos e se deslocar no interior da estrutura do hidrogel, liberando no meio de cultivo uma fração significativa das células incorporadas, fato este considerado positivo no que diz respeito ao potencial de migração das células inoculadas para as imediações da região lesada.

Palavras-chave: hidrogel termorreversível; carboximetil quitosana; metilcelulose; goma xantana; engenharia de tecidos; células-tronco; cartilagem; liberação controlada de fármacos.

ABSTRACT

Osteoarthritis is the most common of the diseases designated as rheumatism and leads the causes of chronic disability. Currently, many strategies based on tissue engineering are under development, with the purpose of treating this disease, exploring the incorporation of specific cells and/or drugs into supports that would be able to gradually restore the tissue to the injury-free condition. In this work, the goal was to produce hydrogels responsive to thermal stimuli designed specifically for the engineering of cartilaginous tissue, combining biocompatible and biodegradable polysaccharides to the drugs gallic acid, dexamethasone, and diclofenac sodium and, in the most promising formulation, mesenchymal stem cells. The production of the hydrogels was performed by the physical mixture of 5 to 10% (w/v) methylcellulose (M), 0.5 to 2% (w/v) xanthan gum (X), 0.5 to 2 % (w/v) carboxymethyl chitosan (Q) and from 5 to 10% (v/v) glycerol, and the drugs were incorporated in the matrices by direct addition at concentrations previously determined by prior cytotoxicity analyzes. After the incorporation of the drugs directly into the hydrogels, the formulations with release profiles considered most suitable for the intended purpose were selected. After wet heat sterilization of the hydrogels, it was found that the color of the hydrogels was altered, but the gelation behavior was maintained at appropriate temperatures. The fluid absorption capacity, as well as the mass loss, presented values appropriate for the type of material aimed, indicating that cell culture would be favorable in the proposed formulations. Mechanical properties indicated that gallic acid is likely to crosslink hydrogels, resulting in larger compression modules, making the hydrogels more resistant. Regarding biological studies, it was first found that the hydrogels chosen for the study do not have indirect and direct cytotoxicity for a short time when exposed to stem cells. After cultivating these cells in chondrogenic media, it was found that they are able to differentiate into chondrocytes. However, a significant fraction of cells were released into the culture medium, which is positive regarding the migration of inoculated cells to the surroundings of the injured region.

Keywords: thermosensitive hydrogel; carboxymethyl chitosan; methylcellulose; xanthan gum; tissue engineering; stem cells; cartilage; controlled release of drugs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: capacidade de absorção

ACN: acetonitrila

AG: ácido gálico

AGEs: moléculas que induzem a osteoartrite

BMSC: células-tronco da medula óssea (*bone marrow stem cells*)

CAM: calcéina acetoximetil

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CBF- β : fator de ligação central beta (*core binding factor beta*)

CDM-: meio quimicamente definido negativo

COX: ciclooxigenase

cP: cento Poise

DEX: dexametasona

DFSC: células-tronco do folículo dental (*dental follicle progenitor cells*)

DMEM/GlutaMAX: meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMMB: azul de 1,9-dimetilmetileno

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPSC: células-tronco da polpa de dentes decíduos (*dental pulp stem cells*)

DS: grau de substituição

DSC: calorimetria diferencial de varredura

dsDNA: ácido desoxirribonucleico dupla fita

ECM: matriz extracelular

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ETHD-1: homodímero de etídio-1

F: fármacos

FDA: agência de controle de alimentos e medicamentos dos EUA (*food and drug administration*)

FT-IR: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GAG: glicosaminoglicanos
GS: grau de substituição
H&E: hematoxilina e eosina
Hac: ácido acético
HEC: hidroxietil celulose
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
Hz: hertz
IL-1 β : interleucina 1 β
ITS: insulina, transferrina e selênio
kDA: kilo dalton
LCST: temperatura de solubilidade crítica baixa
LECB: laboratório de engenharia de coloides e biorreações
LRAC: laboratório de recursos analíticos e
m/v: massa/volume
M: metilcelulose
MEV: microscopia eletrônica de varredura
MIN: minuto
M_{inicial}: massa inicial
M_s: massa da amostra seca
MSC: *mesenchymal stem cells*
MTT: brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio
M_{úmida}: massa da amostra úmida
N: Newton
NHS: N-hidroxissuccinimida
NSAIDs: anti-inflamatórios não esteroides
OA: osteoartrite
OCT: temperatura ótima para corte (*optimal cutting temperature*)
OMS: organização mundial da saúde
PBE: tampão de papaína para extração (*papain buffer extract*)
PBS: tampão fosfato salino
PDLSC: Células-tronco do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells*)
pK_a: logaritmo negativo da constante de acidez *K_a*
P_m: perda de massa

Q: carboximetil quitosana

RPM: rotações por minuto

RNA: ácido ribonucleico

Scaffolds: matriz para suporte celular

SCAP: células-tronco da papila apical (*stem cells from apical papilla*)

SFB: soro fetal bovino

SHED: células-tronco da esfoliação dos dentes decíduos humanos (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)

TCD: *Trinity College Dublin*

TGF- β : *transforming growth factor beta*

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UV-VIS: ultra-violeta visível

v/v: volume/volume

X: goma xantana

α -MEM: meio essencial mínimo de Eagle (*minimum essential medium Eagle*)

β -GP: β -glicerofosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Arquitetura do tecido cartilaginoso em relação à distribuição de células, colágeno e agreganos.	24
Figura 2 – Articulação saudável e com osteoartrite e componentes principais.....	26
Figura 3- Estrutura química da kartogenina.	30
Figura 4 – Figura esquemática do mecanismo de ação de diferenciação condrogênica da kartogenina em uma célula animal.	31
Figura 5 - Representação esquemática das diversas variáveis que podem afetar as propriedades de um hidrogel.....	34
Figura 6 - Estrutura química da metilcelulose.....	36
Figura 7 – Estrutura química da goma xantana.	39
Figura 8 – Estrutura química da quitina (A), quitosana (B), N-carboximetil quitosana (C) e O-carboximetil quitosana (D).	41
Figura 9 - Estrutura química do diclofenaco de sódio.....	43
Figura 10 - Estrutura química da dexametasona.	46
Figura 11 – Representação esquemática das interações entre o colágeno e polifenóis, como o ácido gálico.....	48
Figura 12 – Fluxograma do desenvolvimento e critérios de seleção das formulações.....	55
Figura 13 – Curvas típicas de G' e G'' . A temperatura de gelificação da solução polimérica corresponde ao ponto onde as curvas se cruzam.	57
Figura 14 – Esquema do texturômetro com dispositivo de compressão imerso em líquido. ...	62
Figura 15 – Perfil gráfico típico obtido na análise do módulo de equilíbrio (a) e na determinação do módulo dinâmico (b).	63
Figura 16 - Molde produzido em impressora 3D (a) e molde negativo de agarose para inserção de hidrogel nos orifícios (b).	70
Figura 17 - Imagens fotográficas dos hidrogéis a temperaturas de 4 °C e 37 °C.	73
Figura 18 - Variações de G' e G'' em relação a variação da temperatura da amostra composta por 10% (m/v) de metilcelulose, 2% (m/v) de goma xantana e 10% (v/v) de glicerol, medida a uma taxa de aquecimento de 1 °C/min, tensão de 5Pa e frequência de 10 rad/s.....	74
Figura 19 - Módulos G' e G'' versus temperatura das amostras com 10% (v/v) de glicerol M10X0,5Q0,5-G10 (a), M8X0,5Q0,5-G10 (b), M5X0,5Q0,5-G10 (c) e M5X0,5Q0,5-G10 em maior aumento (d).	76

Figura 20 - Módulos G' e G'' versus temperatura das amostras com 5% (v/v) de glicerol M10X0,5Q0,5-G5 (a), M8X0,5Q0,5-G5 (b), M8Q2 (c), M8Q1 (d), M10Q2 (e), M10Q1 (f), M10X2-G5 (g) e M10X1-G5 (h).....	78
Figura 21 - Módulos G' e G'' versus temperatura (à esquerda) e viscosidade (à direita) versus temperatura dos hidrogéis M10X1-G5 (a), M10X0,5Q0,5-G5 (b) e M10Q1 (c).....	81
Figura 22 – Viabilidade de células-tronco da polpa do dente de leite quando em contato com diferentes concentrações de ácido gálico (a), diclofenaco de sódio (b) e dexametasona (c). ..	83
Figura 23 – Aspecto macroscópico dos hidrogéis estéreis produzidos na ausência (a) e na presença (b) dos fármacos em temperaturas de 4 °C e 37 °C.	85
Figura 24 - Imagens dos hidrogéis M10Q1, M10X1-G5 e M10X0,5Q0,5-G5 somente com o fármaco ácido gálico adicionado diretamente na mistura polimérica na concentração de 100 µg/mL.	85
Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis M10X1-G5 sem e com fármacos (a e b), M10X0,5Q0,5-G5 sem e com fármacos (c e d) e M10Q1 sem e com fármacos (e e f).	86
Figura 26 - Espectros de FTIR dos polímeros metilcelulose, quitosana e xantana e dos hidrogéis M10X0,5Q0,5-G5, M10X1-G5 e M10Q1.....	89
Figura 27 - Espectros de FTIR das amostras de carboximetil quitosana com ácido gálico (Q+AG), de carboximetil quitosana isolada (CM quitosana) e de ácido gálico isolado.	90
Figura 28 – Cinética de liberação de dexametasona e diclofenaco de sódio dos hidrogéis M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 expressa em termos da variação da concentração dos fármacos no fluido receptor PBS a cada momento para dexametasona (a) e diclofenaco de sódio (b) e em termos da fração cumulativa liberada para dexametasona (c) e diclofenaco de sódio (d).	98
Figura 29 – Curvas $\ln (M_t/M_\infty)$ versus $\ln (t)$ para as três formulações de hidrogéis para obtenção dos parâmetros do modelo matemático de Kormeyer-Peppas para a dexametasona (a) e para o diclofenaco de sódio (b).	99
Figura 30 - Análise de atividade mitocondrial com o indicador MTT das células cultivadas com os extratos obtidos ao longo de 24 ou 48 h dos hidrogéis M10X1-G5, M10Q1 e M10X0,5Q0,5-G5 contendo ou não os três fármacos. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).	102

Figura 31 – Microscopia confocal realizada com os reagentes LIVE/DEAD após cultivo das DPSCs nos hidrogéis M10X0,5Q,5-G5 + F (a), M10X1-G5 + F (b) e M10Q1+F (c) por 7 dias. Foi utilizada a objetiva de 40x para a captura das imagens.....	104
Figura 32 – Quantificação de DNA pelo ensaio PicoGreen das DPSC cultivadas no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 + F nos tempos 0, 14, 21 e 28 dias. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).	107
Figura 33 – Imagens obtidas durante o cultivo das DPSCs no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 por 10 dias em conjunto com agarose. O risco central refere-se ao corte da agarose realizado com lâmina para retirada de parte deste polímero. As setas mostram partes de hidrogel com células que se soltaram durante o cultivo.	110
Figura 34 – Quantificação de GAG pelo ensaio de DMMB das DPSC cultivadas no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 + F nos tempos 0, 14, 21 e 28 dias. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).	111
Figura 35 – Análises citoquímicas dos hidrogéis cultivados por 28 dias em meio condrogênico suplementado com TGF- β ou com Kartogenina, corados com azul de Alcian e H&E.....	113
Figura 36 – Punch de 8 mm, poço de agarose e cobertura de agarose.	115
Figura 37 – Imagens do hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 inoculado com células-tronco porcinas cultivadas em meios de cultura contendo diferentes promotores de diferenciação, obtidas através de microscópio de fluorescência no ensaio LIVE/DEAD nos tempos de cultivo de 1, 7 e 21 dias.....	116
Figura 38 – Quantificação das células metabolicamente ativas cultivadas nos diferentes meios e nos tempos de cultivo de 1, 7 e 21 dias. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).	117
Figura 39 – Controle de diferenciação utilizando esferóides de célula-tronco porcinas com os quatro diferentes meios de cultivo.....	118
Figura 40 – Gráficos obtidos após teste mecânico de compressão dinâmico para os hidrogéis sem e com fármacos.	123
Figura 41 – Gráficos obtidos após teste mecânico de compressão em equilíbrio para os hidrogéis sem e com fármacos.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição da cartilagem articular em termos de porcentagem em relação à massa do material (adaptado de ZHANG; HU; KYRIACOS, 2009).....	23
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do diclofenaco de sódio (Fonte: Rainsford et al., 2008).	44
Tabela 3 – Características físico-químicas do ácido gálico (FERNANDES, FELIPE HUGO ALENCAR; SALGADO, 2016).....	47
Tabela 4 – Características relevantes de cada constituinte das formulações propostas no âmbito da engenharia do tecido cartilaginoso.	51
Tabela 5 – Descrição das formulações dos hidrogéis desenvolvidos.....	54
Tabela 6 – Concentrações dos fármacos testadas no ensaio de citotoxicidade para a determinação dos níveis não citotóxicos.	58
Tabela 7 – Dados da metodologia de HPLC aplicada para a quantificação de diclofenaco de sódio e dexametasona por detecção.....	59
Tabela 8 – Comparação das temperaturas de gelificação das formulações com 10%, 5% e sem glicerol medidas por reometria.	77
Tabela 9 – Tamanho médio dos poros das formulações M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 na ausência e presença dos três fármacos.	87
Tabela 10 – Módulo de equilíbrio a 10% de deformação compressiva e módulo dinâmico em frequência de 1 Hz e amplitude de 1% de deformação para os hidrogéis.	92
Tabela 11 – Capacidade de absorção dos hidrogéis M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 em PBS, meio de cultivo e água após 24 h a 37 °C.....	94
Tabela 12 – Perda de massa dos hidrogéis M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 em água, PBS e meio de cultivo após 7 dias a 37 °C.....	96
Tabela 13 - Parâmetros e coeficiente de determinação calculados segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas para a cinética de liberação de dexametasona e diclofenaco de sódio dos diferentes hidrogéis.....	100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 A cartilagem articular e a osteoartrite.....	23
2.2 Engenharia de tecidos.....	26
2.3 Hidrogéis.....	33
2.4 Metilcelulose.....	35
2.5 Goma Xantana.....	38
2.6 Carboximetil quitosana.....	40
2.7 Fármacos.....	42
2.8 Considerações Finais.....	50
3. OBJETIVOS.....	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 Materiais.....	53
4.2 Métodos.....	53
4.2.1 Preparação dos hidrogéis termosensíveis de metilcelulose, xantana e carboximetil quitosana.....	53
4.2.2 Esterilização das formulações de hidrogel selecionadas.....	56
4.2.3 Análise da gelificação dos hidrogéis por inversão de tubo.....	56
4.2.4 Estudo reológico.....	56
4.2.5 Teste de citotoxicidade direta de diferentes concentrações dos fármacos ácido gálico, dexametasona e diclofenaco de sódio.....	57
4.2.6 Produção dos hidrogéis contendo fármacos e análise da cinética de liberação.....	58
4.2.7 Aspecto e morfologia da superfície dos hidrogéis.....	60
4.2.8 Capacidade de absorção e perda de massa dos hidrogéis.....	60
4.2.9 Propriedades mecânicas dos hidrogéis.....	61
4.2.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	63
4.2.11 Citotoxicidade indireta dos hidrogéis.....	63
4.2.12 Citotoxicidade direta dos hidrogéis.....	64
4.2.13 Cultivo de células-tronco humanas de polpa dentária no hidrogel.....	65

4.2.14	Análises quantitativas de diferenciação celular	66
4.2.14.1	Digestão dos hidrogéis com papaína.....	66
4.2.14.2	Quantificação de DNA por fluorescência	66
4.2.15	Quantificação de glicosaminoglicanos	67
4.2.16	Análises citoquímicas dos hidrogéis cultivados com células-tronco mesenquimais e controles	67
4.2.16.1	Hematoxilina e Eosina (H&E)	68
4.2.16.2	Azul de Alcian	68
4.2.17	Migração das células DPSCs no hidrogel	69
4.2.18	Cultivo celular nos hidrogéis em moldes de agarose	69
4.2.19	Análise estatística dos dados	71
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	Preparação dos hidrogéis termosensíveis de metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana e gelificação por inversão de tubo	72
5.2	Análise do Comportamento Reológico.....	75
5.3	Esterilização das formulações de hidrogel selecionadas	78
5.4	Análise do efeito de diferentes concentrações de ácido gálico, dexametasona e diclofenaco de sódio na viabilidade celular direta	80
5.5	Aspecto e morfologia dos hidrogéis	84
5.6	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	88
5.7	Caracterização mecânica dos hidrogéis	91
5.8	Capacidade de absorção e perda de massa	94
5.9	Liberação controlada dos fármacos	97
5.10	Teste de viabilidade celular indireto (MTT).....	101
5.11	Ensaio de viabilidade celular direto por microscopia confocal	102
5.12	Análises quantitativas de diferenciação celular dos hidrogéis cultivados diretamente em placa de 96 poços.....	105
5.12.1	Digestão dos hidrogéis com papaína.....	107
5.12.2	Quantificação de DNA por fluorescência	107
5.12.3	Migração das células DPSCs no hidrogel	108

5.12.4	Quantificação de glicosaminoglicanos	111
5.13	Análises citoquímicas dos hidrogéis cultivados com células-tronco mesenquimais dentárias.....	112
5.14	Cultivo das células-tronco da medula óssea porcina no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 confinado em molde de agarose	114
6.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	120
6.1	Conclusões.....	120
6.2	Sugestões para trabalhos futuros	121
7.	APÊNDICE I.....	123
8.	REFERÊNCIAS	125

1. INTRODUÇÃO

As patologias reumáticas ou musculoesqueléticas compreendem mais de 150 doenças e síndromes, as quais geralmente são progressivas e associadas à dor. Essas afecções são as principais causas de morbidade e incapacidade, gerando enormes dispêndios no setor da saúde e em sistemas de assistência social (HUANG, BRIAN J.; HU; ATHANASIOU, 2016). Dentre estas enfermidades, a osteoartrite (OA) é a mais comum entre adultos, caracterizada pelo desgaste da cartilagem articular, que se torna frágil e fragmentada, devido à dissociação de processos degenerativos e de reparação. Com a progressão da doença, pode ocorrer perda total da cartilagem articular, deixando a superfície óssea desprotegida e sujeita à fricção direta dos ossos, o que leva à dor, inchaço e rigidez (DAS; FAROOQI, 2008; MAMIDI *et al.*, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 28% da população mundial com mais de 60 anos sofre de osteoartrite e, desta fração, 80% tem dificuldade de mobilidade (MAHIR *et al.*, 2016). Estima-se que o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população tornará a osteoartrite a quarta causa mais comum de invalidez até 2020 e que, em 2050, 130 milhões de pessoas desenvolverão esta enfermidade (HEALEY *et al.*, 2016; MAHIR *et al.*, 2016). Os tratamentos disponíveis atualmente para a OA são procedimentos cirúrgicos direcionados à tentativa de reparo da cartilagem danificada. Todavia, essa reparação geralmente não é eficaz, o que tem levado à necessidade de desenvolvimento de biomateriais capazes de substituir o tecido lesado ou de estimular sua restauração, sendo esta técnica definida como engenharia de tecidos (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011). Os princípios da engenharia de tecidos podem ser aplicados terapêuticamente através da inoculação de células, fatores de crescimento e/ou fármacos em uma matriz artificial que, quando transplantados como um conjunto para a região lesada, restauram as funções do tecido (MOYER *et al.*, 2014).

Um dos tipos celulares utilizados na medicina regenerativa é a célula-tronco mesenquimal (MSC), devido ao seu efeito de pluri ou multipotência (LV *et al.*, 2014; MANUGUERRA-GAGNE *et al.*, 2013). As células derivadas da medula-óssea (BMSCs) foram as primeiras células-tronco mesenquimais descobertas, sendo as mais comumente utilizadas. Outras fontes de células semelhantes à BMSC foram identificadas posteriormente, como as de tecido adiposo, placenta, polpa dentária, membrana sinovial, sangue periférico, ligamento periodontal, endométrio, cordão umbilical e sangue do cordão umbilical (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2018; HUANG, YEN HUA *et al.*, 2010; LV *et al.*, 2014). Dentre estas células, as dentárias oferecem uma gama de vantagens, como alta plasticidade, criopreservação eficaz por longos períodos sem perda da capacidade de diferenciação, adequada

interação com fatores de crescimento e suportes, além de serem de fácil obtenção (SUNIL *et al.*, 2012). Estas células-tronco da polpa dentária (DPSC) apresentam capacidade de formar adipócitos, osteoblastos, odontoblastos, condrócitos, células ectodérmicas neurais e mioblastos (HOLLANDS; ABOYEJI; ORCHARTON, 2018).

A diferenciação das células-tronco em condrócitos pode ocorrer quando essas células entram em contato com fatores de crescimento, como é o caso da kartogenina e do fator de transformação do crescimento tipo- β (TGF- β) (KANG *et al.*, 2014; ZHANG, JIANYING; WANG, 2014). A kartogenina, descoberta em 2012, estimula a produção de colágeno tipo II, agreganos e inibidores de metaloproteinases pelas células, auxiliando a restauração do tecido cartilaginoso (KANG *et al.*, 2014). Já a superfamília dos TGFs desempenha papéis críticos na regulação *in vivo* da diferenciação de condrócitos desde estágios iniciais até estágios finais, incluindo condensação, proliferação, diferenciação terminal e manutenção de condrócitos articulares (WANG, WEIGUANG; RIGUEUR; LYONS, 2014).

Para que a restauração do tecido seja eficiente, é crucial a escolha apropriada do biomaterial para que haja adequada adesão, proliferação e diferenciação das células inoculadas, assim como a liberação sustentada de agentes bioativos, como fármacos, nele incorporados (NADERI-MESHKIN *et al.*, 2014). Dentre os diversos biomateriais existentes na atualidade, os hidrogéis têm se tornado cada vez mais atraentes na engenharia de tecidos cartilagosos (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011). Estes tipos de suportes, mais conhecidos como *scaffolds*, promovem a incorporação dos condrócitos de forma semelhante à verificada na matriz extra celular da cartilagem, mantêm o fenótipo destas células (o que geralmente não ocorre em cultura realizada em monocamada) e sua natureza viscoelástica permite a transferência eficaz de esforços mecânicos para os condrócitos, que dependem destes estímulos para realizar suas funções (CUSHING; ANSETH, 2007; LEE, WONJAE; PARK, 2016).

Os hidrogéis podem ser constituídos por diversos tipos de polímeros, sendo os polímeros naturais fontes atraentes devido às suas semelhanças bioquímicas com os componentes da matriz da cartilagem e ao fato de poderem ser degradados por enzimas secretadas pelos condrócitos (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011). Alguns polímeros que apresentam potencial uso na engenharia de tecido cartilaginoso são a celulose, a goma xantana e a quitosana.

A celulose é um dos polímeros mais abundantes no mundo (CHANG; ZHANG, 2011; SHEN *et al.*, 2016). Todavia, este biopolímero não é hidrossolúvel, o que leva a limitações em seu processamento e aplicação, de forma que seus derivados das categorias dos ésteres (como o acetato de celulose) e éteres (como a metilcelulose), por serem mais solúveis, são mais utilizados (NASATTO *et al.*, 2015). A metilcelulose (M) possui algumas vantagens frente aos

demais derivados, tendo ação como espessante e estabilizante de soluções, além de poder ser utilizada na encapsulação de fármacos (CHANG *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2012). O comportamento térmico desse polímero é singular, visto que a viscosidade de sua solução em água se mantém praticamente constante quando a temperatura varia até um dado ponto crítico (29 ± 2 °C). Quando a temperatura ultrapassa esse limite, a viscosidade aumenta rapidamente, resultando na formação de um gel termorreversível (NASATTO *et al.*, 2015). Devido a esta propriedade, hidrogéis produzidos com metilcelulose podem ser aplicados de forma injetável no corpo, como por artroscopia, de forma pouco invasiva.

A goma xantana (X) também possui propriedades relevantes em relação à sua reologia. Em baixas concentrações (como 1% (m/v)) este polissacarídeo apresenta alta viscosidade, o que auxilia na proteção das articulações em modelos animais com osteoartrite induzida (HAN; SHAO; *et al.*, 2012; HAN; WANG; *et al.*, 2012; SHAO *et al.*, 2013). Além disso, a goma xantana é estável à temperatura ambiente, pseudoplástica, estabilizadora de emulsões e o *Food and drug administration* (FDA, EUA) permite sua utilização em quantidades ilimitadas (SHAO *et al.*, 2013). Para a apropriada hidratação da goma xantana, pode-se realizar a dispersão da goma em não-solventes, por exemplo, álcoois, glicerol ou óleos como de soja e milho (SWORN, 2009). O glicerol, reagente amplamente utilizado para a dissolução de drogas na indústria farmacêutica, pode ainda melhorar as características mecânicas do hidrogel e apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade (TAN; AZIZ; AROUA, 2013).

A quitina é um polissacarídeo naturalmente encontrado na carapaça de crustáceos e apresenta características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade (DUTTA, 2016; RINAUDO, 2006), o que a torna uma boa candidata para a engenharia de tecidos. Além destas características promissoras, a quitina possui estrutura similar aos glicosaminoglicanos encontrados na cartilagem, mimetizando de maneira adequada este tecido (PARK, HYEJIN *et al.*, 2013). Assim como a celulose, é um dos polímeros mais abundantes na Terra e também insolúvel em água, o que limita sua utilização nas aplicações biomédicas (DUTTA, 2016). A desacetilação alcalina da quitina torna a molécula solúvel em soluções ácidas diluídas. Moléculas de quitina com 50% ou mais de seus grupos desacetilados passam a ser denominadas de quitosana. Todavia, a baixa solubilidade da quitosana em pH neutro e alcalino ainda é uma limitação de sua utilização, a qual pode ser contornada pela carboximetilação da molécula (NARAYANAN; JAYAKUMAR; CHENNAZHI, 2014; RINAUDO, 2006). Este derivado da quitosana tem sido amplamente estudado devido à facilidade de síntese, ao caráter anfífilico e às suas amplas possibilidades de

aplicação (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

Para aumentar a eficácia dos hidrogéis na terapia de lesões cartilaginosas pode-se ainda agregar fármacos à formulação. Neste contexto, o ácido gálico, a dexametasona e o diclofenaco de sódio mostram-se bastante atrativos. O ácido gálico é capaz de inibir a expressão de genes pró-inflamatórios causadores da osteoartrite, exercendo, portanto, ação protetora neste tecido (LIN *et al.*, 2016; NATARAJAN; MADHAN; TIKU, 2015; YOON *et al.*, 2013). Além disso, também pode interagir com o colágeno da cartilagem por associações hidrofóbicas e por ligações de hidrogênio, reticulando e estabilizando essas matrizes, o que diminui a taxa de degradação enzimática do colágeno pelas metaloproteinases (MADHAN; MURALIDHARAN; JAYAKUMAR, 2002; NATARAJAN; MADHAN; TIKU, 2015). A dexametasona apresenta alta afinidade pelos receptores de glicocorticoides intracelulares, melhorando a transcrição de citocinas anti-inflamatórias e reprimindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (HUEBNER; SHRIVE; FRANK, 2014). Possui também efeito de potencializar a diferenciação de condrócitos e a síntese de proteoglicanos, além de reduzir a perda de glicosaminoglicanos em cartilagens lesionadas em ensaios *in vitro* (LU; EVANS; GRODZINSKY, 2011). Por fim, o diclofenaco, um anti-inflamatório não esteroide, atua diretamente na inibição de enzimas pró-inflamatórias, diminuindo a dor e a inflamação no local lesionado (DA COSTA, BRUNO R. *et al.*, 2016).

Frente ao exposto, propôs-se primeiramente analisar a produção de hidrogéis com formulação termossensível pela mistura dos polímeros metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana. Em seguida, os fármacos foram adicionados em conjunto diretamente ao hidrogel. Após a introdução de células-tronco mesenquimais de origem dentária nos hidrogéis, de linhagem já estabelecida, as matrizes foram reticuladas termicamente e os fatores de crescimento foram adicionados ao sistema visando à diferenciação das células em condrócitos. Com a diferenciação das células, esperava-se que ocorresse maior produção de tecido cartilaginoso, o que também auxiliaria o tratamento da osteoartrite. Os materiais produzidos foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas e ao desempenho das células-tronco mesenquimais neles inoculadas, de forma a se verificar quais formulações apresentaram maior capacidade de atender aos requisitos de projeto do biomaterial. Devido à característica termorresponsiva, este biomaterial poderia ser administrado de forma intra-articular através de injeção na cavidade por artroscopia, caracterizando uma abordagem minimamente invasiva, o que lhe confere grande potencial de uso clínico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cartilagem articular e a osteoartrite

As superfícies das articulações sinoviais são recobertas com um tipo especializado de cartilagem, chamada de hialina ou mesmo de cartilagem articular (WALTER; OSSENDORFF; SCHILDBERG, 2019). A cartilagem hialina é um tecido caracterizado pela ausência de sistema vascular linfático e terminações nervosas, composto por uma pequena quantidade de condrócitos distribuídos em uma densa matriz extracelular (ECM) produzida por essas células. Articulações sinoviais são o tipo mais comum de articulação do corpo e são subdivididas com base nas formas das superfícies articulares dos ossos que formam cada articulação.

Os diferentes tipos de articulações sinoviais são: articulação esférica (articulação do ombro), articulação articulada (joelho), articulação pivotante (articulação atlantoaxial, entre as vértebras C1 e C2 do pescoço), articulação condiloide (articulação radiocarpal do punho), articulação em sela (entre o osso carpal do trapézio e o primeiro metacarpo, na base do polegar) e articulação plana (articulações facetarias da coluna vertebral, entre os processos articulares superiores e inferiores) (OPENSTAX, 2013). Na Tabela 1 são apresentados dados aproximados de composição típica da cartilagem.

Tabela 1- Composição da cartilagem articular em termos de porcentagem em relação à massa do material (adaptado de ZHANG; HU; KYRIACOS, 2009).

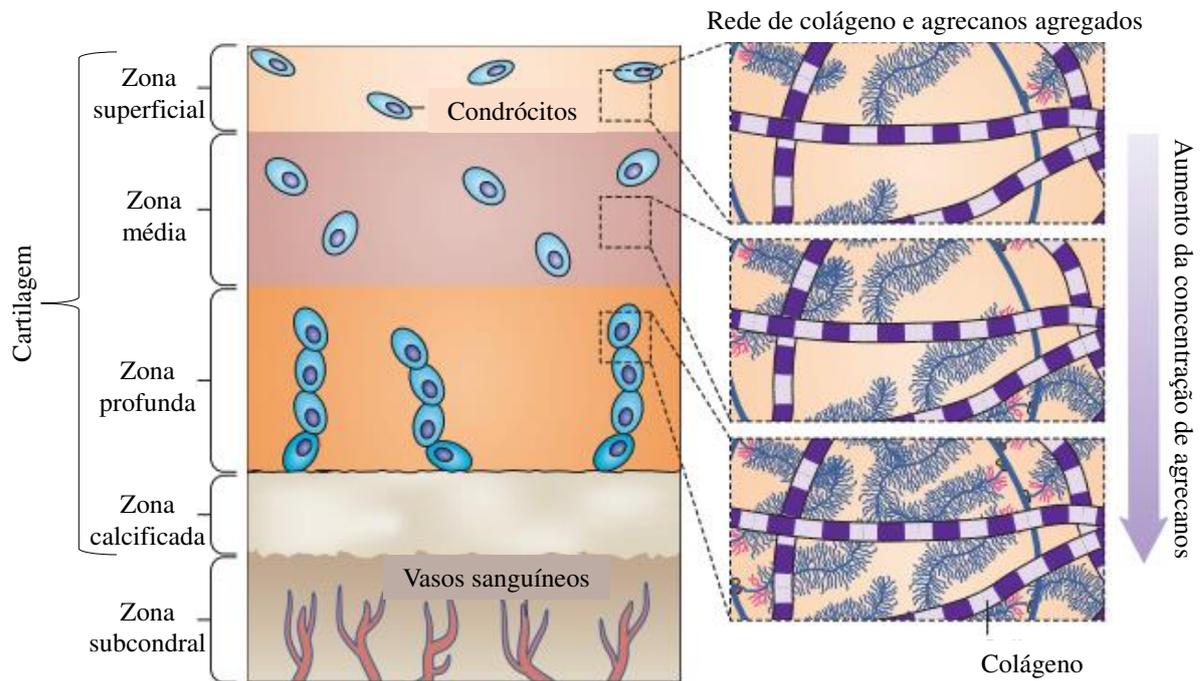
Composição	Fração mássica (%)
Condrócitos	1-5
Água	65-80
Zona superficial	65
Zona profunda	80
Colágeno	10-20
Tipo II	9-19
Tipos IV, IX, X, XI	1
Proteoglicanos	10-20

A ECM é constituída principalmente de colágeno do tipo II, proteoglicanos e água, que dão ao tecido características mecânicas apropriadas, como resistência à compressão e ao desgaste em circunstâncias normais (BAJPAYEE; GRODZINSKY, 2017; KUMAR, DILEEP

et al., 2018; MAUCK; BURDICK, 2011). O pH ideal da matriz é 7,4, sendo que mudanças nesta propriedade podem facilmente causar o rompimento da estrutura cartilaginosa. Na Figura 1 pode-se observar a arquitetura do tecido cartilaginoso.

A matriz extracelular tem variadas funções, dentre elas: proteger os condrócitos das compressões às quais são expostas as articulações; armazenar citocinas e fatores de crescimento necessários para a manutenção dos condrócitos; controlar o tipo, a concentração e a taxa de difusão dos nutrientes para os condrócitos e atuar como transdutora de sinais para essas células (BHOSALE; RICHARDSON, 2008; KUMAR, DILEEP *et al.*, 2018). A elevada quantidade de água presente na cartilagem permite que ocorram deformações praticamente elásticas neste tecido, além de facilitar a nutrição das células e fornecer meio de lubrificação, resultando em superfícies de deslizamento de baixa fricção (BHOSALE; RICHARDSON, 2008).

Figura 1 – Arquitetura do tecido cartilaginoso em relação à distribuição de células, colágeno e agreganos.



Fonte: Adaptado de Bajpayee e Grodzinsky, 2017.

Ao redor das articulações, também se encontra a membrana sinovial. Esta estrutura consiste de duas camadas, chamadas de íntima ou sinovial e de tecido subsinovial (subintimal). A camada íntima é composta por células especializadas conhecidas como sinoviócitos,

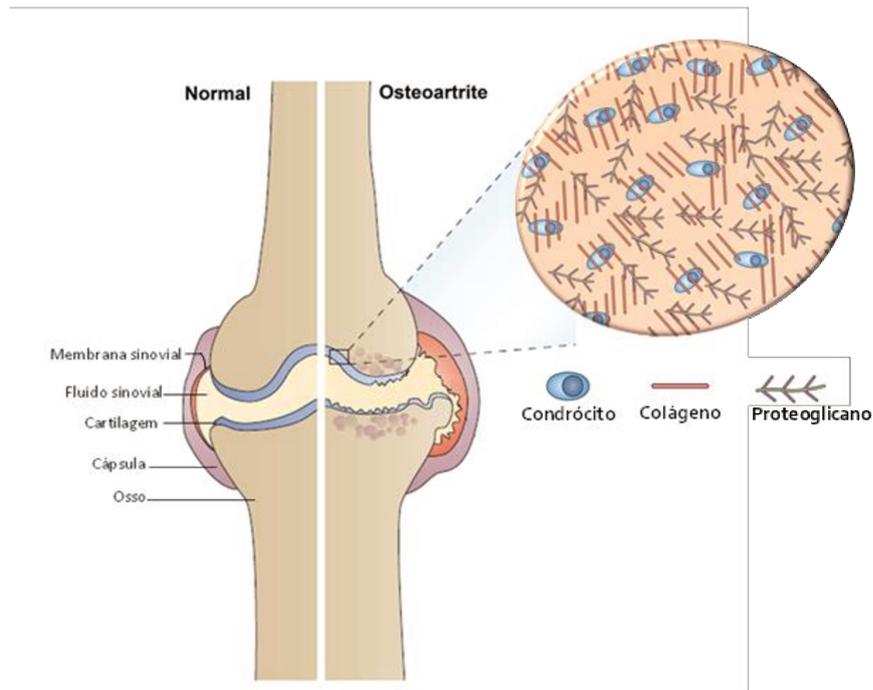
dispostas em várias camadas. Dois tipos de sinoviócitos estão presentes: células tipo A, que são fagocíticas, e células tipo B, que sintetizam o ácido hialurônico do líquido sinovial (NORRIS, 2011). O líquido sinovial é semelhante, em muitos aspectos, ao plasma sanguíneo. A principal diferença é que este líquido não contém fibrinogênio ou protrombina e, portanto, é incapaz de coagular. Entretanto, a cavidade articular não constitui um espaço fechado e o fluido sinovial está sujeito a uma rotatividade contínua nos vasos linfáticos (BÉDOUET *et al.*, 2013). Isso resulta em uma renovação do líquido sinovial a cada 2 h ou menos, o que acarreta em baixos tempos de meia-vida das soluções de medicamentos injetadas na cavidade da articulação, variando de 1 a 2 h para moléculas pequenas (BÉDOUET *et al.*, 2013). A quantidade de líquido sinovial presente em uma articulação é muito pequena, cerca de 0,5 a 4 mL quando em grandes articulações, como o joelho, e o líquido é espalhado por toda a articulação (NORRIS, 2011). O líquido sinovial fornece nutrição para cerca de dois terços da cartilagem articular, sendo que, após uma lesão, o volume desse fluido pode aumentar em 10 a 20 vezes. Além disso, ocorre a diminuição da produção de ácido hialurônico pelas células locais, com consequente diminuição da viscosidade do fluido (NORRIS, 2011).

Os danos na cartilagem articular podem ser causados por mecanismos físicos, biológicos ou pela combinação de ambos. As causas físicas, como traumas, muitas vezes danificam a estrutura da cartilagem e danificam os condrócitos, criando lesões permanentes no tecido. Por outro lado, as causas biológicas, tais como doenças autoimunes e inflamação, desencadeiam respostas bioquímicas e celulares que degradam o tecido cartilaginoso e, quando ocorrem na cartilagem articular, caracterizam a osteoartrite (GAUT; SUGAYA, 2015; Y. *et al.*, 2013). A incidência de osteoartrite aumenta com a idade, sendo mais comum em mulheres, especialmente após os 50 anos e ocorre majoritariamente nos joelhos, afetando também mãos e quadris (ARDEN *et al.*, 2014). A osteoartrite representa a forma mais comum de mais de 100 tipos de artrite e afeta mais de 124 milhões de pessoas em todo o mundo. Esta enfermidade causa dor, inchaço das articulações e diminuição da amplitude de movimento, causando grande impacto financeiro em decorrência de dificultar ou impedir o exercício profissional e também do custo de técnicas de diagnóstico radiográfico, do tratamento paliativo e de procedimentos cirúrgicos (GAUT; SUGAYA, 2015; HARDIN; COBELLI; SANTAMBROGIO, 2015; KWON, HEENAM *et al.*, 2019).

Os tratamentos atuais da osteoartrite concentram-se no alívio dos sintomas, sendo estas terapêuticas resumidas em trabalho anterior (WESTIN, CECILIA, 2016). Após o início da osteoartrite, as terapias existentes são incapazes de reverter ou prevenir a progressão da doença (KWON, HEENAM *et al.*, 2019). Dessa maneira, novos tratamentos vêm sendo pesquisados

com intuito de encontrar terapêuticas alternativas efetivas para esta doença, como a engenharia de tecidos. Na Figura 2 pode-se observar de forma esquematizada o aspecto típico de uma articulação saudável e outra afetada por osteoartrite, evidenciando os condrócitos, células-alvo deste estudo, assim como o colágeno e os proteoglicanos que constituem o tecido cartilaginoso.

Figura 2 – Articulação saudável e com osteoartrite e componentes principais.



Fonte: adaptado de HARDIN (2015) e WESTIN (2016).

2.2 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos relaciona conceitos de engenharia e das ciências da vida para restaurar, preservar ou melhorar funções biológicas através da manipulação de células, fatores bioquímicos, físicos e de biomateriais (GAUT; SUGAYA, 2015; JENKINS; LITTLE, 2019). Para recuperar as lesões nos tecidos cartilagosos, como as encontradas na osteoartrite, deve-se primeiramente determinar e providenciar os tipos de células apropriadas para a recuperação da cartilagem, as quais podem ser condrócitos autólogos, células-tronco ou uma combinação de ambos (GAUT; SUGAYA, 2015; KWON, HEENAM *et al.*, 2019). A utilização de condrócitos autólogos, entretanto, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de extração dessas células e o tipo de cartilagem formada (KWON, HEENAM *et al.*, 2019). Para a obtenção dos condrócitos, deve ser realizada uma coleta de células em uma parte saudável do tecido cartilaginoso, o que implica em mais uma cirurgia invasiva no processo terapêutico e em uma

nova lesão no tecido cartilaginoso. Além disso, a cartilagem formada muitas vezes se apresenta como fibrocartilagem, a qual possui propriedades mecânicas inferiores à cartilagem hialina encontrada na cartilagem articular (BHOSALE; RICHARDSON, 2008).

As células-tronco podem ser tanto de origem embrionária como provenientes de tecidos adultos. As embrionárias são ditas pluripotentes, ou seja, podem formar tecidos de qualquer uma das três camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma) (GAUT; SUGAYA, 2015). Entretanto, debates éticos e de segurança sobre o uso dessas células mudaram o foco para a utilização de células-tronco mesenquimais adultas (GAUT; SUGAYA, 2015). MSCs são definidas como um tipo de célula-tronco multipotente com a capacidade de gerar osso, músculo, cartilagem, gordura e outros tecidos relacionados. Estas células podem ser isoladas a partir de uma variedade de tecidos, incluindo o sangue periférico, a medula óssea, a polpa de dente e o tecido adiposo (GAUT; SUGAYA, 2015; KWON, HEENAM *et al.*, 2019).

A medula óssea é atualmente a fonte celular mais comumente utilizada na prática clínica, sendo usada no reparo de cartilagem tanto de forma isolada quanto em combinação com *scaffolds*. No entanto, este tipo celular apresenta algumas limitações, como a baixa ocorrência (0,01-0,001%), baixo potencial de diferenciação ao se expandir repetidamente *in vitro* e o fato de que a coleta dessas células é um procedimento doloroso e causa morbidade do local doador (FELLOWS *et al.*, 2016).

As células-tronco derivadas de tecidos dentários têm atraído a atenção mundial recentemente, uma vez que possuem propriedades adequadas em relação à resposta imune, são de obtenção relativamente fácil e apresentam capacidade de proliferação maior quando comparadas às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (HOLLANDS; ABOYEJI; ORCHARTON, 2018; KARAMZADEH; BAGHABAN, 2013), uma das fontes comumente empregadas.

São cinco os tipos de células-tronco provenientes de tecidos dentários: 1) Células-tronco da polpa de dentes decíduos, popularmente conhecidos como dentes de leite (*dental pulp stem cells* - DPSC), 2) Células-tronco da esfoliação dos dentes decíduos humanos (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth* - SHED), 3) Células-tronco do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells* - PDLSC), 4) Células-tronco da papila apical (*stem cells from apical papilla* - SCAP) dos dentes permanentes e 5) Células-tronco do folículo dental (*dental follicle progenitor cells* - DFSC). As DPSC, SHED e SCAP são mencionadas como células-tronco extraídas da polpa dentária, e as PDLSC e DFSC como células-tronco relacionadas ao

periodonto (HOLLANDS; ABOYEJI; ORCHARTON, 2018).

As polpas dos dentes decíduos, geralmente rejeitadas após a extração dentária, são assim uma fonte atrativa de células-tronco devido ao processo ser pouco invasivo e não envolver questões éticas como no caso das células embrionárias (KERKIS; CAPLAN, 2012).

As células-tronco da polpa dentária foram isoladas pela primeira vez a partir do terceiro molar e mostraram alta capacidade proliferativa e de diferenciação em diversos tipos celulares. Fisiologicamente, as células-tronco da polpa dentária podem manter e reparar o tecido periodontal, respondendo a danos, como cáries. As cáries, quando profundas, resultam na migração das DPSC para a área danificada, onde estas células se diferenciam em novos odontoblastos que reparam o dente danificado (HOLLANDS; ABOYEJI; ORCHARTON, 2018).

Existem diversas abordagens para a coleta e processamento das DPSCs, sendo que, de forma geral, o processo baseia-se primeiramente na extração dos dentes por profissional qualificado, os quais devem ser enviados a um laboratório de processamento dentro do prazo de 72 h. O dente deve ser transportado em solução salina estéril tamponada entre 4 e 26 °C. No centro de processamento, o dente é aberto em ambiente estéril, a polpa é exposta a uma solução de 10% (v/v) de DMSO, podendo todo o dente ser congelado a uma taxa controlada e armazenado em vapor de nitrogênio líquido (HOLLANDS; ABOYEJI; ORCHARTON, 2018). As células-tronco também podem ser coletadas previamente ao congelamento. Para realizar tal procedimento, os dentes devem ser desinfetados externamente através de diversas lavagens com PBS estéril, seguidos da imersão em iodopovidona, em tiosulfato de sódio e, por fim, por outra lavagem em PBS estéril (PERRY *et al.*, 2008). As raízes dos dentes desinfetados são separadas da coroa para a exposição da polpa dentária, a qual deve ser imersa em solução enzimática composta por colagenases do tipo I e II para a digestão do tecido e liberação das células. Após a digestão, é adicionado meio de cultivo específico para células-tronco com compostos capazes de interromper a ação das enzimas. Esta mistura é centrifugada e o sobrenadante é descartado. O sedimento celular é, então, ressuspendido em 5 mL de meio de cultivo fresco e todas células coletadas a partir de um único dente são transferidas para um frasco T de 25 cm². Entre 7 e 14 dias de crescimento, as DPSC são destacadas pela adição de tripsina e as células são congeladas em nitrogênio líquido a uma taxa controlada (PERRY *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que as DPSC apresentam potencial para reparar diversos tipos de tecidos. Fernandes e colaboradores (2018) cultivaram DPSCs em *scaffold* de colágeno tipo I e

III para a regeneração de tecido cartilaginoso. Os *scaffolds* com as células foram implantados em mini porcos com defeitos condrais de 6 mm. Após 6 semanas, ocorreu a produção de cartilagem hialina sobre o defeito condral, enfatizando o potencial uso desta abordagem (FERNANDES, TIAGO LAZZARETTI *et al.*, 2018).

Já Itoh e colaboradores (2018) avaliaram a utilização de DPSC na regeneração da própria polpa dentária. Neste estudo, agregados de DPSCs foram misturados a hidrogéis termossensíveis e impressos por tecnologia 3D. As construções foram inseridas no canal radicular de dentes humanos, os quais foram implantados por via subcutânea em camundongos imunodeficientes. Após 6 semanas, os pesquisadores verificaram que tecidos semelhantes a polpa, ricos em vasos sanguíneos, foram formados dentro do canal radicular (ITOH *et al.*, 2018).

Também se encontram estudos utilizando as DPSCs para a regeneração óssea, como o de Chamieh e colaboradores (2016). Os autores produziram um gel denso composto de colágeno semeado com DPSCs e avaliaram seu efeito osteogênico em defeito calvarial de ratos. A densidade mineral óssea e os parâmetros micro-arquitetônicos ósseos aumentaram significativamente quando foi utilizado o gel em conjunto com as DPSCs (CHAMIEH *et al.*, 2016).

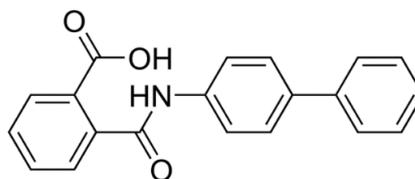
Por essas razões, as DPSCs são atualmente consideradas uma das fontes mais promissoras para a medicina regenerativa, incluindo tratamento para doenças dos tecidos orofaciais, neurológicos, cardiovasculares, hepáticos, pancreáticos e renais e na distrofia muscular (HOLLANDS; ABOYEJI; ORCHARTON, 2018).

Co-culturas de condrócitos e de células-tronco mesenquimais constituem mais uma possibilidade para a engenharia de tecido cartilaginoso, uma vez que as células-tronco são capazes de ativar os condrócitos para produção de uma nova cartilagem através de sinalização parácrina (GAUT; SUGAYA, 2015).

A diferenciação destas células-tronco em condrócitos pode ser alcançada através da utilização de fatores de diferenciação, como é o caso da Kartogenina e do TGF- β .

A kartogenina é uma molécula constituída por 4 anéis, dos quais três são aromáticos, o que a determina como molécula preponderantemente hidrofóbica, sendo sua estrutura apresentada na Figura 3.

Figura 3- Estrutura química da kartogenina.



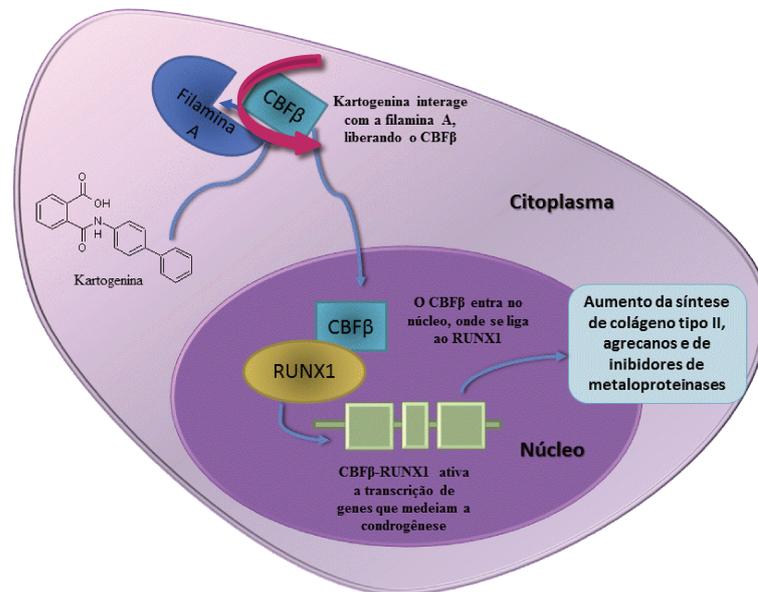
Fonte: Sigma-Aldrich, 2017.

Quando testada de forma intra-articular em camundongos com osteoartrite induzida, a kartogenina causou a restauração do tecido cartilaginoso e reduziu os níveis de dor, sem nenhum efeito negativo aparente (JOHNSON *et al.*, 2012). O mecanismo de ação da kartogenina, mostrado na Figura 4, se baseia na ligação desta molécula com a proteína filamina A, promovendo o deslocamento do fator CBF β (fator de transcrição da subunidade β do fator núcleo-ligante) de seu sítio de ligação citoplasmático. Dessa maneira, o CBF β se insere no núcleo, onde se liga ao fator de transcrição RUNX1, o qual em seguida se liga ao DNA. O complexo CBF β -RUNX1 ativa a transcrição de proteínas envolvidas na diferenciação da cartilagem, aumentando a síntese de colágeno tipo II, agreganos e inibidores teciduais de metaloproteinases (JOHNSON *et al.*, 2012).

Já a família TGF- β , constituída pelas isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, desempenha papéis críticos na regulação da diferenciação de condrócitos desde estágios iniciais até estágios terminais, incluindo condensação, proliferação, diferenciação terminal e manutenção dos condrócitos articulares (WANG, WEIGUANG; RIGUEUR; LYONS, 2014). Apesar de todas as três isoformas desta família serem expressas em condensações de células-tronco mesenquimais, a isoforma mais expressa na cartilagem vertebral é a TGF- β 3, ao passo que as isoformas TGF- β 1 e TGF- β 2 são minimamente detectáveis (PELTON *et al.*, 1991).

Gupta e colaboradores (2011) cultivaram células-tronco mesenquimais da medula óssea na presença de TGF- β 3 em um hidrogel constituído de carboximetil celulose. Os pesquisadores verificaram que a adição do fator de diferenciação induziu maior produção de glicosaminoglicanos e colágeno tipo II após 21 dias de cultivo, indicando diferenciação das células em condrócitos (GUPTA; COOPER; NICOLL, 2011).

Figura 4 – Figura esquemática do mecanismo de ação de diferenciação condrogênica da kartogenina em uma célula animal.



Fonte: Westin *et al.*, 2017.

Além da escolha adequada do fator de diferenciação, para que a engenharia de tecido cartilaginoso seja bem-sucedida, biomateriais devem propiciar a sobrevivência local das células utilizadas. Isto geralmente é alcançado através das propriedades básicas do material empregado, mas algumas modificações podem ser realizadas para tornar estes *scaffolds* mais efetivos na recuperação das lesões (GAUT; SUGAYA, 2015). O tamanho dos poros deve ser levado em conta, sendo que poros com tamanho médio de 300 μm induzem maior expressão de genes condrogênicos nas células inoculadas (MATSIKO; GLEESON; O'BRIEN, 2015).

Em relação às propriedades mecânicas, géis que apresentam menor rigidez resultam em expressões mais elevadas de marcadores condrogênicos, indicando diferenciação efetiva das células-tronco (KWON, HYUCK JOON, 2012; LIU, MEI *et al.*, 2017). Em relação à taxa de degradação do *scaffold*, foi demonstrado que MSCs encapsuladas em hidrogéis degradáveis por metaloproteinases, mas hidroliticamente estáveis, expressam altos níveis de marcadores condrogênicos e níveis mais baixos de genes hipertróficos em comparação com hidrogéis não degradáveis por essas enzimas (FENG, QIAN *et al.*, 2014).

Huang e colaboradores (2016), realizaram um levantamento das principais estratégias de engenharia de tecidos utilizando células para o reparo clínico da cartilagem articular. Os autores

encontraram 11 produtos já comercializáveis para tal finalidade. Dentre estes, dois produtos são hidrogéis: o Caripatch[®], produzido pela combinação de agarose e alginato, e o CaRes[®], fabricado com colágeno tipo I (HUANG, BRIAN J.; HU; ATHANASIOU, 2016).

O hidrogel Cartipatch[®] é utilizado em conjunto com condrócitos autólogos expandidos *in vitro*. Os condrócitos dos pacientes são cultivados até no máximo na passagem 3 em meio constituído por DMEM/Ham's F-12, suplementado com 10% de soro autólogo, ácido ascórbico (50 mg/L) e gentamicina/Fungizona. As células são, então, suspensas em agarose e alginato de grau médico (GelForCel; Tissue Bank of France, Paris, França) a uma concentração mínima de 1×10^6 células/mL e o conjunto é moldado em blocos cilíndricos de 10, 14 ou 18 mm de diâmetro (HUANG, BRIAN J.; HU; ATHANASIOU, 2016).

Para implantação, o defeito cartilaginoso deve ser ajustado até a profundidade de 4 mm através de brocas especialmente projetadas de acordo com o tamanho do *scaffold*. O tamanho e o número de construções usadas (até três) devem ser planejados para fornecer a melhor cobertura do defeito cartilaginoso. Por fim, cola de fibrina pode ser utilizada para melhorar a estabilidade do conjunto no defeito (HUANG, BRIAN J.; HU; ATHANASIOU, 2016). O Caripatch[®] já apresenta estudos de fase III concluídos, sendo indicado para lesões do tecido cartilaginoso de 2,5 a 7,5 cm², com até 10 mm de profundidade.

O CaRes[®] consiste em um hidrogel no qual também são incorporados condrócitos autólogos primários. Para formar as construções, os condrócitos isolados são ressuspensos em solução tampão, a qual é misturada com a solução de colágeno tipo I derivada de cauda de ratos (6 mg/mL) em ácido acético a 0,1% na proporção de 1:1 (v/v). Em pH e temperatura fisiológicos, as soluções ácidas de colágeno são capazes de formar hidrogel. A densidade celular usada no CaReS[®] não é especificada, podendo ser dependente do paciente. Porém, estudos pré-clínicos indicam o uso de 20.000 células/mL. Também existe uma versão deste produto para ser utilizada sem células, vendida sob o nome de CaReS[®]-1S.

Os *scaffolds* formados pelo hidrogel com as células geralmente apresentam 3,4 cm de diâmetro e de 6 a 8 mm de espessura, embora a página de *internet* da empresa indique que qualquer tamanho possa ser produzido. Após a gelificação, os *scaffolds* são cultivados *in vitro* por 10 a 13 dias na presença de soro autólogo e, após este tempo, estão prontos para implantação (HUANG, BRIAN J.; HU; ATHANASIOU, 2016).

Além desses hidrogéis, diversos outros tipos *scaffolds* se encontram disponíveis comercialmente como, por exemplo, o MACI[®]. Segundo a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), que aprovou a comercialização do MACI[®] na União Europeia, o produto se trata de uma membrana de colágeno tipo I e III derivado do tecido peritoneal porcino descelularizado

(ACI-Maix™; Matricel, Herzogenrath, Alemanha) (EMA, 2013). A membrana apresenta 14,5 cm² e também deve ser utilizada com condrócitos autólogos de pacientes. Indica-se a utilização de células na passagem P2 ou P3 em meio composto por DMEM, 9% de SFB e 45 mg/mL de gentamicina. As células são semeadas na concentração de 0,5 a 1 x 10⁶ células/cm² e os *scaffolds* são mantidos em cultivo por cerca de 4 dias antes da implantação (HUANG, BRIAN J.; HU; ATHANASIOU, 2016).

O *scaffold* apresenta estrutura em duas camadas, sendo um lado poroso para permitir a infiltração celular, o qual deve ser colocado de frente para o defeito cartilaginoso, e um lado não poroso, para a retenção de células (HUANG, BRIAN J.; HU; ATHANASIOU, 2016). Atualmente, a comercialização do MACI se encontra suspensa na Europa, devido somente às necessidades de adequação do local de produção.

Os hidrogéis podem mimetizar de maneira adequada o tecido cartilaginoso, uma vez que podem apresentar características mecânicas, de lubrificação e de intumescimento similares a desse tecido (GAUT; SUGAYA, 2015), sendo discutidos mais profundamente no próximo item.

2.3 Hidrogéis

Hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas tridimensionais que absorvem quantidade significativa de água ou fluidos biológicos. Estas redes podem ser classificadas em duas categorias principais, de acordo com o tipo de reticulação. A rede reticulada por ligações covalentes é chamada de gel químico, enquanto a reticulada por associações físicas entre as cadeias poliméricas é chamada de gel físico (MAHINROOSTA *et al.*, 2018). A fase sol é definida como um líquido que flui, enquanto que a fase gel não possui mais essa capacidade e mantém sua coesão e integridade (JEONG; WAN; HAN, 2002).

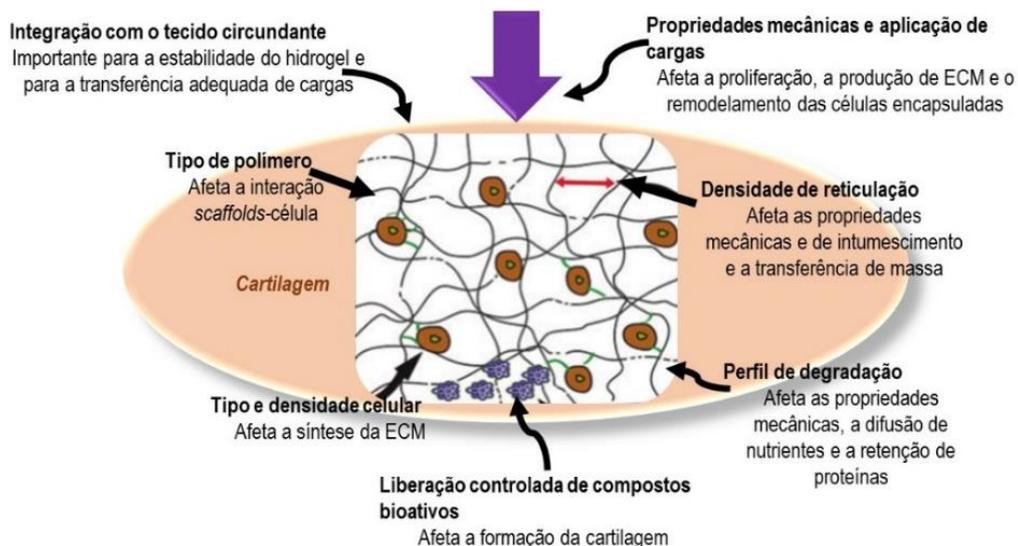
Devido à capacidade de retenção de água e de outras propriedades biomiméticas, os hidrogéis constituem biomateriais únicos amplamente aplicados na administração de fármacos, na engenharia de tecidos e em dispositivos médicos, por exemplo (MAHINROOSTA *et al.*, 2018; SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011; YU; DING, 2008).

A razão dos hidrogéis atraírem cada vez mais atenção na engenharia de tecidos cartilagosos se deve ao fato de mimetizarem este tecido adequadamente, uma vez que a cartilagem articular demonstra comportamento viscoelástico quando deformada, além de apresentar uma superfície suave, lubrificada e de baixa fricção durante o movimento, o que auxilia na transmissão de carga para o osso subcondral (GAUT; SUGAYA, 2015). Os hidrogéis,

de forma semelhante, podem promover a encapsulação dos condrócitos, mantendo seu fenótipo circular, e sua natureza viscoelástica permite a transferência de cargas mecânicas adequadas para os condrócitos (CUSHING; ANSETH, 2007; LIU, MEI *et al.*, 2017; YAMAOKA *et al.*, 2006).

Diversas propriedades do hidrogel podem ser ajustadas ou modificadas para que o biomaterial resultante tenha elevado potencial de uso na engenharia de tecidos cartilagosos. Características importantes incluem o tipo de polímero, a densidade de reticulação, o perfil de degradação, as propriedades mecânicas, além da capacidade de liberação de fármacos em concentrações adequadas por períodos apropriados (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011). Outros fatores relevantes incluem estratégias de integração do biomaterial com o tecido circundante, assim como a fonte e a concentração celular (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011). Estas características são representadas esquematicamente na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática das diversas variáveis que podem afetar as propriedades de um hidrogel.



Fonte: adaptada de Spiller *et al.*, 2011.

Dentre os diversos tipos de hidrogéis, os injetáveis com polimerização *in situ* têm se destacado (LIU, MEI *et al.*, 2017). Estes materiais se comportam como líquidos viscosos à temperatura ambiente e, quando injetados, rapidamente gelificam nas condições fisiológicas. Este tipo de gelificação *in situ* apresenta algumas vantagens, como possibilitar a aplicação

minimamente invasiva do biomaterial, uma vez que o gel pode ser implantado no corpo através do auxílio de uma agulha, e a incorporação de agentes bioativos e células pode ser realizada simplesmente pela mistura com o hidrogel (LIU, MEI *et al.*, 2017; YU; DING, 2008). Após a gelificação, estes géis se comportam como matrizes de liberação controlada de drogas e células com potencial uso na engenharia de tecidos.

Hidrogéis termorresponsivos podem ser formulados de forma a apresentarem capacidade de gelificação espontânea na temperatura corpórea, livre de qualquer outro tipo de tratamento químico (YU; DING, 2008). A transição sol-gel desse tipo de hidrogel é dita inversa, uma vez que a gelificação ocorre com o aumento, ao invés da diminuição da temperatura. Esse fato é benéfico tanto para os fármacos como para as células incorporadas, visto que baixas temperaturas protegem os fármacos da desnaturação e preservam as células e a temperatura média do corpo humano, em torno de 37 °C, também não apresenta efeitos adversos (KLOUDA, 2015; YU; DING, 2008).

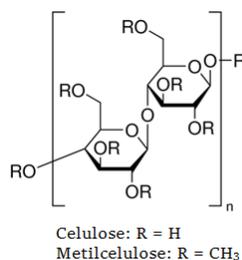
Diversos polímeros apresentam comportamento termorresponsivo, como a metil ou hidroxipropil celulose, derivados de quitosana (a própria quitosana também é termorresponsiva após adição de sais de polioliol, como o β -glicerofosfato), poloxamers, dentre outros (KLOUDA, 2015; YU; DING, 2008). A metilcelulose apresenta características favoráveis à produção de hidrogéis termorresponsivos, conforme discutido a seguir.

2.4 Metilcelulose

A metilcelulose é um derivado da celulose, muito utilizado como aglutinante ou espessante em aplicações farmacêuticas, alimentar e cerâmica, com massa molar média de 658.000 g/mol e conhecida por apresentar gelificação termorreversível em solução aquosa mediante aquecimento (KOBAYASHI; HUANG; LODGE, 1999).

É o derivado mais simples de celulose, no qual grupos metil (-CH₃) substituem os hidrogênios das hidroxilas da molécula nas posições C-2, C-3 e/ou C-6 (Figura 6), o que diminui as interações intra e intermoleculares e favorece as ligações de hidrogênio com o meio aquoso, melhorando sua solubilidade em água (HUANG, CHIEH CHENG *et al.*, 2014; NASATTO *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2012).

Figura 6 - Estrutura química da metilcelulose.



Fonte: adaptada de Sigma-Aldrich, 2017.

A produção de metilcelulose comercial é geralmente realizada em sistemas de duas fases. Mais especificamente, como a celulose é insolúvel em água e nos solventes orgânicos mais comuns, um meio alcalino (geralmente contendo NaOH) é colocado em contato com as fibras celulósicas para obtenção de celulose alcalina (NASATTO *et al.*, 2015). A celulose alcalina reage com um agente eterificante, como o iodometano, o clorometano ou o dimetil sulfato. Na sequência, é realizada a purificação e remoção de subprodutos por lavagem em água quente, seguida de secagem e pulverização da MC preparada. Frequentemente, são adicionados acetona, tolueno ou isopropanol após o agente eterificante para atingir diferentes graus de substituição (NASATTO *et al.*, 2015). Pelo processo descrito produz-se um polímero heterogêneo, composto por regiões hidrofóbicas altamente substituídas, correspondentes às zonas amorfas da celulose, e regiões mais hidrofílicas, com menor grau de substituição (NASATTO *et al.*, 2015). Para produzir uma MC com estrutura química homogênea, a celulose é solubilizada em hidróxido de amônio quaternário (TMAH) ou em uma mistura de dimetilacetamida e cloreto de lítio (DMA – LiCl) ou NaOH/uréia antes da etapa de eterificação. Este processo homogêneo leva a uma melhor acessibilidade dos grupamentos hidroxila livres e a uma distribuição mais regular de substituintes metila ao longo das cadeias, o que favorece a solubilidade em água (NASATTO *et al.*, 2015).

O grau de substituição (GS) da metilcelulose pode chegar a 3, podendo-se observar aumento expressivo da solubilidade na faixa de 1,7 a 2,0. Isso ocorre devido ao fato de um GS muito baixo ainda favorecer as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e de um GS muito elevado favorecer a ocorrência de interações hidrofóbicas, resultando em ambos os casos em moléculas pouco solúveis (KOBAYASHI; HUANG; LODGE, 1999).

O comportamento térmico da metilcelulose é singular, visto que a viscosidade da solução aquosa se mantém praticamente constante quando a temperatura varia até seu ponto crítico.

Quando a temperatura ultrapassa esse limite superior, a viscosidade aumenta rapidamente, resultando na formação de um gel termorreversível (NASATTO *et al.*, 2015). Estas características classificam a metilcelulose como um polímero de temperatura de solubilidade crítica baixa (LCST).

O mecanismo de gelificação mais aceito é o que descreve o processo em duas etapas, representadas pela formação de um gel e pela separação de fases. A formação do gel é impulsionada principalmente por interações hidrofóbicas que ocorrem em zonas altamente metiladas da molécula, enquanto a separação de fases ocorre em temperaturas geralmente superiores a 60 °C com formação de um gel turvo resistente. Essa gelificação da metilcelulose é influenciada pelo grau de substituição, pela massa molar da molécula e pela força iônica do meio (ARVIDSON *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2001; NASATTO *et al.*, 2015; SARKAR, 1995).

Diversos trabalhos relatados na literatura descrevem o uso de hidrogéis compostos de metilcelulose para a engenharia de tecidos, como o de Huang e colaboradores (2014). Neste estudo, foi desenvolvido um hidrogel termorresponsivo composto de metilcelulose a 12% m/v (com viscosidade de 15 cP a 2% m/v em solução aquosa a 20 °C) em PBS para cultivo de células-tronco mesenquimais de medula óssea isoladas de ratos Lewis para o tratamento de doenças isquêmicas cardíacas. *In vivo*, observaram que as células injetadas ficavam retidas nos interstícios dos tecidos musculares e aderidas a sítios do enxerto, notando também aumento significativo da densidade vascular e melhoria da função do coração infartado pelo uso do biomaterial (HUANG, CHIEH CHENG *et al.*, 2014).

Em outro estudo, Lee e Park (2016) desenvolveram um hidrogel deste mesmo polímero a 5% m/v (com viscosidade de 15 cP a 2% m/v em solução aquosa a 20 °C) em água, porém acrescido de micropartículas para a liberação controlada de diversas moléculas sinalizadoras. Os hidrogéis foram moldados em configurações tridimensionais específicas através de impressão 3D, gerando gradientes das moléculas sinalizadoras visando à obtenção de uma estrutura com múltiplos tipos celulares (LEE, WONJAE; PARK, 2016). Foi observada diferenciação setorizada de células-tronco, com a formação de uma estrutura 3D composta por osso vascularizado e tecido osteocondral, passível de uso clínico na recuperação óssea (LEE, WONJAE; PARK, 2016).

Em relação a trabalhos desenvolvidos para a engenharia do tecido cartilaginoso, Sá-Lima e colaboradores (2011) produziram uma formulação de hidrogel termorresponsivo de poli(N-isopropilacrilamida) enxertada com metilcelulose (massa molar de 14 kDa) para a encapsulação de condrócitos murinos. As células foram cultivadas por 28 dias no hidrogel, sendo verificada

proliferação celular e produção de glicosaminoglicanos, o que indicou que o hidrogel possuía potencial para ser utilizado na engenharia do tecido cartilaginoso (SÁ-LIMA *et al.*, 2011).

Já Liu e Yao (2015) desenvolveram um hidrogel baseado em goma xantana (viscosidade de 800-1200 cP) e metilcelulose (viscosidade de 15 cP, massa molar de 14kDa, grau de substituição de 1,5–1,9). As proporções de goma xantana utilizadas foram de 1, 2 ou 3% (m/v) e de metilcelulose de 8, 10 ou 12% (m/v). Devido à xantana ser composta por uma cadeia helicoidal dupla, a blenda deste polímero com a metilcelulose apresentou alta viscosidade. Quando a temperatura das misturas era alterada de 23 para 37 °C, era observada a formação de redes termorresponsivas que levava à gelificação das soluções, sendo a proporção de 2% (m/v) de goma xantana e de 10% (m/v) de metilcelulose a que apresentou melhores resultados. Estudos *in vitro* demonstraram que o hidrogel composto por xantana e metilcelulose é um material injetável promissor para a administração de fármacos e para a recuperação de tecido cartilaginoso (LIU, ZHIJIA; YAO, 2015).

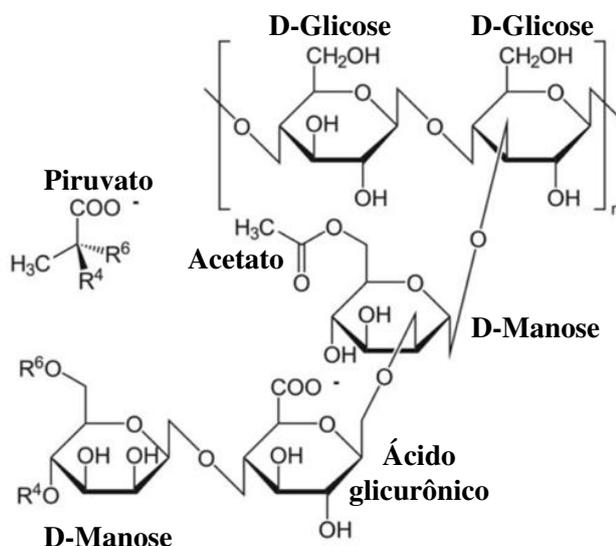
A goma xantana também apresenta propriedades relevantes no tratamento de lesões cartilaginosas, as quais serão discutidas à frente.

2.5 Goma Xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo naturalmente produzido por fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*, com massa molar variando de 2×10^6 a 20×10^6 Da e pKa de 2,9 (BELLINI; DE OLIVA-NETO; MORAES, 2015; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; SHAO *et al.*, 2013). É o polissacarídeo microbiano mais importante no âmbito comercial, uma vez que apresenta aplicações como estabilizador de emulsões, espessante, é pseudoplástico e estável termicamente (PETRI, 2015). Foi descoberto na década de 1950 por Allene Rosalind Jeanes e aprovado pelo FDA (Reg. Fed. 345376) em 1969 como um polímero não tóxico e seguro, o que permite sua utilização em diversos produtos alimentares (PETRI, 2015).

A goma xantana é composta por unidades repetitivas de cinco monossacarídeos de três tipos, a D-glicose (duas unidades, posicionadas na cadeia principal), além de trímeros formados por D-manose (duas unidades) e ácido D-glicurônico (uma unidade) que constituem a cadeia lateral (Figura 7) (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Figura 7 – Estrutura química da goma xantana.



Fonte: adaptada de Petri, 2015.

A estrutura secundária da xantana é helicoidal, formada pelas cadeias laterais que envolvem a cadeia principal por ligações de hidrogênio, protegendo esta última do ambiente externo. Já a estrutura terciária é formada por uma rede interconectada, composta pelos complexos helicoidais (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; SHAO *et al.*, 2013).

A solução de 1% (m/v) de goma xantana (massa molar de 5100 a 5400 kDa) em PBS, quando injetada em articulações de ratos Wistar na razão de 0,2 mL/Kg, demonstrou ser efetiva na redução da dor causada pela osteoartrite, além de diminuir a degradação da cartilagem, indicando que o método pode ser eficaz no tratamento da osteoartrite em humanos (HAN *et al.*, 2017; SHAO *et al.*, 2013). Outro estudo demonstrou que não ocorrem efeitos adversos em condrócitos quando estes são tratados *in vitro* com diferentes concentrações de xantana (0, 10, 100, 500, 1000 2000 µg/mL) e, quando cultivados na presença de xantana e de interleucina-1β, um inibidor tecidual, a goma xantana protege as células de maneira dependente da dose, fazendo com que as mesmas voltem a crescer (HAN; SHAO; *et al.*, 2012; KUMAR, ANUJ; RAO; HAN, 2018), exibindo, portanto, ação protetora da cartilagem articular.

Essas pesquisas indicam que a incorporação de goma xantana em *scaffolds* poderia favorecer o tratamento da osteoartrite.

Outro polissacarídeo que apresenta potencial na engenharia de tecido cartilaginoso é a quitosana, sendo seu derivado hidrossolúvel carboximetil quitosana discutida no próximo item.

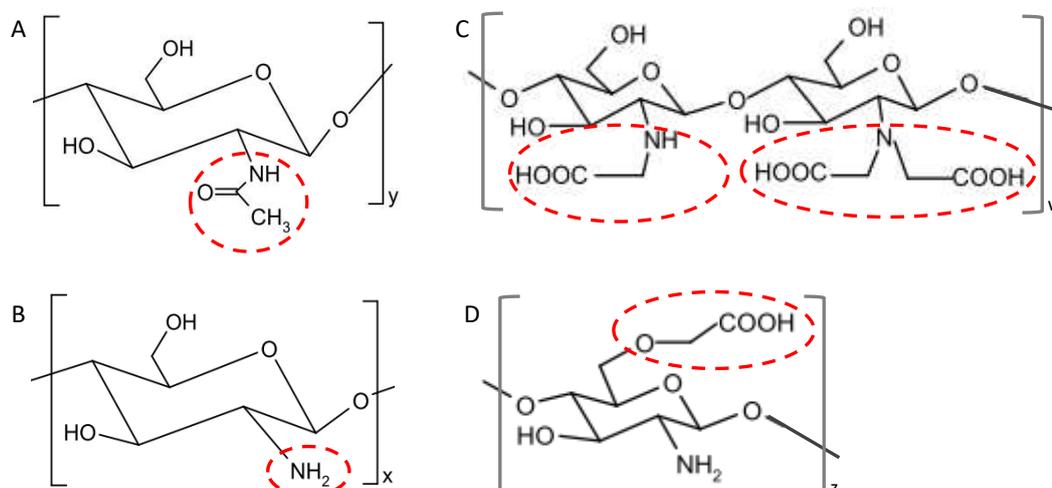
2.6 Carboximetil quitosana

A quitosana é um derivado da quitina, sendo obtida a partir da desacetilação alcalina desse polímero. A quitina é extraída do exoesqueleto de artrópodes e é estruturalmente similar aos glicosaminoglicanos encontrados na cartilagem (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011). A quitina passa a ser chamada de quitosana quando seu grau de desacetilação fica acima de 50%. A massa molar da quitosana varia de 30 a 1000 kDa, dependendo principalmente de sua fonte e do método de preparação (DUTTA, 2016). A quitosana exibe características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade e baixa toxicidade, o que a torna uma boa candidata à engenharia de tecidos (KHOR; LIM, 2003). Este polissacarídeo é utilizado em diversos campos, como o farmacêutico, o biomédico, no tratamento de água, em cosméticos, na agricultura e na indústria alimentícia. Entretanto, a reduzida solubilidade da quitosana em condições de pH neutro limita suas possibilidades de aplicação, uma vez que este polímero apresenta pKa de 6,5, solubilizando-se somente em pH abaixo desse valor (DUTTA, 2016; MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010). Essa característica é decorrência da estrutura cristalina altamente estável ocasionada por ligações de hidrogênio (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

A solubilidade da quitosana pode ser aumentada através da despolimerização ou por modificações químicas em sua estrutura, visto que esse polissacarídeo apresenta aminas reativas e hidroxilas primárias e secundárias que podem ser utilizadas para tal finalidade em condições brandas de reação (DUTTA, 2016; MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

Derivados hidrossolúveis podem ser preparados de diversas maneiras, como pela introdução de grupos hidrofílicos (como hidroxipropil, di-hidroxietil, hidroxialquilamino), por sulfatação, fosfatação ou pela introdução de grupos carboxialquil (como carboximetil, carboxietil e carboxibutil) (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010). Em comparação com outros derivados de quitosana, a carboximetil quitosana (Q) tem sido amplamente estudada devido à sua facilidade de síntese e pelas inúmeras possibilidades de aplicações (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010). Dependendo do modo de preparo, a quitosana pode ser carboximetilada em seus grupamentos amina e/ou em suas hidroxilas, formando N-carboximetil e/ou O-carboximetil quitosana (Figura 8). Devido a isso, seu pKa pode variar de 2 a 4 (FENG, CHAO *et al.*, 2013).

Figura 8 – Estrutura química da quitina (A), quitosana (B), N-carboximetil quitosana (C) e O-carboximetil quitosana (D).



Fonte: adaptada de Mourya et al., 2010.

Estudos demonstram que a carboximetil quitosana conserva diversas propriedades da quitosana nativa, como a semelhança com os glicosaminoglicanos. Esta similaridade torna a carboximetil quitosana uma boa candidata para a composição de *scaffolds*, os quais atuam como matriz extracelular sintética, fornecendo sinais para as células e orientando o crescimento do novo tecido formado (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

O *scaffold* composto pelo polissacarídeo deve sofrer degradação ao passo que esse novo tecido é formado, o que demonstra mais uma prerrogativa da utilização da carboximetil quitosana, uma vez que sua dissolução em pH fisiológico é favorecida em relação à quitosana nativa (LUO; WANG, 2014; MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

Foi demonstrado que a carboximetilação da quitosana protege condrócitos contra a apoptose induzida por interleucina-1 β de maneira dependente da dose (CHEN *et al.*, 2006). Nesse trabalho, condrócitos de coelhos foram primeiramente induzidos à apoptose através da adição de IL-1 β ao meio de cultivo. Em seguida, as células foram tratadas com diversas concentrações de carboximetil quitosana (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e notou-se que ocorria proteção da função mitocondrial e declínio nos níveis de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio de maneira dependente da dose (CHEN *et al.*, 2006).

Em outro estudo, foi injetada nas articulações de coelhos com osteoartrite induzida 0,3 mL de solução de carboximetil quitosana a 2% (m/v), a qual suprimiu significativamente a expressão de metaloproteinases 1 e 3 e reduziu a degradação do tecido

cartilagenoso (HONGBIN *et al.*, 2004).

Tang e colaboradores (2012) também avaliaram a carboximetil quitosana na engenharia de tecido cartilagenoso. Neste estudo, os pesquisadores desenvolveram um hidrogel de goma gelana, que por si só apresentou características termorresponsivas, com carboximetil quitosana, na proporção de 2,5% (m/v) para 1% (m/v), respectivamente. Com a complexação destes polímeros, a temperatura de gelificação da goma gelana baixou de 42 para 37 °C e as propriedades mecânicas do hidrogel foram melhoradas. Ensaio *in vitro* de encapsulação e proliferação de condrócitos nesse hidrogel mostraram que a viabilidade celular aumentou de forma significativa, indicando que o material produzido pode ter aplicabilidade na engenharia de tecidos cartilagenosos (TANG, YAJUN *et al.*, 2012).

Além de um *scaffold* que mimetize o tecido, a engenharia de tecido cartilagenoso também preconiza a utilização de fármacos capazes de auxiliar no tratamento da osteoartrite, dentre os quais destacam-se o diclofenaco de sódio, a dexametasona e o ácido gálico.

2.7 Fármacos

Uma das estratégias para o tratamento da osteoartrite seria controlar a inflamação e aliviar a dor através da redução dos níveis de prostaglandinas, as quais atuam como mediadores parácrinos e autócrinos. Para isso, é necessária a administração de drogas que regulem as enzimas ciclooxigenase I e II (COXI e COXII), uma vez que essas são enzimas importantes na produção das prostaglandinas. Duas classes de fármacos amplamente utilizadas para esta finalidade são os anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) e os corticoides. Os NSAIDs agem diretamente nas COX, enquanto que os corticoides atuam na inibição da síntese das COX (ELRON-GROSS; GLUCKSAM; MARGALIT, 2009).

Apesar de diversos NSAIDs serem considerados eficazes no tratamento da osteoartrite, em vários estudos é mostrado que sua administração oral diária é associada a efeitos adversos que incluem toxicidade gastrointestinal, úlceras gástricas e desenvolvimento de alergia aguda (ELRON-GROSS *et al.*, 2009).

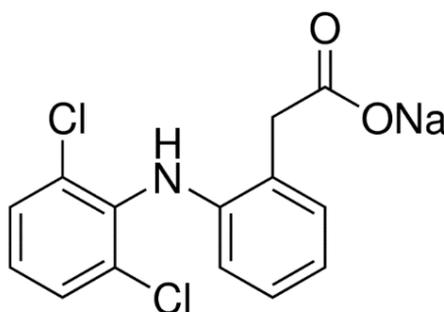
Em um destes estudos foi analisada a incidência de efeitos adversos devido ao uso dos anti-inflamatórios celecoxibe, naproxeno ou ibuprofeno. A análise incluiu cerca de 24.000 pacientes com osteoartrite ou artrite reumatoide que estavam sendo medicados por cerca de 2 anos para o alívio da dor articular. Não houve diferença significativa entre os três

medicamentos para eventos cardiovasculares adversos. Entretanto, uma menor quantidade de eventos gastrointestinais adversos foi observada no grupo celecoxibe e uma menor incidência de eventos renais adversos foram observados no grupo celecoxibe em comparação ao ibuprofeno (NISSEN *et al.*, 2016; NELSON, 2018).

Em outro estudo foi realizada uma metanálise da eficácia de diferentes anti-inflamatórios não esteroides, paracetamol e placebo no tratamento da dor relacionada à osteoartrite (NELSON, 2018). Os autores identificaram que todas as preparações de anti-inflamatórios não esteroides diminuem a dor, independentemente da dose, quando comparadas ao placebo. Nenhum dos estudos indicou alívio da dor após o tratamento com paracetamol. Os anti-inflamatórios mais eficazes foram o diclofenaco de sódio e o etoricoxibe, sendo que a dose diária oral de 150 mg de diclofenaco é o tratamento disponível mais eficaz atualmente para alívio da dor gerada pela osteoartrite (NELSON, 2018).

O diclofenaco é um anti-inflamatório não-esteróide membro da classe dos acetatos de fenilalanina (RAINSFORD; KEAN; EHRLICH, 2008). Foi descoberto na década de 1960, baseado na hipótese levantada por Scherrer e Shen, que duas conformações estruturais eram essenciais para adequada atividade anti-inflamatória (RAINSFORD; KEAN; EHRLICH, 2008). Estas estruturas seriam um ácido funcional em pH 6 e dois núcleos aromáticos, cuja substituição com grupamentos cloreto inibisse a coplanaridade, ou seja, as duas estruturas aromáticas ficariam fora do plano, permitindo uma ligação adequada com receptores anti-inflamatórios (Figura 9) (RAINSFORD; KEAN; EHRLICH, 2008).

Figura 9 - Estrutura química do diclofenaco de sódio.



Fonte: Sigma-Aldrich, 2019.

O diclofenaco de sódio é geralmente produzido como sal sódico e apresenta solubilidade em água. Porém, a fração ácida da molécula se solubiliza em soluções lipídicas e/ou alcalinas, o que gera propriedades físico-químicas propícias para que o diclofenaco penetre em

membranas, especialmente no revestimento sinovial das articulações e na pele (RAINSFORD; KEAN; EHRLICH, 2008). Outras propriedades relevantes do diclofenaco de sódio estão compiladas na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do diclofenaco de sódio (Fonte: Rainsford *et al.*, 2008).

Propriedades	Valores
Massa molar	318,15 KDa
Ponto de ebulição	280-281 °C
pK _a *	3,9 ± 0,2
Solubilidade em água	2,0 g/100 mL (pH 8,0)
log P**	13,4 (pH 7,4, 25 °C)

* logaritmo negativo da constante de acidez, K_a

** P: coeficiente de partição em sistema n-octanol/água

Entre outras rotas possíveis para a administração de diclofenaco, a injeção na cavidade intra-articular pode apresentar diversas vantagens, como a não irritação do trato gastrointestinal, o que pode reduzir os efeitos adversos. No entanto, os benefícios da administração local de diclofenaco podem ser diminuídos pela curta duração do efeito terapêutico, uma vez que a meia-vida deste fármaco, quando injetado intra-articularmente em sua forma livre, é de aproximadamente de 1 a 5 h (ELRON-GROSS *et al.*, 2009; SULISTIO *et al.*, 2019).

Elron-Gross e colaboradores (2009) produziram vesículas a partir de colágeno e lipídios, chamadas de colagômeros, para encapsulação de 0,5 a 10 mg/mL de diclofenaco. Os efeitos terapêuticos do diclofenaco conjugado ao colagômero foram estudados em ratos com osteoartrite induzida. Uma única injeção intra-articular da formulação reduziu significativamente a inflamação em três semanas em comparação aos animais não tratados e ao tratamento convencional (medicamento injetado na forma livre), concluindo que esta é uma alternativa viável de tratamento da osteoartrite (ELRON-GROSS *et al.*, 2009).

Já Qi e colaboradores (2016), produziram hidrogéis termossensíveis de quitosana com β -glicerofosfato contendo diclofenaco encapsulado em micropartículas de alginato para o tratamento da inflamação relacionada a artrite. A melhor formulação exibiu transição sol-gel a $31,72 \pm 0,42$ °C, prolongando a liberação *in vitro* do diclofenaco por 5 dias, a qual seguiu o modelo matemático de Ritger-Peppas. Além disso, a eficácia anti-inflamatória dos hidrogéis combinados com diclofenaco em coelhos com artrite reumatóide foi maior que a da solução

medicamentosa isolada e dos hidrogéis de quitosana puros, indicando que a combinação do fármaco com os hidrogéis é uma alternativa viável para o tratamento da artrite (QI *et al.*, 2016).

A injeção intra-articular de corticoides é outra terapia consolidada desde a década de 1950 para o tratamento da osteoartrite. Os corticoides comumente utilizados no tratamento desta doença são a hidrocortisona, a metilprednisolona, a dexametasona, a betametasona, a prednisolona e a triancinolona (WERNECKE; BRAUN; DRAGOO, 2015). A administração sistêmica desses corticoides é efetiva no controle de inflamações, porém seu uso pode causar alguns efeitos adversos, como perda óssea, necrose avascular, aumento de peso corpóreo e intolerância à glicose. Todavia, a administração intra-articular destes compostos minimiza estes riscos (GRODZINSKY *et al.*, 2017).

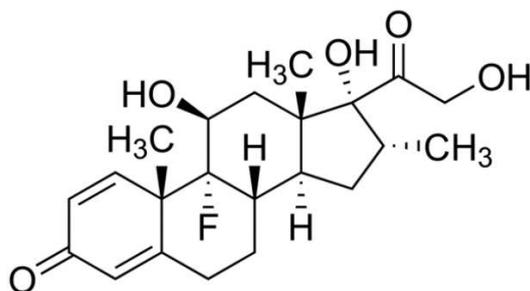
Em modelo animal, os corticoides metilprednisolona, hidrocortisona e triancinolona exibiram efeitos benéficos quando aplicados de forma intra-articular em doses baixas (geralmente inferiores a 3 mg), sendo observado aumento do crescimento celular e recuperação do tecido cartilaginoso. No entanto, em doses mais altas (superiores a 3 mg), os corticoides foram associados a danos significativos na estrutura cartilaginosa e a toxicidade aos condrócitos. Assim, é recomendada a utilização de doses mais baixas na administração intra-articular.

A dexametasona se destaca no tratamento da osteoartrite, uma vez que apresenta potencial anti-inflamatório de cerca de 20 a 30 vezes maior que as hidrocortisonas encontradas na natureza (GRODZINSKY *et al.*, 2017).

A dexametasona é produzida na forma de pó cristalino branco e inodoro, sendo praticamente insolúvel em água e facilmente solúvel em etanol, acetona, dimetilsulfóxido, dioxano e metanol (BERGAMINI, 2008). Possui massa molar de 392,46 g/mol e deve ser armazenada entre 2 e 8 °C, sendo sensível à luz. Na Figura 10 é representada a estrutura deste fármaco.

A dexametasona também apresenta a capacidade de inibir a produção de metaloproteinasas, citocinas inflamatórias, óxido nítrico e outros diversos radicais livres em uma variedade de tipos celulares e modelos animais (GRODZINSKY *et al.*, 2017). Além disso, a dexametasona mantém a viabilidade de condrócitos quando expostos a IL-1. Estas propriedades fazem da dexametasona um potencial agente profilático para a prevenção de respostas degenerativas na cartilagem (GRODZINSKY *et al.*, 2017).

Figura 10 - Estrutura química da dexametasona.



Fonte: DUARTE; MANO; REIS, 2009.

Lu e colaboradores (2011) investigaram o efeito da dexametasona em diferentes concentrações (de 0,1 nmol/L a 100 μ mol/L) em explantes de cartilagens bovinas lesionados por compressão na presença ou ausência das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6. A combinação de lesão mecânica, TNF- α e IL-6 causou a perda mais grave de GAGs. Os pesquisadores verificaram que essa perda de GAGs era comparável aos níveis do controle sem tratamento com citocinas quando a cartilagem era tratada com concentrações baixas de dexametasona, como de 1 nmol/L. Em concentrações acima de 100 nmol/L, o tratamento com dexametasona suprimia a perda de GAG a níveis inferiores aos encontrados nos controles do ensaio sem citocina. Também foram analisadas as taxas de biossíntese de proteoglicanos em resposta às diferentes condições de tratamento. Comparado aos explantes de cartilagens bovinas não lesionados, o tratamento com TNF- α reduziu significativamente a incorporação de sulfato, conforme o esperado. Por outro lado, o tratamento com TNF- α em conjunto com dexametasona em concentrações a partir de 0,1 nmol/L mostrou taxas de incorporação de sulfato estatisticamente iguais aos dos controles. Além disso, as concentrações entre 0,1 μ mol/L e 100 μ mol/L de dexametasona aumentaram significativamente a incorporação de sulfato. Assim, os pesquisadores indicaram a utilização do fármaco no tratamento da osteoartrite (LU; EVANS; GRODZINSKY, 2011).

Em outro estudo, pesquisadores produziram hidrogéis de ácido hialurônico reticulado com e sem dexametasona, nas concentrações de 500 e 1250 μ mol/L de gel. Os géis foram testados em ratos com osteoartrite induzida cirurgicamente. Foram realizadas injeções intra-articulares durante quatro semanas e, após 12 semanas, os animais foram analisados. Os autores concluíram que os géis contendo dexametasona apresentaram efeitos condroprotetores e anti-inflamatórios superiores ao do ácido hialurônico isolado no tratamento da osteoartrite em

modelo animal (ZHANG, ZHIWEI *et al.*, 2016).

Outro composto ativo de interesse é o ácido gálico (AG). Entretanto, esta molécula é ainda pouco utilizada no tratamento da osteoartrite. Considerado um dos principais ácidos fenólicos, este composto é formado por um anel aromático, três grupamentos hidroxílicos e por um ácido carboxílico (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015). Como a atividade antioxidante de uma molécula aumenta com a elevação do número de grupos hidroxílicos ligados ao anel aromático, o ácido gálico exibe a mais alta capacidade antioxidante entre diversos polifenóis (GALATO *et al.*, 2001). As características físico-químicas deste composto são apresentadas na Tabela 3.

O ácido gálico é encontrado naturalmente em castanhas, arbustos, cascas de carvalho, chá verde, cascas de maçã, uvas e vinho (NATARAJAN; MADHAN; TIKU, 2015; YOON *et al.*, 2013). É geralmente isolado através da adição de solvente como água, etanol e metanol e pode ser quantificado por diversas técnicas, como espectroscopia (com absorção máxima em 272,5 nm) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo este último o método mais utilizado (FERNANDES, FELIPE HUGO ALENCAR; SALGADO, 2016).

Tabela 3 – Características físico-químicas do ácido gálico (FERNANDES, FELIPE HUGO ALENCAR; SALGADO, 2016).

Característica	Valor
Massa molar	170,12 g/mol
Ponto de fusão	210 °C
Temperatura de decomposição	235-240 °C
pK _a *	4,4
Densidade	1,69 kg/L (20 °C)
Log P**	0,70 (20 °C)
Solubilidade em água	12 mg/mL (a 20 °C)

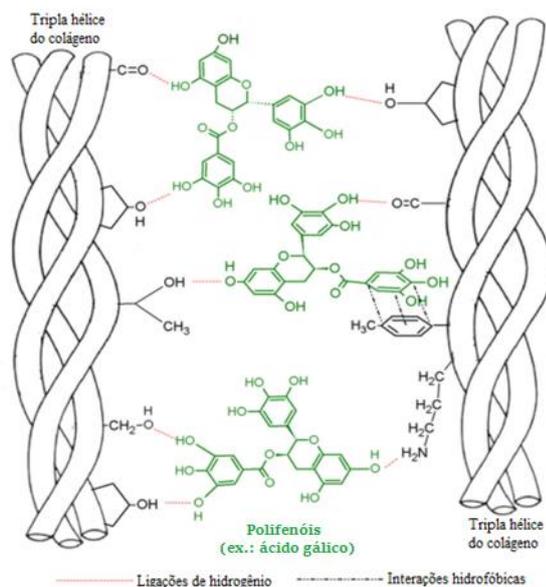
* logaritmo negativo da constante de acidez, K_a

** P: coeficiente de partição em sistema n-octanol/água

Apesar de pouco empregado na terapia de doenças relacionadas ao tecido cartilaginoso, este polifenol apresenta características atraentes relacionadas a este tecido. O AG pode interagir com o colágeno da cartilagem através de associações hidrofóbicas e por ligações de hidrogênio, reticulando e estabilizando essas matrizes, o que diminui a degradação enzimática do colágeno por metaloproteinases, protegendo, assim, a cartilagem da degradação (Figura 11) (MADHAN;

MURALIDHARAN; JAYAKUMAR, 2002; NATARAJAN; MADHAN; TIKU, 2015). Esta atividade protetora poderia contribuir na redução da progressão da doença ou, até mesmo, ter papel relevante em sua prevenção.

Figura 11 – Representação esquemática das interações entre o colágeno e polifenóis, como o ácido gálico.



Fonte: adaptado de Natarajan *et al.*, 2015.

Krishnamoorthy e colaboradores (2014) analisaram o efeito do ácido gálico (2,5 $\mu\text{mol/L}$) na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e de N-hidroxissuccinimida (NHS) em *scaffold* de colágeno. As caracterizações deste *scaffold* indicaram que o tratamento com ácido gálico juntamente com EDC e NHS melhoraram sua integridade estrutural e estabilidade, devido a este tratamento inibir a ação da colagenase na degradação do colágeno. Isso ocorre devido ao centro hidrofóbico das moléculas de ácido gálico provavelmente se ligar com as regiões hidrofóbicas da molécula de colágeno, expondo os grupamentos hidroxílicos e de ácido carboxílico às moléculas que se encontram ao redor do colágeno, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de intumescimento da matriz, assim como sua biocompatibilidade e adesão celular (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2014).

Wen *et al.* (2015) comprovaram o efeito de proteção exercido pelo ácido gálico na osteoartrite quando estudaram condrócitos extraídos de coelhos expostos a moléculas que induzem a osteoartrite (AGEs). Os pesquisadores detectaram redução de colágeno tipo II e

agrecanos, entre outros, e aumento de síntese de óxido nítrico e ciclooxigenase-2 (COX-2), o que indica que a osteoartrite foi induzida. Porém, quando os condrócitos foram tratados com o 80 $\mu\text{mol/L}$ de ácido gálico previamente à exposição aos AGEs, não ocorreram mudanças significativas dos componentes supracitados, confirmando a ação de proteção do ácido gálico (WEN *et al.*, 2015).

Além de proteger a cartilagem, o ácido gálico apresenta outras atividades farmacológicas, como anti-cancerígena, anti-HIV, anti-ulcerugênica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica, entre outras (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015; CHIA *et al.*, 2010; COUTO *et al.*, 2013; JUNG; BAE; JEONG, 2013; KRATZ *et al.*, 2008; KUBO *et al.*, 2002; KUBO; XIAO; FUJITA, 2001). Apesar destas características promissoras do ácido gálico em diversas enfermidades, nenhum estudo incorporando o ácido gálico em hidrogéis termorresponsivos para o tratamento da osteoartrite foi detectado na literatura até o momento.

Outro ponto relevante a se analisar seria a interação entre os fármacos. Dado que os mecanismos de ação de cada agente bioativo diferem entre si, supõe-se que os mesmos possam ter um efeito aditivo e, quiçá, sinérgico, ampliando as ações anti-inflamatórias e de reticulação do tecido cartilaginoso. Nenhum estudo empregando os três fármacos em conjunto foi encontrado na literatura, o que também caracteriza mais um aspecto inovativo do trabalho. Entretanto, Elron-Gross e colaboradores (2009) produziram vesículas lipídicas contendo colágeno ou ácido hialurônico acoplados às suas superfícies, visando à encapsulação de diclofenaco e dexametasona associados e na forma isolada. Os efeitos terapêuticos dessas vesículas foram estudados em ratos com osteoartrite induzida. O tratamento mais eficaz foi a combinação de ambos os medicamentos na vesícula com ácido hialurônico como ligante superficial, sendo que uma dose única reduziu o volume de inflamação para 12,9% da inicial, concluindo-se que esta é uma alternativa viável de tratamento da osteoartrite (ELRON-GROSS *et al.*, 2009).

Um outro grupo explorou também a combinação destes mesmos fármacos *in vivo*. Bamgbose e colaboradores (2005) compararam a associação dos fármacos e a aplicação isolada dos mesmos na diminuição da dor e do inchaço após remoção do terceiro molar de pacientes. Os autores verificaram que a administração concomitante de dexametasona e diclofenaco foi significativamente superior ao diclofenaco isolado no alívio da dor e do edema facial após 48 horas no pós-operatório (BAMGBOSE *et al.*, 2005).

Em síntese, a combinação dos agentes bioativos apresenta bom potencial terapêutico, sendo esperados resultados benéficos de sua combinação para o tratamento da osteoartrite.

2.8 Considerações Finais

Com base nos temas abordados nesta revisão bibliográfica e na experiência prévia dos laboratórios nos quais foi desenvolvido neste trabalho, que inclui o desenvolvimento de biomateriais a partir de polímeros derivados de fontes naturais, como quitosana e goma xantana, dentre outros, e também a área de engenharia de tecido cartilaginoso, ósseo, vascular e de periósteo, verificou-se a necessidade da formulação de novos *scaffolds* com propriedades que auxiliem na restauração do tecido cartilaginoso.

Considerando ainda a necessidade da produção hidrogéis injetáveis inovadores para tratamento da osteoartrite, conforme apontado pelo professor reumatologista Ibsen Bellini Coimbra do Laboratório de Biologia Molecular de Cartilagem (LABIMOCA), da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pressupõe-se que hidrogéis compostos de metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana contendo os agentes bioativos diclofenaco de sódio, dexametasona e ácido gálico possam ter apreciável impacto no tratamento da osteoartrite.

Assim, no presente trabalho foi proposto analisar o potencial uso de hidrogéis de metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana contendo os fármacos diclofenaco de sódio, dexametasona e ácido gálico destinados ao uso como dispositivos de liberação controlada e como suportes de crescimento e desenvolvimento celular para a engenharia do tecido cartilaginoso, áreas estas nas quais são observadas lacunas na literatura até o momento. Algumas características relevantes de cada polímero e agente bioativo se encontram sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características relevantes de cada constituinte das formulações propostas no âmbito da engenharia do tecido cartilaginoso.

Componentes do hidrogel injetável		Características favoráveis para cartilagem
Biopolímero	Metilcelulose	Polímero biocompatível com propriedades termorresponsivas.
	Goma xantana	Seu uso auxilia o tratamento de lesões do tecido cartilaginoso; tem propriedades reológicas de interesse para a aplicação pretendida; biocompatível.
	Carboximetil quitosana	Mimetiza os glicosaminoglicanos da cartilagem; biocompatível; hidrossolúvel em pH neutro.
Agente bioativo	Ácido gálico	Reticula o tecido cartilaginoso.
	Dexametasona	Anti-inflamatório usualmente utilizado para diminuição da dor e inflamação da osteoartrite.
	Diclofenaco de sódio	Anti-inflamatório oral usualmente utilizado para diminuição da dor e inflamação da osteoartrite.
Célula-tronco	DPSC (célula-tronco da polpa dentária)	Células-tronco humanas com alta plasticidade; biocompatíveis até a geração dos avós; linhagem padronizada.
	Célula-tronco da medula óssea porcina	Apresentam alta comparabilidade com as células humanas; menor custo e fácil obtenção.
Fator de diferenciação	Kartogenina	Fator de diferenciação introduzido mais recentemente na literatura; diferencia as células-tronco em condrócitos.
	TGF- β	Fator de diferenciação considerado como "padrão ouro" utilizado para a diferenciação de células-tronco em condrócitos.

3. OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo central a obtenção de hidrogéis à base de metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana contendo ou não fármacos para o cultivo de células-tronco mesenquimais dentárias com o intuito de restauração do tecido cartilaginoso.

Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- a) determinar as proporções de metilcelulose, goma xantana, carboximetil quitosana e glicerol na formulação, visando à obtenção de biomateriais homogêneos e que apresentem gelificação entre 22 e 37 °C;
- b) avaliar o efeito da incorporação por adição direta dos agentes bioativos dexametasona, diclofenaco de sódio e ácido gálico aos hidrogéis selecionados como mais promissores e determinar a cinética de liberação dos fármacos com vistas a selecionar a(s) formulações capazes de liberar os compostos de forma sustentada;
- c) analisar a morfologia, a estabilidade, a capacidade de absorção, as propriedades mecânicas, a citotoxicidade dos hidrogéis e as interações entre os polímeros e os fármacos;
- d) avaliar o desempenho dos hidrogéis como *scaffolds* no cultivo de células-tronco mesenquimais e seus efeitos na proliferação e diferenciação celular em condrócitos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para a produção do hidrogel foram utilizados os polímeros goma xantana de *Xanthomonas campestris* (viscosidade de 800–1200 cPs em solução aquosa a 1% (m/v), Sigma-Aldrich), metilcelulose (viscosidade de 15 cPs, massa molar de 14 kDa, DS 1.5-1.9, Dow Química) e carboximetil quitosana (CAS 83512-85-0, Santa Cruz Biotechnology). Os fármacos ácido gálico, dexametasona e diclofenaco de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As células-tronco dentárias foram cedidas pela empresa R-Crio, que por sua vez as obteve a partir de uma amostra padronizada adquirida da empresa Lonza, correspondente ao código de produto PT-5025, lote 0000361150, e as armazenava em criotubos em nitrogênio líquido em banco de células próprio. As células apresentavam origem de linhagem já estabelecida e caracterizada pela empresa Lonza. Todos os reagentes utilizados apresentaram, no mínimo, qualidade analítica certificada. A água utilizada nos ensaios foi deionizada em sistema Milli-Q (Millipore).

4.2 Métodos

Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados em, pelo menos, triplicata, principalmente no Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides (LEBC) e no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Parte dos ensaios biológicos foram realizados no *Trinity College Dublin* (TCD), Dublin, Irlanda, durante período sanduíche de 8 meses financiado pela CAPES, no *Trinity Centre for Bioengineering* (TCBE), sob supervisão do Professor Doutor Daniel J. Kelly.

4.2.1 Preparação dos hidrogéis termosensíveis de metilcelulose, xantana e carboximetil quitosana

As formulações de hidrogéis foram inicialmente baseadas no trabalho de Liu e Yao (2015), em que formulações com 8 a 12% (m/v) de metilcelulose e goma xantana nas proporções de 1 a 3% (m/v) foram analisadas. No presente trabalho, estas formulações foram acrescidas de glicerol e combinadas com carboximetil quitosana em diferentes proporções. Somente as formulações que contêm a goma xantana foram acrescidas de glicerol,

primordialmente para facilitar sua dispersão na mistura, levando-se em consideração um limite de toxicidade do mesmo de 20% (v/v).

Todos os polímeros foram dissolvidos em PBS 1x, uma vez que este tampão apresenta pressão osmótica adequada e não é tóxico às células. Para a obtenção dos hidrogéis, cujas formulações estão indicadas na Tabela 5, primeiramente foram preparadas soluções concentradas, denominadas soluções estoque, dos polímeros metilcelulose a 15% (m/v) e de carboximetil quitosana a 10% (m/v) em PBS.

Tabela 5 – Descrição das formulações dos hidrogéis desenvolvidos.

Formulação	Composição (%)			
	Metilcelulose (m/v)	Goma xantana (m/v)	Carboximetil quitosana (m/v)	Glicerol (v/v)
1) M5X1Q1-G10	5	1	1	10
2) M5X2Q2-G10	5	2	2	10
3) M5X1Q2-G10	5	1	2	10
4) M5X2Q1-G10	5	2	1	10
5) M8X1Q1-G10	8	1	1	10
6) M8X2Q2-G10	8	2	2	10
7) M8X1Q2-G10	8	1	2	10
8) M8X2Q1-G10	8	2	1	10
9) M10X1Q1-G10	10	1	1	10
10) M10X2Q2-G10	10	2	2	10
11) M10X1Q2-G10	10	1	2	10
12) M10X2Q1-G10	10	2	1	10
13) M10X2-G10	10	2	-	10
14) M10Q2	10	-	2	-
15) X2Q2-G10	-	2	2	10
16) M10X0,5Q0,5-G10	10	0,5	0,5	10
17) M8X0,5Q0,5-G10	8	0,5	0,5	10
18) M5X0,5Q0,5-G10	5	0,5	0,5	10
19) M10X0,5Q0,5-G5	10	0,5	0,5	5
20) M8X0,5Q0,5-G5	8	0,5	0,5	5
21) M10Q2	10	-	2	-
22) M10Q1	10	-	1	-
23) M8Q2	8	-	2	-
24) M8Q1	8	-	1	-
25) M10X1-G5	10	1	-	5
26) M10X2-G5	10	2	-	5

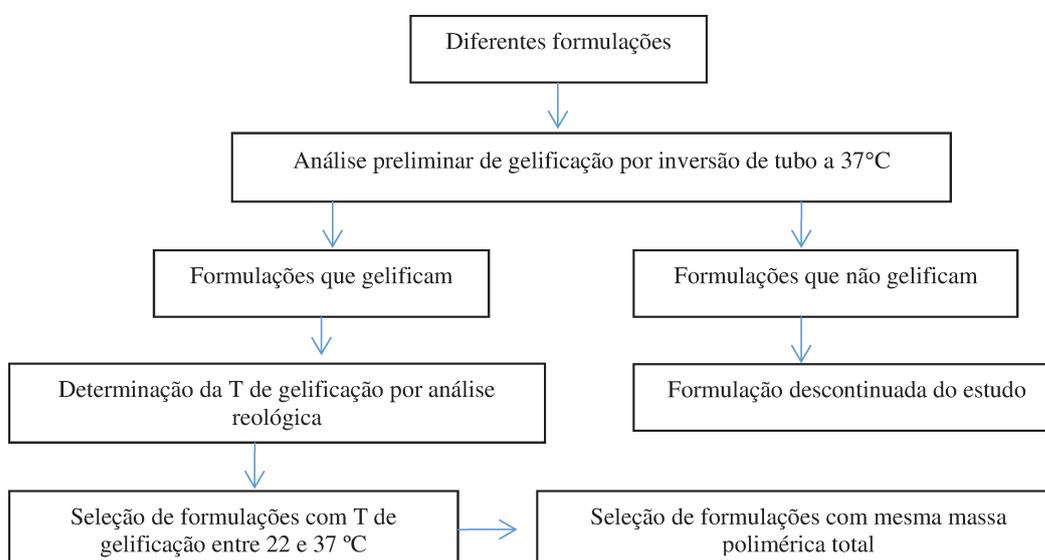
Para a preparação de 20 mL de metilcelulose a 15% (m/v), foram adicionados 15 mL de PBS a 3 g do polímero e esta solução foi homogeneizada através de agitação vigorosa. Em seguida, a solução foi mantida a 4 °C por, aproximadamente, 24 h para completa solubilização e o volume foi completado com PBS para 20 mL. Já para a preparação da solução estoque de carboximetil quitosana a 10% (m/v), foram dissolvidos 2 g do polímero em 15 mL de PBS sob agitação vigorosa e, após solubilização, o volume foi completado com PBS para 20 mL.

As concentrações de metilcelulose foram escolhidas com base na literatura, a qual reporta que, em PBS, a temperatura de gelificação da metilcelulose de 15 cPs é próxima da temperatura fisiológica nas concentrações testadas. Como a goma xantana apresenta alta viscosidade mesmo em baixas proporções em soluções aquosas, foram testadas concentrações entre 0,5 e de 2%. Mesmo nessas concentrações, foi necessário inicialmente dispersar a goma em glicerol sob intensa agitação.

Feito isso, adicionava-se as soluções de PBS, metilcelulose e de carboximetil quitosana (exatamente nesta ordem) para obtenção das devidas concentrações dos três polímeros e agitava-se em vortex. As concentrações de carboximetil quitosana foram baseadas nas concentrações da goma xantana, com o intuito de se obter proporções similares para que os resultados de um não se sobressaíssem em relação ao outro. Em seguida, os hidrogéis eram homogeneizados em vortex a 4 °C e centrifugados a 3500 rpm durante 5 min para a remoção de bolhas, quando necessário.

O fluxograma apresentado na Figura 12 sumariza o desenvolvimento dos hidrogéis e os critérios de seleção das formulações finais utilizadas no presente trabalho.

Figura 12 – Fluxograma do desenvolvimento e critérios de seleção das formulações.



4.2.2 Esterilização das formulações de hidrogel selecionadas

Todas as formulações foram esterilizadas em solução por calor úmido por 15 min, 121 °C e 1 atm. O fármacos foram adicionados posteriormente em fluxo laminar, após filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore).

4.2.3 Análise da gelificação dos hidrogéis por inversão de tubo

Para uma primeira triagem da eficácia das formulações, avaliou-se se as mesmas se mostravam fluidas a 4 °C e gelificadas a 37 °C. Para isso, a temperatura de transição sol-gel foi avaliada pelo método qualitativo de inversão de tubo. Neste método, supõe-se que uma amostra com um limite de elasticidade (gel) não fluirá, enquanto que uma amostra viscosa, mas não elástica (sol), apresentará fluxo apreciável (THIRUMALA; GIMBLE; DEVIREDDY, 2013).

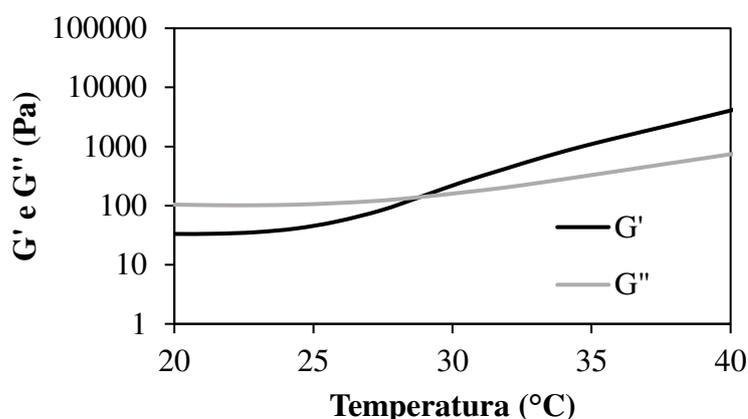
Para a execução desta etapa, incubou-se as formulações a 37 °C por 30 min e em seguida inverteu-se os tubos para verificar se as amostras ainda fluíam. Foram registradas imagens fotográficas de todas as formulações em temperaturas abaixo e a 37 °C. As formulações que apresentaram gelificação foram submetidas ao estudo reológico.

4.2.4 Estudo reológico

Para determinar a temperatura exata de gelificação dos hidrogéis, foi realizada a análise reológica, técnica amplamente utilizada para tal finalidade. As amostras foram submetidas a variação de temperatura compreendida entre 15 e 45 °C, com taxa de aquecimento de 1 °C/min, em reômetro HAAKE MARS III (Thermo Fisher) de geometria cone-placa (LIU, ZHIJIA; YAO, 2015). O ângulo utilizado foi de 2°, gap de 0,105 mm, tensão de 5 Pa e frequência fixa de 10 rad/s (LIU, ZHIJIA; YAO, 2015).

A temperatura de gelificação das formulações foi determinada a partir das curvas de módulo elástico (G') e módulo de perda (G''), sendo igual à condição em que os módulos se interceptavam, conforme ilustrado na Figura 13. Com o G' se tornando maior que o G'' , o comportamento elástico, característico da formação de gel, predomina sobre o comportamento viscoso (líquido), o que indica a gelificação da solução (KREMER; RICHTERING, 2009).

Figura 13 – Curvas típicas de G' e G'' . A temperatura de gelificação da solução polimérica corresponde ao ponto onde as curvas se cruzam.



4.2.5 Teste de citotoxicidade direta de diferentes concentrações dos fármacos ácido gálico, dexametasona e diclofenaco de sódio

Devido aos efeitos anticancerígenos do ácido gálico, este fármaco pode apresentar citotoxicidade em células saudáveis de maneira dependente da dose. Assim, torna-se necessário o estudo do ácido gálico em relação a citotoxicidade às células-tronco da polpa dentária utilizadas no presente trabalho. As concentrações testadas foram baseadas em estudos que mostraram as concentrações eficazes do ácido gálico para o tratamento da osteoartrite (NATARAJAN; MADHAN; TIKU, 2015; YOON *et al.*, 2013).

Já em relação aos demais fármacos, foi realizado o mesmo estudo de citotoxicidade ainda que a literatura levantada não indicasse citotoxicidade nas faixas de concentração testadas, uma vez que nenhum artigo consultado utilizou o mesmo tipo celular do presente trabalho. As concentrações testadas foram baseadas em estudos prévios, como o de Elron-Gross (2009), já citado na revisão da literatura. Neste estudo, os pesquisadores demonstraram que em baixas concentrações, na ordem de nmol/L, a dexametasona já apresenta efeitos benéficos no tratamento da osteoartrite. Os autores testaram concentrações até 100 $\mu\text{mol/L}$, relatando seus diferentes efeitos. Devido ao fato da dexametasona apresentar elevado custo, em torno de R\$ 2750/g (Sigma), optou-se por testar nos hidrogéis a mesma concentração máxima do referido estudo. Como os efeitos do diclofenaco e da dexametasona são de certa forma sinérgicos, foram testadas as mesmas concentrações para ambos os fármacos.

Para a realização do ensaio, primeiramente foram adicionadas 25.000 células por poço em placas de 96 orifícios, as quais foram incubadas em estufa por 24 h e 5% de CO_2 para adesão celular (YOON *et al.*, 2013). Após este período, foram retirados os sobrenadantes e adicionadas

as diferentes concentrações de fármacos dissolvidos em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, as quais encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentrações dos fármacos testadas no ensaio de citotoxicidade para a determinação dos níveis não citotóxicos.

Fármacos	Concentrações (µmol/L)						
Ácido Gálico	0,1	1	10	100	200	500	1000
Dexametasona	1	10	100	-	-	-	-
Diclofenaco de Sódio	1	10	100	-	-	-	-

Após 24 e 48 h de incubação com os fármacos, estes foram aspirados e substituídos por 100 µL de meio de cultivo e 10 µL de solução de MTT a 5 mg/mL em PBS. As placas foram incubadas novamente em estufa durante 3 h e, após este período, a solução foi removida e foram adicionados 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) por poço para dissolver os cristais de formazan, formados em decorrência da atividade mitocondrial das células viáveis. A absorbância foi determinada a 560 nm em espectrofotômetro de placas de múltiplos poços (Thermo Scientific, Multiskan FC) (YOON *et al.*, 2013).

4.2.6 Produção dos hidrogéis contendo fármacos e análise da cinética de liberação

Para a produção dos hidrogéis contendo, em conjunto, ácido gálico, diclofenaco de sódio e dexametasona, foram preparadas soluções estoque dos fármacos na concentração de 10 mg/mL em água para o ácido gálico e diclofenaco de sódio, e em DMSO para a dexametasona. As soluções foram esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm (membrana de PVDF para soluções à base de água (GVS) e membrana de PTFE para DMSO (GVS)). Em seguida, foram adicionados os volumes necessários para obtenção de hidrogéis estéreis com 100 µmol/L de diclofenaco de sódio e de dexametasona e de 200 µmol/L de ácido gálico, de forma concomitante.

Para a execução do ensaio de liberação controlada, os hidrogéis foram aliqüotados em 1 mL em molde cilíndrico (diâmetro de 2,1 cm) e incubados a 37 °C por 30 min para gelificação. Em seguida, os hidrogéis foram retirados do molde e transferidos para placas de 6 poços. Foram adicionados 2 mL de PBS em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C. Em períodos pré-determinados, os sobrenadantes foram retirados e analisados, sendo o volume de PBS

completamente renovado a cada ponto analisado (AHEARNE; KELLY, 2013; QI *et al.*, 2016), uma vez que a renovação do líquido sinovial da articulação ocorre a cada 2 h ou menos (BÉDOUET *et al.*, 2013).

O diclofenaco de sódio e a dexametasona foram quantificados por HPLC. Para tal, 2 mL das amostras dos sobrenadantes foram previamente filtrados em membrana de PVDF com tamanho de poro de 0,45 µm (GVS). Para a análise por HPLC, foi desenvolvida uma metodologia específica para a quantificação de diclofenaco de sódio e dexametasona em uma mesma amostra. Detalhes desta metodologia estão indicados na Tabela 7. O método apresentou dois picos de absorbância distintos para cada fármaco, sendo as concentrações de cada um obtidas de forma isolada.

Para quantificação do ácido gálico, utilizou-se o método de Folin Ciocalteu. O volume de 100 µL de amostra era diluído com 500 µL de água ultrapura e 50 µL do reagente de Folin Ciocalteu (Sigma-Aldrich, F9252) eram adicionados e homogeneizados, sendo esta solução final incubada por 5 min, na ausência de luz e em temperatura ambiente. Em seguida, eram adicionados 200 µL de carbonato de sódio a 15% (m/v) e o conjunto era incubado por mais 30 min nas mesmas condições. A absorbância foi analisada em seguida a 757 nm.

Tabela 7 – Dados da metodologia de HPLC aplicada para a quantificação de diclofenaco de sódio e dexametasona por detecção.

Coluna	Fase Móvel	Proporção (v/v)	Vazão (mL/min)	Volume Injeção (µL)	UV-Vis (λ nm)	Tempo Injeção (min)
Aclaim C18	Acetonitrila/Água:ácido acético (0,2% (v/v))	50/50	1	20	240	24

O mecanismo de liberação dos fármacos foi investigado ajustando-se o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas aos dados obtidos (COSTA, PAULO; SOUSA LOBO, 2001; KORSMEYER *et al.*, 1983), segundo a seguinte equação:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Equação 1})$$

onde M_t e M_∞ são as massas absolutas acumuladas de droga liberadas no tempo t e no tempo infinito, respectivamente; k é uma constante característica do veículo, dependente de sua estrutura e geometria e n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação da droga.

Embora haja outros modelos disponíveis na literatura para a mesma finalidade, optou-se por utilizar o de Korsmeyer-Peppas por ser mais generalista no que se refere à geometria do material em análise e por ser considerado um modelo diagnóstico dos mecanismos predominantes de liberação.

4.2.7 Aspecto e morfologia da superfície dos hidrogéis

A morfologia dos hidrogéis foi avaliada macroscopicamente (utilizando uma câmera fotográfica (Zenfone 3 Max, ASUS) e microscopicamente (utilizando microscópio eletrônico de varredura (Leo 440i, LEO Electron)). Para as análises de microscopia eletrônica de varredura os hidrogéis foram previamente fixados em paraformaldeído 4% (v/v) em PBS por 18 h, liofilizados, fraturados, aderidos em suporte adequado e recobertos com ouro (QI *et al.*, 2016). Este método de fixação foi utilizado pelo fato de não ser possível a utilização direta da abordagem do ponto crítico, visto que o hidrogel não resistiria às condições de processamento das amostras. Para a liofilização, a mesma massa de cada formulação de hidrogel foi colocada em eppendorfs de 2 mL, centrifugada, fixada, congelada por aproximadamente 10 min em vapor de nitrogênio líquido e liofilizadas (LIOTOP; L101) por 72 h em vácuo de 720 mmHg, a -41 °C para a retirada do solvente por sublimação.

4.2.8 Capacidade de absorção e perda de massa dos hidrogéis

A capacidade de absorção e perda de massa foram estudadas conforme protocolo descrito por Tang e colaboradores (2012). Amostras de aproximadamente 0,1 g de hidrogel foram pesadas, centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e incubadas por 30 min a 37 °C. Após verificada a gelificação das amostras, estas foram imersas em água, PBS ou meio de cultura DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e incubadas novamente em estufa a 37 °C (TANG, YAJUN *et al.*, 2012). Após 24 h, as massas finais dos materiais intumescidos (M_f) foram medidas e comparadas com o valor inicial (M_0) para a determinação da capacidade de absorção (A) segundo a Equação 2.

$$A = \frac{(M_{fi} - M_0)}{M_0} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Para a determinação da perda de massa (P_m) dos hidrogéis em termos da massa solubilizável, inicialmente um conjunto de amostras do material foi liofilizado e pesado ($M_{inicial}$). Para a liofilização do material, as amostras foram primeiramente congeladas em nitrogênio líquido e em seguida liofilizadas (LIOTOP; L101) durante 72 h com vácuo de 720 mmHg e temperatura de -41 °C. Em seguida, outro conjunto foi exposto ao PBS, água e ao meio de cultura DMEM suplementado, a 37 °C, por períodos pré-determinados. Após os períodos pré-estabelecidos, foram coletadas amostras para liofilização e as massas remanescentes (M_{final}) foram analisadas. A perda de massa foi determinada pela Equação 3:

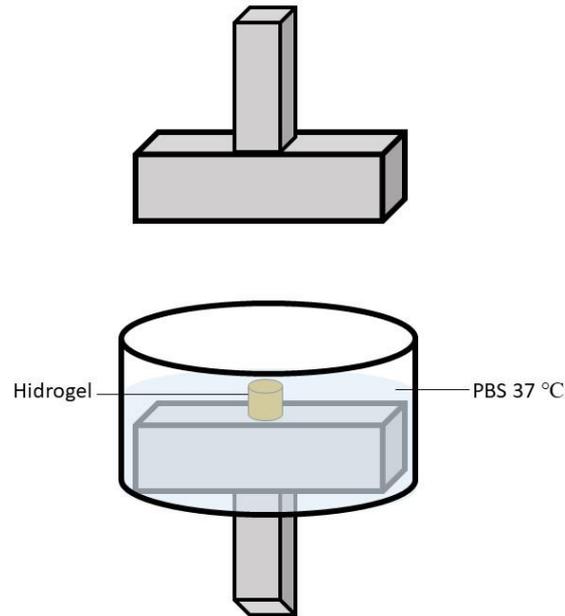
$$P_m = \frac{(M_{inicial} - M_{final})}{M_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.2.9 Propriedades mecânicas dos hidrogéis

Uma das formas de se estudar propriedades mecânicas dos biomateriais produzidos para restauração do tecido cartilaginoso é através de testes de compressão não-confinado. Nestes testes, o hidrogel sofre uma compressão entre duas placas planas e, após a amostra atingir o equilíbrio, os módulos dinâmico e de equilíbrio podem ser calculados.

Para executar este teste, primeiramente amostras dos hidrogéis com 285 μ L de volume total e área de seção transversal de 19,6 mm foram moldadas empregando-se placas de poliestireno de 48 poços, a 50 °C por 10 min. Em seguida, amostras foram coletadas de cada poço através de um *punch* de 5 mm de diâmetro. Essas amostras foram analisadas por meio de testes de compressão utilizando um texturômetro Zwick/Roell Z2.5, com célula de carga de 5 N (AHEARNE; KELLY, 2013). Os hidrogéis foram imersos em PBS a 37 °C ao longo do teste, similarmente ao demonstrado pela Figura 14.

Figura 14 – Esquema do texturômetro com dispositivo de compressão imerso em líquido.



O módulo de equilíbrio (ME) foi determinado comprimindo os hidrogéis a uma taxa de $1 \mu\text{m/s}$ até que a deformação (ε) de 10% fosse atingida, a qual foi mantida até que os hidrogéis estivessem completamente relaxados. As respostas típicas destes ensaios apresentam o perfil mostrado na Figura 15a.

A força paralela ao eixo x na região de platô é chamada de força de equilíbrio. A partir desse gráfico, foi possível calcular a tensão de equilíbrio (σ) através da equação 4.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (\text{Equação 4})$$

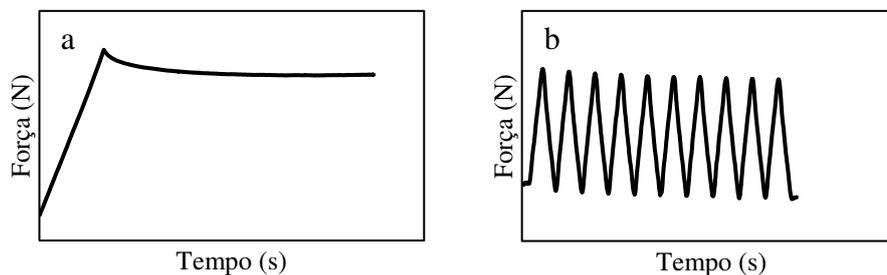
onde F é a força de equilíbrio e A é a área da seção transversal da amostra comprimida.

Obtida a tensão, foi possível calcular o módulo de equilíbrio (ME), conforme equação 5.

$$ME = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (\text{Equação 5})$$

O módulo dinâmico (MD) foi medido se aplicando deformação cíclica de 1% a 1 Hz por 10 ciclos, obtendo-se gráficos conforme observado na Figura 15b.

Figura 15 – Perfil gráfico típico obtido na análise do módulo de equilíbrio (a) e na determinação do módulo dinâmico (b).



Através do gráfico, foi possível determinar a força necessária para que fosse atingida a deformação de 1%. O módulo dinâmico foi calculado pela equação 6 (AHEARNE; KELLY, 2013).

$$MD = \frac{\Delta F}{\varepsilon} \cdot A \quad (\text{Equação 6})$$

onde ΔF é a diferença entre a força mínima e máxima do último ciclo, A é a área da seção transversal da amostra comprimida e ε a deformação de 1%.

4.2.10 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas para avaliar as interações existentes entre os polímeros e os fármacos. Os espectros de transmissão (Nicolet 6700, Thermo Scientific) foram registrados na faixa de 4000-500 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} (SÁ-LIMA *et al.*, 2011). As medidas foram feitas no modo transmitância, utilizando o acessório *snap-in baseplate* (método KBr).

Também foi analisada uma amostra composta por 0,5% (m/v) de carboximetil quitosana e 200 $\mu\text{mol/L}$ de ácido gálico em PBS, visando investigar as interações entre ambos. Após o preparo, esta amostra, por se apresentar pouco concentrada, foi congelada em ultra freezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 12 horas e liofilizada durante 45 horas, com pressão final de 100 μmHg . Transferiu-se a amostra para o almofariz de ágata e adicionou-se KBr para a preparação da pastilha prensada, a qual foi analisada em seguida.

4.2.11 Citotoxicidade indireta dos hidrogéis

A análise da citotoxicidade indireta dos hidrogéis às células-tronco mesenquimais de

polpa dentária foi realizada pelo ensaio colorimétrico de brometo de (3-[5,4-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MTT). As DPSCs foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ na presença de extratos dos hidrogéis previamente obtidos por imersão dos mesmos, por 24 e 48 h, nas mesmas condições, em meio de cultura α -MEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino na proporção de 0,1 g de material por mililitro de meio (WESTIN, CECÍLIA B *et al.*, 2017). Como controles de morte e de viabilidade foram utilizados, respectivamente, 50 μ L de DMSO em 50 μ L de meio de cultivo e o próprio meio de cultura livre de extratos. Após o cultivo das células, o sobrenadante foi removido de todos os poços e substituído por 100 μ L de meio de cultivo suplementado fresco e, em seguida, foram adicionados 10 μ L de uma solução de MTT a 5 mg/mL em PBS. As placas foram incubadas novamente em estufa por 2 a 4 h. Após este período, a solução foi removida e foram adicionados 100 μ L de DMSO por poço para dissolver os cristais de formazan, gerados em decorrência da atividade mitocondrial das células viáveis. A absorbância foi determinada a 570 nm em leitor de placas de múltiplos poços (Thermo Scientific, Multiskan FC) (WESTIN, CECÍLIA B *et al.*, 2017).

4.2.12 Citotoxicidade direta dos hidrogéis

A microscopia confocal foi realizada com o intuito de se verificar a citotoxicidade *in vitro* dos hidrogéis quando as células são cultivadas diretamente nos mesmos. Foram utilizados dois corantes de viabilidade, a calceína acetoximetil (CAM) e o homodímero de etídio-1 (EthD-1). A calceína penetra nas células vivas, onde é clivada pelas esterases intracelulares que a convertem em calceína intensamente fluorescente (SANFILIPPO *et al.*, 2011). A calceína clivada é retida dentro das células e produz fluorescência verde nas células vivas. Já as células mortas são coradas em vermelho pelo homodímero de etídio-1, uma vez que estas células apresentam membranas danificadas que permitem a entrada do corante. Dentro das células, o corante se liga aos ácidos nucleicos, produzindo uma fluorescência vermelha brilhante em células danificadas ou mortas (SANFILIPPO *et al.*, 2011).

Para a execução do experimento, as células-tronco foram diretamente cultivadas nos hidrogéis para analisar a citotoxicidade do material. Foram adicionadas 10⁵ células em 100 μ L de cada hidrogel. O conjunto foi cultivado durante 7 dias em meio DMEM contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino e, após decorrido o tempo de cultivo, os hidrogéis foram lavados com PBS, uma vez que a presença de soro pode interferir na fluorescência extracelular devido à hidrólise da calceína. Foi adicionado 1 mL da solução Live/Dead, composta por 4 μ mol/L de EthD-1 e 2 μ mol/L de CAM em meio DMEM sem vermelho de fenol. Os hidrogéis foram incubados por

30 min a 37 °C, lavados três vezes com PBS e analisadas no microscópio confocal (SP8, Leica) no modo *z-stack*, o qual forma imagens tridimensionais em diferentes profundidades no material. Os comprimentos de onda de excitação/emissão para calceína foram 495 nm/515 nm e para EthD-1 foram 495 nm/635 nm.

Para os ensaios biológicos subsequentes, foi selecionado somente um tipo de hidrogel (M10X0,5Q0,5-G5 + F) devido ao elevado número de células necessário para a execução dos testes, em torno de 2×10^7 células totais.

4.2.13 Cultivo de células-tronco humanas de polpa dentária no hidrogel

Primeiramente foi realizado um teste de cultivo das DPSCs diretamente nos hidrogéis em placas de 96 poços. Para tal, o hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 + F foi preparado e esterilizado com 10% a menos do volume total, retirado do volume de PBS. Em seguida, foram aliquoteados 90 µL de hidrogel em torno de 4 °C em placas de 96 poços, sendo as placas centrifugadas a 3500 rpm, 4 °C, durante 20 min (Eppendorf, 5804 R) para a remoção de bolhas, quando necessário.

Preparou-se uma suspensão de células (13ª passagem) na concentração de 10^6 células/mL e 10 µL desta suspensão foram adicionados à superfície do hidrogel na placa. A mistura foi gentilmente homogeneizada com a própria ponteira da micropipeta através de movimentos circulatorios, sem sucção, com intuito de não gerar bolhas no sistema. O conjunto foi incubado a 37 °C por 30 min para que a mistura gelificasse e, em seguida, foram adicionados 200 µL de meio de cultivo condrogênico em cada poço, com composição descrita a seguir.

Foram comparados os fatores de diferenciação condrogênica TGF-β3 e kartogenina. A base dos dois tipos de meios condrogênicos, chamada de meio quimicamente definido (CDM), consistia em DMEM/GlutaMAX suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (todos os três da GIBCO, Invitrogen), 100 µg/mL de piruvato de sódio, 40 µg/mL de L-prolina e 1,5 mg/mL de albumina de soro bovino, 1% (v/v) de insulina-transferrina-selênio (ITS 100X), 4,7 µg/mL de ácido linoleico, 50 µg/mL de ácido L-ascórbico-2-fosfato e 100 nmol/L de dexametasona (todos os demais da Sigma-Aldrich) (AHEARNE; KELLY, 2013). Os fatores de diferenciação foram adicionados no meio base na concentração de 10 ng/mL de TGF-β3 ou de 100 µmol/L de kartogenina. Como controle negativo de diferenciação celular no hidrogel, foram cultivados conjuntos em meio DMEM/GlutaMAX

com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Outro controle consistiu no hidrogel processado nas condições supracitadas, porém na ausência de células (JOHNSON *et al.*, 2012).

Os sistemas foram cultivados por 28 dias com trocas de meio realizadas a cada 2 ou 3 dias. Finalizado o tempo de cultivo, os sistemas foram quantificados em relação a GAGs e DNA, sendo que previamente a estas análises foi necessário realizar a digestão das amostras com papaína para expor as moléculas. As metodologias utilizadas para este fim estão descritas a seguir. Além disso, foram realizadas caracterizações citoquímicas, também descritas adiante.

4.2.14 Análises quantitativas de diferenciação celular

4.2.14.1 Digestão dos hidrogéis com papaína

Após o cultivo das células-tronco nos hidrogéis, os componentes proteicos foram diretamente digeridos com papaína para a liberação de DNA das células e de glicosaminoglicanos retidos nos hidrogéis para o meio. Os conjuntos hidrogel+células foram adicionados em tubos de 2 mL rosqueáveis contendo 125 µg/mL de papaína em tampão PBE (0,1 mol/L de tampão fosfato de sódio, 5 mmol/L de Na₂EDTA, 10 mmol/L de L-cisteína, pH 6,5) por 18 h, 60 °C e 10 rpm. Os hidrogéis foram, em seguida, resfriados a 4 °C, homogeneizados em vortex e centrifugados a 4 °C para remoção de partículas. Feito isso, foram realizadas as caracterizações bioquímicas, que incluem quantificação de DNA e GAGs, as quais são apresentadas a seguir (AHEARNE; KELLY, 2013; MESALLATI, 2014).

4.2.14.2 Quantificação de DNA por fluorescência

A quantificação de DNA foi realizada para se verificar a concentração celular nos hidrogéis em diferentes tempos de cultivo. De forma geral, a técnica mais comumente utilizada para a quantificação de ácidos nucleicos é a determinação da absorbância a 260 nm. Todavia, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como a elevada interferência de nucleotídeos, ácidos nucleicos de simples fita e de contaminantes usualmente encontrados em preparações de DNA. Além disso, este ensaio não distingue DNA de RNA e apresenta baixa sensibilidade, em torno de 5 µg/mL (SINGER *et al.*, 1997).

Para contornar estas dificuldades, utilizou-se o kit *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit* (Molecular Probes, Biosciences). Este kit diferencia DNA de RNA, apresenta limite de quantificação de 25 pg/mL e linearidade de até 1000 ng/mL. Esta linearidade é mantida na presença de vários compostos que geralmente contaminam preparações de ácidos

nucléicos, como sais, uréia, etanol, clorofórmio, detergentes, proteínas e agarose (SINGER *et al.*, 1997).

O kit apresenta uma solução padrão de DNA de dupla fita a 100 µg/mL, a qual foi utilizada para preparar a curva padrão, compreendida entre 0 e 200 ng/poço. Cada padrão e amostra digerida foram adicionados em uma placa preta de 96 poços na quantidade de 10 µL e, em seguida, foram adicionados 190 µL de solução de trabalho do corante. Esta solução era composta por 22 mL de tampão TE 1x (200 mmol/L de Tris-HCl, 20 mmol/L de EDTA, pH 7,5) e 55 µL de solução estoque PicoGreen (diluição de 1:400), ambos componentes do referido kit. A placa foi incubada na ausência de luz por 5 min em temperatura ambiente e analisada em espectrofotômetro (Synergy HTX, Biotek) de fluorescência, com excitação a 480 nm e emissão a 520 nm.

4.2.15 Quantificação de glicosaminoglicanos

Com o intuito de verificar a produção de glicosaminoglicanos pelas células, indicando a diferenciação em condrócitos, foi realizada a quantificação destas moléculas pelo ensaio de DMMB (azul de 1,9-dimetilmetileno) (Biocolor Ltd, UK), seguindo as orientações do fabricante. Este corante é um agente cromotrópico de tiazina que exibe uma alteração no espectro de absorção causada pela indução de metacromasia quando ligado a GAG sulfatados, permitindo a detecção rápida deste composto em solução (BARBOSA *et al.*, 2003).

Para a execução do ensaio, primeiramente foi preparada uma curva compreendida entre 0 e 60 µg/mL com a solução padrão de GAG do kit, em tampão PBE. Foram adicionados 100 µL dos hidrogéis digeridos e da curva padrão à 1 mL do corante DMMB. A solução foi homogeneizada por 30 min a 10 rpm e centrifugada em seguida por 10 min a 15.000 xG. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e os *pellets* ressuspendidos em 1 mL do corante de dissociação do kit com auxílio de vortex. Foram adicionados 200 µL dessas soluções em placa de 96 poços a absorvância foi medida no comprimento de onda de 656 nm em espectrofotômetro de placa (Synergy HTX, Biotek) (AHEARNE; KELLY, 2013; MESALLATI, 2014).

4.2.16 Análises citoquímicas dos hidrogéis cultivados com células-tronco mesenquimais e controles

Após o cultivo das células-tronco com os hidrogéis em meio condrogênico, os conjuntos foram preparados para a análise citoquímica. Primeiramente, o sobrenadante dos poços foi descartado

e foram adicionados 2 mL de paraformaldeído a 4% (m/v) para a fixação das células, a 37 °C, durante 30 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 mL de soro fetal bovino aos poços por, aproximadamente, 18 h. Feito isso, os conjuntos de células+hidrogel foram transferidos para moldes e cobertos com meio Tissue-Tek O.C.T. (Fisher Health Care). Os moldes foram congelados por imersão em hexanol resfriado em nitrogênio líquido e desformados no interior do criostato (Microm, HM 525). Foram realizados cortes a -21 °C com 12 µm de espessura, os quais foram coletados em lâminas gelatinizadas (Sigma-Aldrich). As lâminas com os cortes foram coradas com azul de Alcian e hematoxilina e eosina (H&E). O azul de Alcian cora os glicosaminoglicanos de azul, enquanto o H&E cora os núcleos celulares de azul-púrpura e a matriz cartilaginosa de rosa, com aspecto azulado nas áreas de alto teor de proteoglicanos (SCHMITZ *et al.*, 2010). Estas colorações foram realizadas no equipamento Autostainer XL (ST5010, Leica), sendo os protocolos executados pelo equipamento detalhados a seguir.

4.2.16.1 Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para a realização da técnica, as lâminas foram inseridas no Autostainer XL (ST5010, Leica). Primeiramente, as lâminas foram inseridas na estação de aquecimento, onde ficaram por 15 min a 40 °C. As lâminas foram então lavadas por 1 min em água corrente e imersas no corante hematoxilina durante 4 min. Foram mais uma vez lavadas em água corrente por 10 min e imersas em álcool ácido por 7 segundos. Foram novamente lavadas em água corrente por 1 min e imersas na solução do corante eosina (2,5 g de eosina, 50 mL de água destilada, 200 mL de álcool 95% em volume em água purificada e 750 mL de álcool 80% em volume em água purificada) por dois minutos e lavadas em água corrente por 1 min. Por fim, as lâminas foram desidratadas por 2 min em álcool absoluto (99,5 INPM) por duas vezes e retiradas do equipamento para montagem.

4.2.16.2 Azul de Alcian

Conforme descrito no item anterior, as lâminas foram inseridas no Autostainer e colocadas na estação de aquecimento, onde também ficaram por 15 min a 40 °C. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por 1 min e imersas no corante azul de Alcian 1% (m/v) em ácido acético 3% (v/v) por 5 min. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente por 1,5 min e contra-coradas pela solução de safranina 0,1% (m/v) em ácido acético

3% (v/v) por 5 min. O excesso de corante foi retirado através de água corrente por 1 min e as lâminas foram então desidratadas por 2 min em álcool absoluto (99,5 INPM) por duas vezes e retiradas do equipamento para montagem.

Para a montagem, foram adicionadas de 1 a 3 gotas de resina sintética DPX (Sigma) sobre o corte corado e, em seguida, a lâmina foi cuidadosamente comprimida sobre a resina, espalhando-a sobre o corte. As lâminas foram secas em temperatura ambiente por 24 h e analisadas em microscópio óptico.

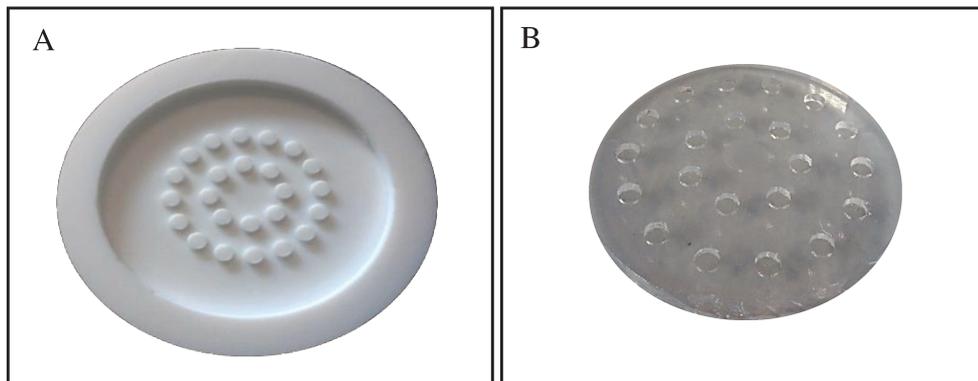
4.2.17 Migração das células DPSCs no hidrogel

Com o intuito de verificar o comportamento celular no hidrogel ao longo do tempo e uma possível migração das células para um ambiente mais favorável, como a agarose, acompanhou-se o cultivo das DPSCs no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 em conjunto com a agarose. Para a execução deste procedimento, adicionou-se 1 mL de agarose a 1% (m/v) em PBS estéril em placas de 6 poços. Após a gelificação da agarose, cortou-se a mesma ao meio com auxílio de uma lâmina estéril, e descartou-se uma das metades do material. Em seguida, adicionou-se 1 mL do hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 com as células-tronco da polpa dentária na concentração de 10^6 células/mL na região sem agarose. Incubou-se o conjunto a 37 °C por 20 min para a gelificação do hidrogel com as células e, em seguida, foram adicionados 2 mL de meio de cultivo DMEM alta glicose suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de estreptomicina e penicilina. Monitorou-se o conjunto ao longo de 10 dias por microscopia óptica (Nikon, TS100), sendo registradas imagens fotográficas (câmera Canon, EOS Rebel T6) diariamente.

4.2.18 Cultivo celular nos hidrogéis em moldes de agarose

Com o intuito de minimizar a perda de células incorporadas ao hidrogel para o meio de cultivo, foi proposto pelo grupo do *Trinity College Dublin* que o conjunto de células + hidrogel fosse confinado no interior de moldes de agarose, os quais foram preparados como negativos de um molde produzido por impressão 3D. Para execução desta etapa, foi inicialmente fabricado um molde positivo que apresentava 24 cilindros de volume de 40 μ L (Figura 16a). Foi preparada uma solução de agarose 1% (m/v) em PBS, sendo o molde e a solução submetidos a esterilização por calor úmido a 121 °C, 1 atm, durante 15 min.

Figura 16 - Molde produzido em impressora 3D (a) e molde negativo de agarose para inserção de hidrogel nos orifícios (b).



Em fluxo laminar, foram adicionados 20 mL de agarose sobre o molde positivo e, após sua gelificação, a agarose foi retirada do molde (Figura 16b) e transferida cuidadosamente para uma placa de Petri estéril. Após a preparação do molde negativo de agarose, células-tronco da medula óssea porcinas foram misturadas com o hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 + F, na concentração final de 4×10^6 células/mL hidrogel. Os poços de agarose foram preenchidos com 40 μ L dessa solução de hidrogel + célula porcina e incubados em estufa a 37 °C por 20 min para permitir a gelificação do conjunto. Posteriormente, foram adicionados rapidamente 10 mL de agarose a 37 °C (monitorada com termômetro de mercúrio estéril) na parte superior do molde para confinar o hidrogel com as células nos orifícios e, após a gelificação, foram adicionados os meios de cultura a cada conjunto.

Conforme já descrito, foi utilizado o meio quimicamente definido básico acrescido dos diferentes fatores de diferenciação. Foram testados o total de quatro grupos de meios de cultura suplementados: um com apenas 1 μ mol/L de kartogenina (Sigma, SML0370), outro com apenas 10 ng/mL de TGF- β 3 (R&D Systems, 243-B3-002), um combinando 1 μ mol/L de kartogenina e 10 ng/mL de TGF- β 3 e um controle negativo (CDM sem adição de fatores de diferenciação). Cada um dos quatro moldes de agarose foi cultivado com 25 mL dos referidos meios.

Como controle positivo de diferenciação, foram preparadas culturas em pellets, também conhecidas como esferóides ou micromass. Para isso, foi preparada uma suspensão de células porcinas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL em DMEM + GlutaMAX suplementado com 10% de SFB. Foram adicionados 500 μ L desta suspensão celular em microtubos estéreis de 1,5 mL, os quais foram centrifugados a 2000 rpm por 5 min, obtendo-se pellets compostos por 250.000 células. Em seguida, a tampa dos microtubos foi perfurada com uma agulha de calibre

de 18 gauge para permitir a troca de gases com o ambiente da incubadora. Após 24 h de incubação, o meio de cada tubo foi removido e 500 µL dos meios condrogênicos ou do meio CDM- foram adicionados lentamente, de forma a não desagregar os esferoides já formados.

Os meios de cultura das estruturas de agarose e dos esferoides foram trocados a cada 3 ou 4 dias, durante 21 dias. Para estas trocas periódicas, preparava-se cada meio condrogênico no mesmo dia, evitando assim uma possível degradação dos fatores de diferenciação.

As amostras do hidrogel foram coletadas em diferentes tempos através de um *punch* de 8 mm estéril. O material coletado foi analisado por meio do ensaio de LIVE/DEAD.

4.2.19 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi efetuada por meio de análises de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, o qual foi utilizado para determinar as diferenças significativas entre as médias, a um nível de confiança de 5% ($p < 0,05$). Para isso, foi utilizado o programa computacional Statistica (versão 7.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação dos hidrogéis termosensíveis de metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana e gelificação por inversão de tubo

Conforme descrito na metodologia, primeiramente preparou-se soluções estoque dos polímeros metilcelulose a 15% (m/v) e de carboximetil quitosana a 10% (m/v) para a obtenção dos hidrogéis. Após a homogeneização das amostras, observou-se que as soluções se encontravam translúcidas e altamente viscosas, conforme o esperado.

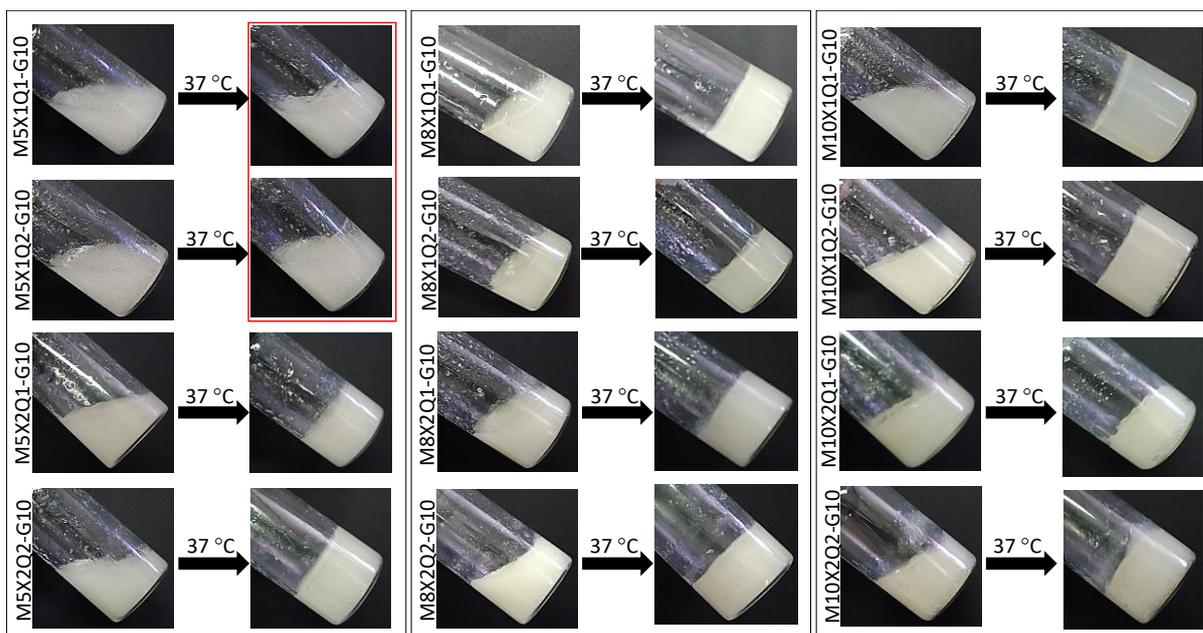
Não foi possível preparar soluções estoque de goma xantana na concentração desejada, uma vez que este polímero apresenta elevada viscosidade já em baixas concentrações. Dessa forma, optou-se por dissolver a goma xantana diretamente nas soluções preparadas com os outros dois polímeros. Porém, a goma não solubilizou de maneira uniforme, provavelmente devido à alta viscosidade já apresentada pelas demais soluções.

De acordo com Sworn e Sas (2009), para uma apropriada hidratação da goma xantana, deve-se, primeiramente, dispersá-la eficientemente. A dispersão inadequada pode resultar na formação de aglomerados que impedem a completa hidratação do polímero. Além da dispersão, a solução de goma xantana deve, idealmente, ser preparada sob altas taxas de agitação. Porém, na ausência de equipamentos apropriados, pode-se realizar a dispersão da goma em não-solventes, como álcoois, glicerol ou óleos, como de soja e milho (SWORN, 2009).

Assim, optou-se por, primeiramente, dispersar a goma xantana em glicerol, visto que este reagente é amplamente utilizado para a dissolução de drogas na indústria farmacêutica, pode melhorar as características mecânicas do hidrogel e apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade (TAN; AZIZ; AROUA, 2013). Foram obtidos hidrogéis altamente viscosos, mas que em temperaturas de 4 °C ainda se fluíam.

Através do teste de gelificação dos hidrogéis pelo ensaio de inversão de tubo, realizado no mesmo dia de preparo das amostras, verificou-se que somente as formulações M5X1Q1-G10 e M5X1Q2-G10 fluíram a 37 °C, conforme se pode observar nas imagens que compõem a Figura 17.

Figura 17 - Imagens fotográficas dos hidrogéis a temperaturas de 4 °C e 37 °C.



Entretanto, foi observado que, após cerca de 5 dias armazenadas a 4 °C, todas as amostras se encontravam gelificadas. Isto provavelmente ocorreu devido à interação entre a carboximetil quitosana e a goma xantana. É sabido que a quitosana, na presença de goma xantana, forma um complexo insolúvel em água através de interações entre os grupos amino protonados de quitosana e os grupos carboxílicos desprotonados da xantana, criando um microsistema estável (BELLINI *et al.*, 2012). Além disso, pode haver emaranhamento das moléculas e sua estabilização por ligações de hidrogênio entre e intracadeias. Como as macromoléculas poliméricas se difundem lentamente e podem mudar sua conformação tridimensional ao longo deste processo, quanto maior o tempo decorrido, maior será a probabilidade de interação entre seus grupamentos iônicos (MAGNIN, 2004) e também entre outros grupos.

Para comprovar tais evidências, preparou-se 3 amostras compostas por 10% (m/v) de metilcelulose somente com 2% (m/v) de goma xantana (M10X2-G10) ou 2% (m/v) de carboximetil quitosana (M10Q2) e uma composta somente por 2% (m/v) de carboximetil quitosana e 2% (m/v) de goma xantana (X2Q2-G10), discriminadas na Tabela 5 com os números 13, 14 e 15, respectivamente.

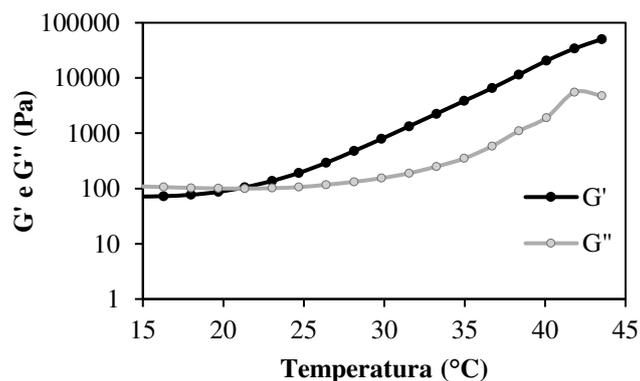
Após 24 h a 4 °C, verificou-se que a amostra X2Q2-G10 se apresentava gelificada, indicando que a hipótese de formação de complexo polieletrólito parecia ser válida. Além disso, a temperatura de armazenamento foi alterada para 10 °C e 37 °C para verificar se o complexo se mantinha estável, fato também comprovado. Já o hidrogel M10Q2 fluíu na temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) mas, com o aumento da temperatura para 37 °C, observou-

se a gelificação da amostra. Outra evidência constatada foi de que a amostra M10X2-G10, assim como a X2Q2-G10, também se apresentou gelificada à temperatura ambiente, porém manteve suas características termorresponsivas, uma vez que quando a temperatura era reduzida a 4 °C, o hidrogel voltava a fluir, e, quando era aumentada até 37 °C, mantinha-se gelificada.

Liu e Yao (2015) produziram hidrogel composto por 10% (m/v) de metilcelulose e 2% (m/v) de goma xantana, ambos com massas molares iguais às do presente estudo, o qual apresentou temperatura de gelificação de 34,2 °C, diferindo do resultado obtido no presente trabalho. Isso se deve, provavelmente, à presença dos 10% (v/v) de glicerol adicionados à amostra com o intuito de dispersar a goma xantana, uma vez que não foi possível, com os equipamentos disponíveis no laboratório, produzir hidrogéis com concentração de goma xantana de 1 e 2% (m/v) de forma homogênea na ausência deste composto, conforme realizado no referido estudo.

Para avaliar de maneira mais pontual o efeito do glicerol no decaimento da temperatura de gelificação desta formulação, realizou-se o mesmo teste reológico executado pelos autores do referido artigo, conforme demonstrado na Figura 18.

Figura 18 - Variações de G' e G'' em relação a variação da temperatura da amostra composta por 10% (m/v) de metilcelulose, 2% (m/v) de goma xantana e 10% (v/v) de glicerol, medida a uma taxa de aquecimento de 1 °C/min, tensão de 5Pa e frequência de 10 rad/s.



Esse procedimento indicou que a temperatura de gelificação do hidrogel M10X2-G10 contendo 10% (v/v) de glicerol foi de 20,7 °C, ou seja, esta formulação apresentou um decaimento de 13,5 °C em relação ao hidrogel produzido na ausência de glicerol do referido estudo. Dessa forma, pode-se inferir que, provavelmente, a presença de glicerol nas amostras

altera de maneira significativa a temperatura de gelificação, sendo que a diminuição na quantidade deste reagente nas preparações pode resultar no aumento da temperatura de gelificação das amostras. Fazendo um comparativo com a temperatura de transição vítrea (T_g), a adição de plastificante ao sistema aumenta o relaxamento das cadeias poliméricas, por isso reduz a T_g. De forma análoga, o glicerol pode ter realizado esse relaxamento nas cadeias, expondo os grupamentos metil, por exemplo, facilitando a interação hidrofóbica entre eles em temperaturas inferiores, culminando na redução da temperatura de gelificação.

Concomitantemente a este experimento, testou-se a estratégia de diminuir a quantidade de goma xantana e carboximetil quitosana com o intuito de atenuar as possíveis interações entre estes polímeros no hidrogel. Foram produzidos os hidrogéis M10X0,5Q0,5-G10 (formulação 16), M8X0,5Q0,5-G10 (formulação 17) e M5X0,5Q0,5-G10 (formulação 18) descritos na Tabela 5.

Estas formulações foram submetidas ao ensaio de inversão de tubo, conforme relatado anteriormente, logo após o preparo e após 5 dias nas temperaturas de 4 °C e 37 °C. Pôde-se observar que, após o preparo, as amostras gelificaram a 37 °C e que, após 5 dias, mantiveram a característica termorresponsiva. Dessa forma, tais formulações foram submetidas à análise do comportamento reológico para a determinação da temperatura exata de gelificação.

5.2 Análise do Comportamento Reológico

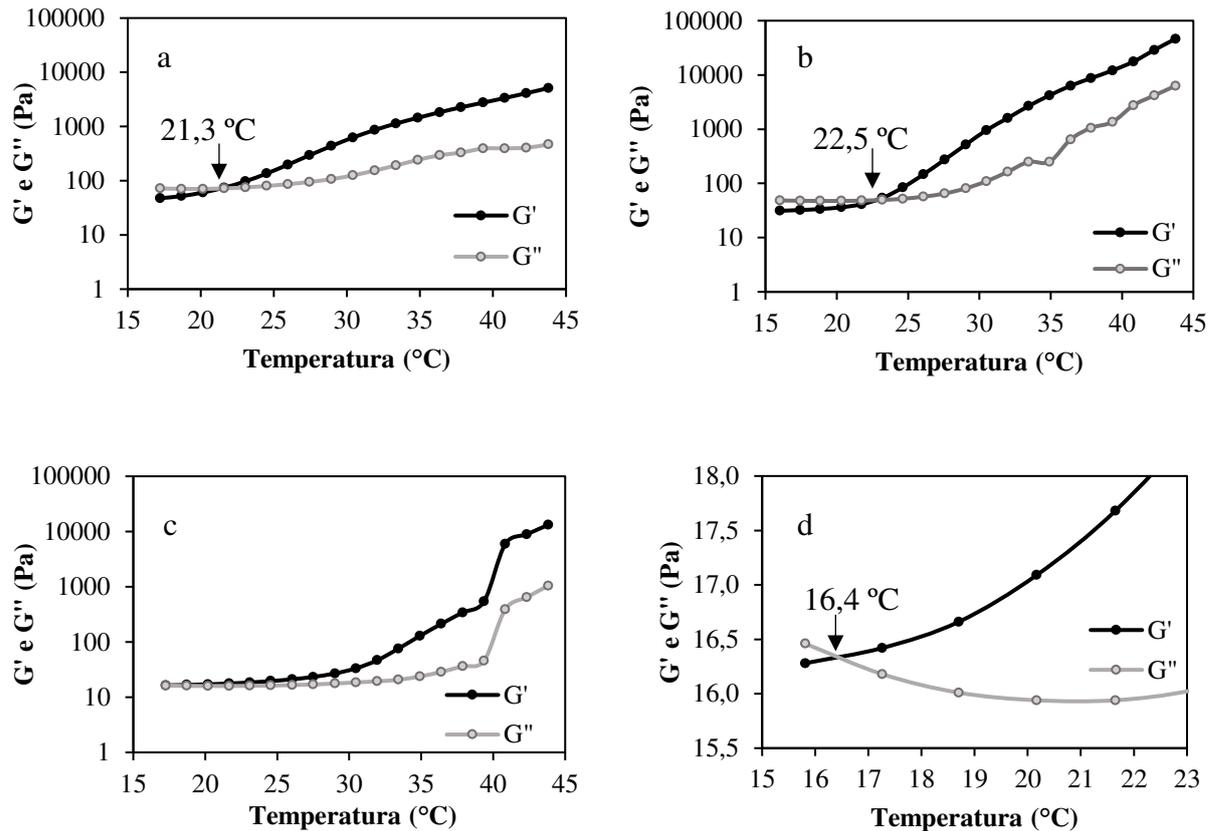
Como as formulações contendo concentrações variáveis de metilcelulose e 0,5% (m/v) de carboximetil quitosana e goma xantana apresentaram características favoráveis quanto à gelificação, as mesmas foram submetidas aos ensaios reológicos, conforme verificado na Figura 19.

Analisando-se a Figura 19 pode-se inferir que a temperatura de gelificação das formulações M10X0,5Q0,5-G10, M8X0,5Q0,5-G10 e M5X0,5Q0,5-G10 são, respectivamente, 21,3 °C, 25,5 °C e 16,4 °C.

As temperaturas de gelificação dos hidrogéis M10X0,5Q0,5-G10 e M5X0,5Q0,5-G10 apresentam valores abaixo do esperado, uma vez que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que a temperatura de centros cirúrgicos especializados, como o de ortopedia, deve estar dentro da faixa de 18 a 22 °C (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2003). Dessa forma, é necessário que os hidrogéis

produzidos gelifiquem somente acima de 22 °C, possibilitando a injeção intra-articular nestes centros ortopédicos em temperatura ambiente.

Figura 19 - Módulos G' e G'' versus temperatura das amostras com 10% (v/v) de glicerol M10X0,5Q0,5-G10 (a), M8X0,5Q0,5-G10 (b), M5X0,5Q0,5-G10 (c) e M5X0,5Q0,5-G10 em maior aumento (d).



Segundo Liu e Yao (2015), a temperatura de gelificação de formulações constituídas de metilcelulose e goma xantana aumenta com a diminuição da concentração de metilcelulose. Pode-se verificar que esta afirmação foi válida quando a concentração de metilcelulose passou de 10% para 8% (m/v), porém não se observou tal comportamento com as formulações contendo 5% (m/v) de metilcelulose. Provavelmente, a quantidade de metilcelulose não foi suficiente para manter o padrão reportado e, como a temperatura de gelificação apresentada é baixa, esta formulação contendo 5% de metilcelulose foi descontinuada do estudo.

Como foi verificado que o glicerol possivelmente diminui a temperatura de gelificação, foram preparadas estas mesmas formulações (com exceção daquela contendo 5% (m/v) de metilcelulose) com 5% (v/v) de glicerol. Já que as formulações M10X2-G10 e M10Q2 também

apresentaram características termorresponsivas no teste de inversão de tubos, produziu-se outras concentrações de tais formulações com 5% (v/v) de glicerol quando na presença de goma xantana, descritas na Tabela 5 como as formulações de 19 a 26.

Como após o preparo dessas formulações a solubilização da goma ainda não havia sido completa devido à menor quantidade de glicerol adicionada, optou-se então por manter a mistura em estufa a 50 °C por 3 h. Durante este período, o material era periodicamente homogeneizado em vortex, até sua completa dissolução. Os resultados dos estudos reológicos para determinação da temperatura de gelificação se encontram na Figura 20.

De forma a facilitar a visualização e comparação das temperaturas de gelificação obtidas até este momento, estas foram sumarizadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparação das temperaturas de gelificação das formulações com 10%, 5% e sem glicerol medidas por reometria.

Formulação	Temperatura de gelificação (°C)		
	10% (v/v) glicerol	5% (v/v) glicerol	Sem glicerol
M10X0,5Q0,5	21,3 ± 0,3 ^a	28,9 ± 0,4 ^b	-
M8X0,5Q0,5	22,5 ± 0,8 ^a	30,5 ± 0,4 ^b	-
M10X2	20,7 ± 0,2 ^a	27,3 ± 0,7 ^b	-
M10X1	-	28,8 ± 0,9	-
M8Q2	-	-	28,9 ± 0,5
M8Q1	-	-	28,9 ± 0,6
M10Q2	-	-	28,0 ± 0,4
M10Q1	-	-	28,8 ± 0,8

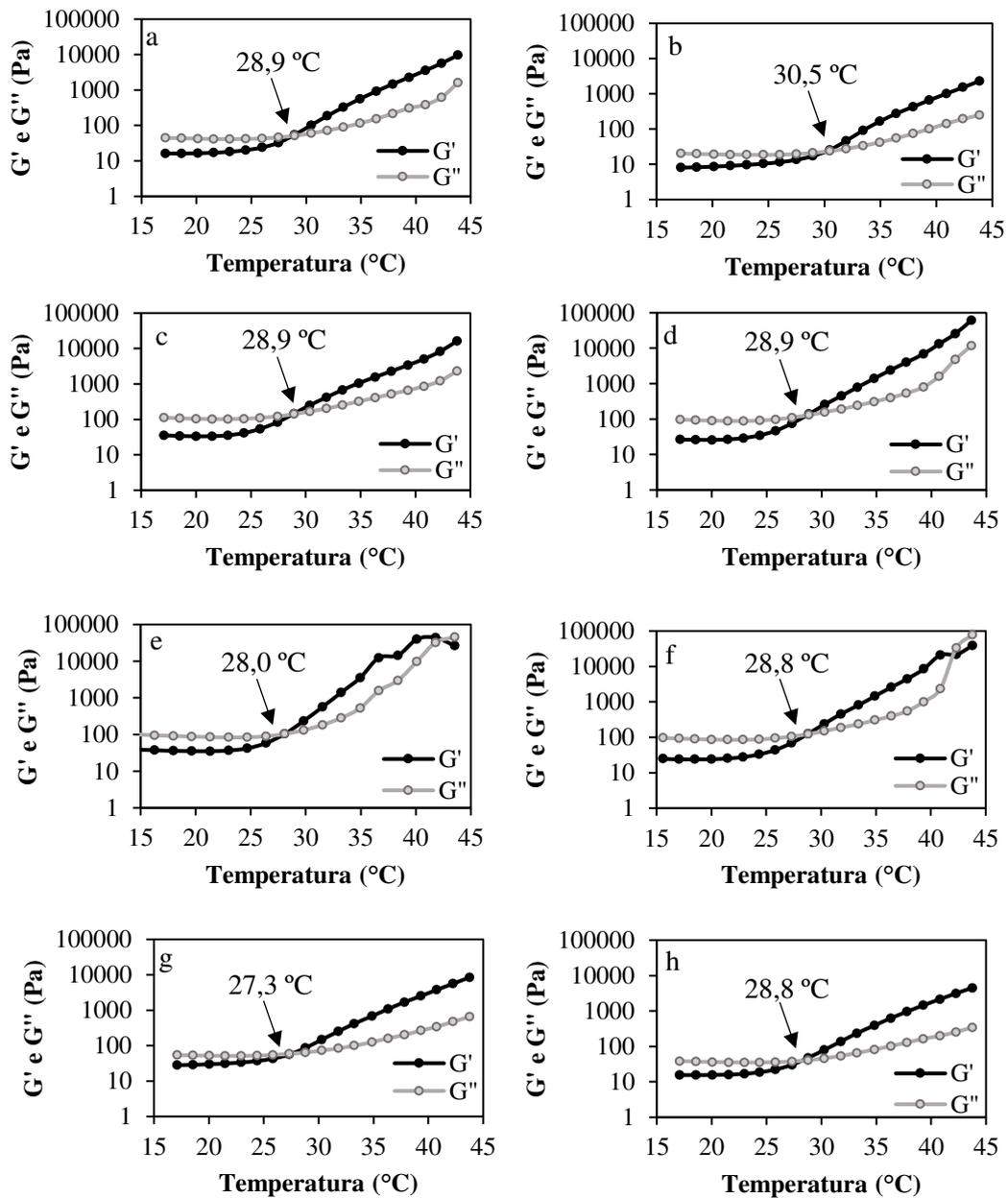
Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Com estes resultados, pôde-se confirmar que o glicerol reduz a temperatura de gelificação das formulações produzidas na presença deste composto, uma vez que estas passaram da faixa de 23 a 20 °C para 31 a 27 °C, sendo, portanto, adequadas para a finalidade pretendida. As formulações consistindo somente de metilcelulose e carboximetil quitosana também gelificaram em temperaturas adequadas, variando entre 28 e 29 °C.

Como foram obtidas diversas formulações com temperaturas dentro da faixa esperada, optou-se por selecionar 3 destas formulações para dar continuidade aos demais experimentos. Para a escolha, levou-se em consideração a massa polimérica total contida em cada hidrogel

para que fosse possível comparar as diferentes formulações. Assim, foram selecionados os hidrogéis M10X0,5Q0,5-G5, M10X1-G5 e M10Q1, todos apresentando o total de 11% de massa polimérica.

Figura 20 - Módulos G' e G'' versus temperatura das amostras com 5% (v/v) de glicerol M10X0,5Q0,5-G5 (a), M8X0,5Q0,5-G5 (b), M8Q2 (c), M8Q1 (d), M10Q2 (e), M10Q1 (f), M10X2-G5 (g) e M10X1-G5 (h).



5.3 Esterilização das formulações de hidrogel selecionadas

Outro ponto crítico para dar continuidade às caracterizações dos hidrogéis é a esterilização do produto. Uma vez que se tem por objetivo utilizar estes materiais para

finalidade médica, o que implica na ausência de contaminantes, o efeito deste procedimento no comportamento do material é de grande importância.

A esterilização por calor úmido geralmente é a mais utilizada, visto sua facilidade e eficácia, entretanto pode causar hidrólise das cadeias poliméricas. Bindal e colaboradores (2003) avaliaram o efeito da esterilização por calor úmido na viscosidade aparente de diversas soluções, dentre elas a goma xantana e a hidroxietilcelulose (HEC). A HEC consiste em uma metilcelulose modificada pela introdução de grupos 2-hidroxipropil na unidade de glicose anidra da celulose (FATIMI *et al.*, 2009). Nas soluções de 0,5% (m/v) de goma xantana e de 2% (m/v) de HEC os autores verificaram que, quando os polímeros são solubilizados em água, a esterilização por esta metodologia diminuiu substancialmente a viscosidade aparente das soluções. Entretanto, o preparo das soluções poliméricas em 0,05 mol/L de cloreto de sódio diminuiu este efeito da esterilização nas propriedades reológicas. A viscosidade aparente da goma xantana também foi avaliada em solução isotônica de cloreto de sódio (0,15 mol/L), não sendo observadas alterações em relação à solução não autoclavada (BINDAL *et al.*, 2003).

Como no presente estudo o hidrogel é preparado em tampão fosfato-salino (PBS), o qual contém 0,14 mol/L de cloreto de sódio, além de 0,01 mol/L de tampão fosfato e 0,0027 mol/L de cloreto de potássio, a esterilização por calor úmido se torna uma alternativa viável. Além disso, a *Sigma-Aldrich*, uma das empresas fornecedoras de metilcelulose, sugere utilizar calor úmido por 16 minutos a 121 °C e 1 atm como forma de preparo da solução polimérica, o que também indica que o polímero não se degrada com a aplicação desta técnica de esterilização (SIGMA-ALDRICH, 2018).

Para a avaliação da estabilidade da quitosana, Juan e colaboradores (2012) estudaram diferentes metodologias de esterilização deste polímero na forma de hidrogel, solução e pó. A esterilização de soluções de 1,5% (m/v) de quitosana por calor úmido ocasionou despolimerização substancial do material. No entanto, a esterilização a vapor do pó de quitosana somente disperso em água não afetou a massa molar do polímero. A esterilização em autoclave de hidrogéis de 3% (v/v) de quitosana gelificados com gases de amônia não modificou significativamente a estrutura macromolecular do polímero, o que indica que este é um método conveniente para a esterilização de hidrogéis compostos por quitosana (JUAN *et al.*, 2012). Em outro estudo, Daroz e colaboradores (2008) esterilizaram por calor úmido o pó de carboximetil quitosana. O processo consistiu em 5 minutos de pré-vácuo, 9 minutos de aquecimento até 134 °C e 15 min de esterilização por calor úmido a 2,1 kgf/cm². Após estes procedimentos, a

carboximetil quitosana foi submetida à secagem com calor seco por 10 minutos à mesma temperatura (DARÓZ *et al.*, 2008). Os pesquisadores verificaram que as propriedades físico-químicas do polímero eram mantidas após o procedimento.

Frente ao exposto, os três hidrogéis selecionados foram esterilizados por calor úmido e a temperatura de gelificação dessas amostras foi avaliada novamente pela análise do comportamento reológico, conforme descrito na metodologia. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 21.

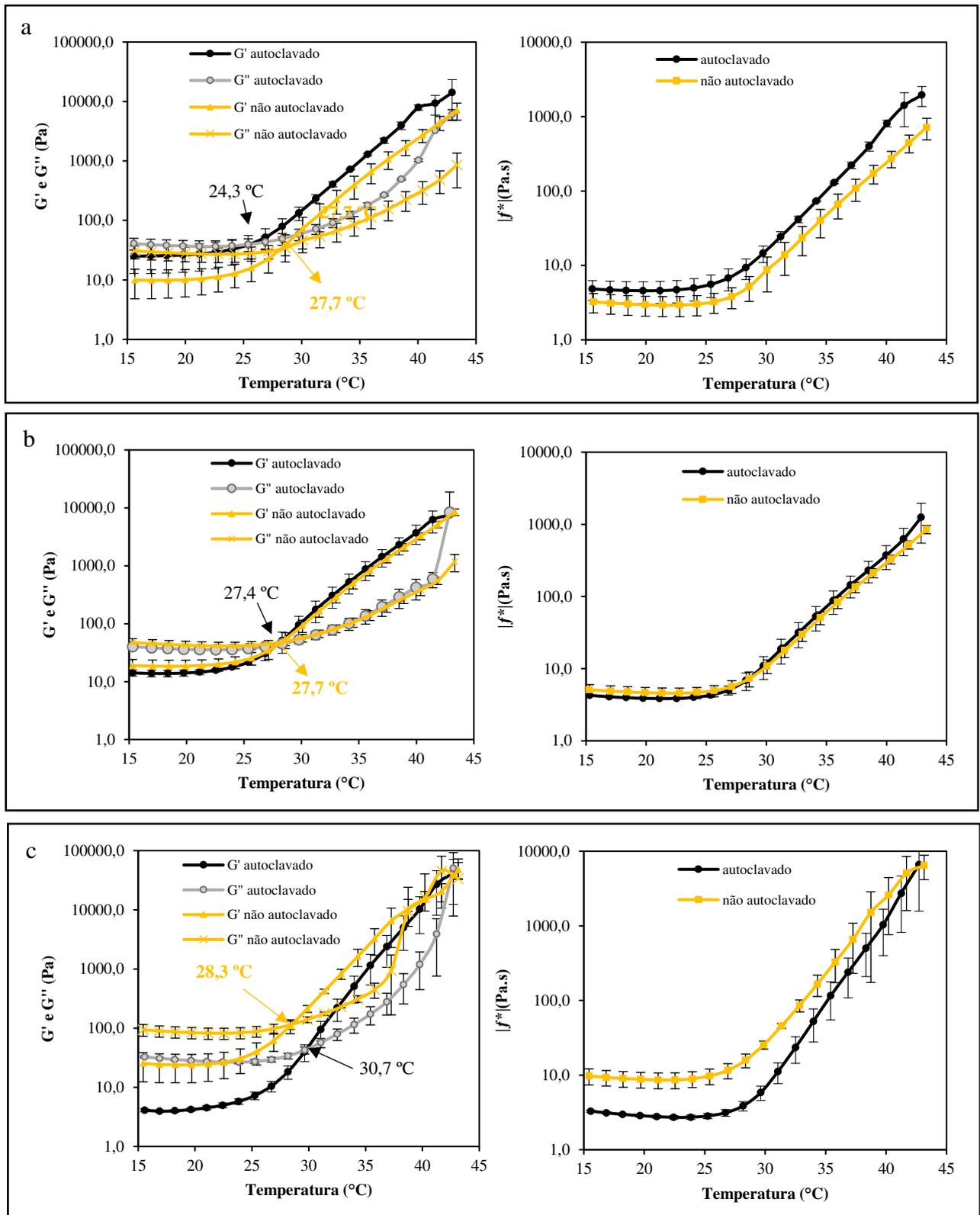
Analisando-se os gráficos de G' e G'' , pode-se verificar que as temperaturas de gelificação das formulações foram levemente alteradas, passando de 27,7 °C para 24,3 °C para o M10X1-G5 (Figura 21a), de 27,7 °C para 27,4 °C para o hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 (Figura 21b) e de 28,3 °C para 30,7 °C para o M10Q1 (Figura 21c). Somente o hidrogel M10X1-G5 apresenta temperaturas de gelificação que diferem estatisticamente entre si, porém a nova temperatura de gelificação obtida ainda é passível de aplicação, uma vez que se encontra acima dos 22 °C requeridos para os centros de ortopedia.

As viscosidades das formulações M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 mantiveram-se praticamente constantes a 37 °C, não diferindo estatisticamente entre si nesta temperatura. A formulação M10X1-G5 apresentou uma leve diminuição na viscosidade, o que é, de fato, benéfico, uma vez que a mistura com as células é facilitada. Dessa forma, todas as demais caracterizações foram realizadas após esterilização das formulações em autoclave por 15 min, 1 atm e 121 °C.

5.4 Análise do efeito de diferentes concentrações de ácido gálico, dexametasona e diclofenaco de sódio na viabilidade celular direta

Conforme apontado no item de materiais e métodos, o ácido gálico pode apresentar citotoxicidade em células saudáveis de maneira dependente da dose, de forma que foi necessário analisar seus efeitos em relação às células-tronco da polpa dentária utilizadas no presente trabalho.

Figura 21 - Módulos G' e G'' versus temperatura (à esquerda) e viscosidade (à direita) versus temperatura dos hidrogéis M10X1-G5 (a), M10X0,5Q0,5-G5 (b) e M10Q1 (c).



As concentrações testadas foram baseadas em estudos que mostraram as concentrações eficazes do ácido gálico para o tratamento da osteoartrite, que variaram entre 80 e 200 $\mu\text{mol/L}$ (NATARAJAN; MADHAN; TIKU, 2015; YOON *et al.*, 2013).

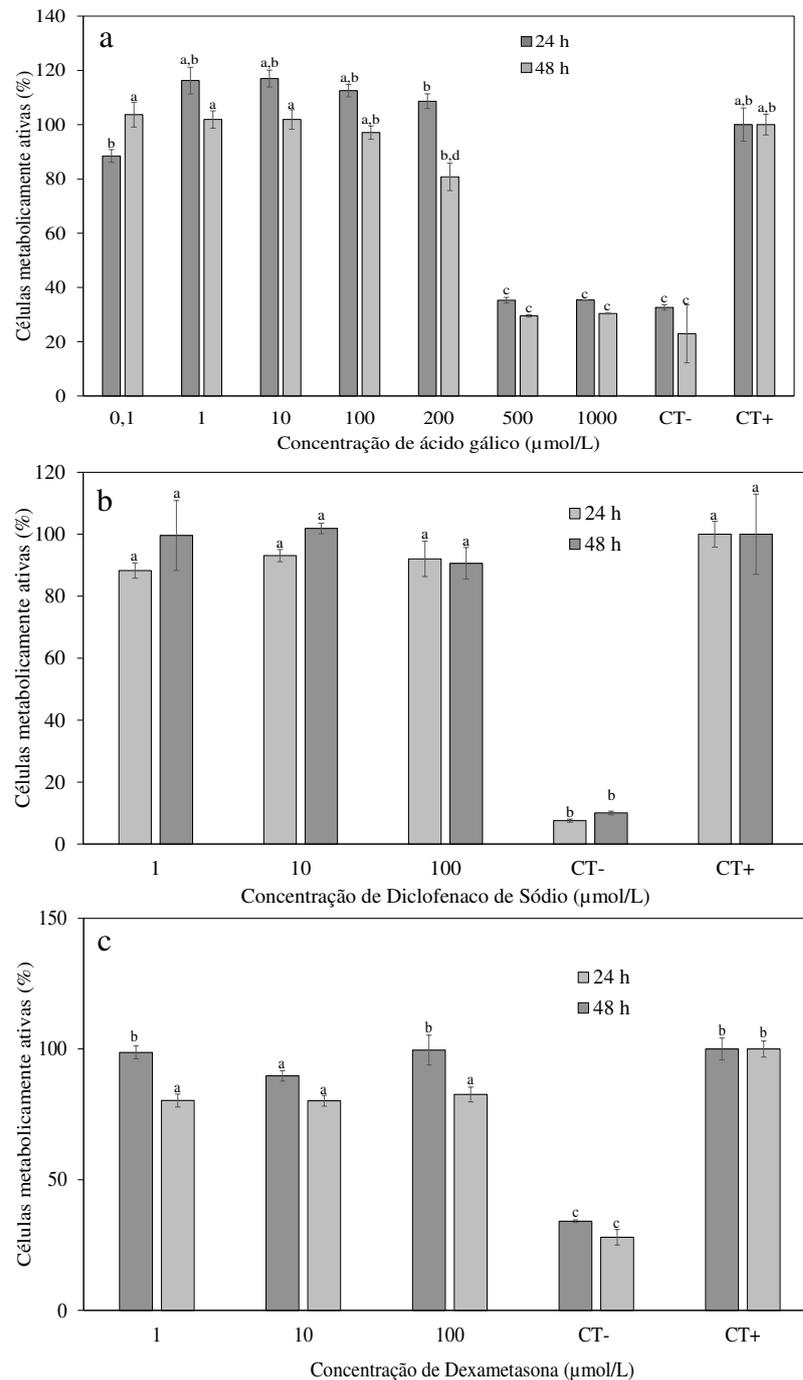
Já em relação aos demais fármacos, foi realizado o mesmo estudo de citotoxicidade ainda que a literatura levantada não indicasse citotoxicidade nas faixas de concentração testadas, uma vez que em nenhum artigo consultado foi utilizado o mesmo tipo celular empregado no presente trabalho. As concentrações testadas foram baseadas em estudos prévios, como o de Elron-Gross (2009), já citado na revisão da literatura.

Os resultados dessas análises estão expressos em relação ao controle positivo, o qual foi composto pelas mesmas células cultivadas em meio de cultivo sem fármacos, conforme demonstrado na Figura 22. De acordo com a ISO 10993-5 (ISO/EN10993-5, 2009), se a viabilidade celular for reduzida à valores inferiores a 70% em relação ao controle do ensaio, o produto estudado é considerado citotóxico. Analisando-se o gráfico com diferentes concentrações de ácido gálico (Figura 22a), pode-se inferir que até a concentração de 200 $\mu\text{mol/L}$ o ácido gálico não altera a viabilidade das DPSCs. Estes dados corroboram com os obtidos por Wen e colaboradores (2015), que testaram concentrações de ácido gálico variando de 0 a 80 $\mu\text{mol/L}$ por 48 h e também não encontraram efeito citotóxico.

No presente trabalho, além das concentrações até 200 $\mu\text{mol/L}$ não apresentarem efeitos citotóxicos, estas estimularam o crescimento celular no tempo de 24 h, o que indica que o ácido gálico pode influenciar o desenvolvimento destas células em particular. Já as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{mol/L}$ de ácido gálico podem ser consideradas tóxicas para as células, uma vez que resultaram em redução da viabilidade para cerca de 30% em relação às células cultivadas na presença de meio de cultivo sem adição de fármaco.

Wen e colaboradores (2015) também verificaram que em concentrações baixas, como de 25 $\mu\text{mol/L}$, o ácido gálico já exerce efeito condroprotetor, uma vez que inibe a produção de moléculas que induzem a osteoartrite. Já Natarajan e colaboradores (2015) testaram diversos polifenóis na reticulação do colágeno tipo II de explantes bovinos. Os autores verificaram que, com tratamentos de 200 $\mu\text{mol/L}$ de polifenóis, a estabilidade térmica dos explantes apresentou aumento em torno de 12 °C, indicando, assim, a reticulação do tecido. Além disso, a cartilagem tratada apresentou uma redução significativa na porcentagem de degradação de colágeno e na liberação de glicosaminoglicanos quando digerida com a enzima colagenase, o

Figura 22 – Viabilidade de células-tronco da polpa do dente de leite quando em contato com diferentes concentrações de ácido gálico (a), diclofenaco de sódio (b) e dexametasona (c).



que sugere aumento da integridade física e da resistência da cartilagem reticulada com os polifenóis. Dessa forma, foi selecionada a concentração de 200 $\mu\text{mol/L}$ de ácido gálico para a incorporação direta nos hidrogéis, uma vez que esta concentração é suficiente para exercer os efeitos condroprotetores e de reticulação da matriz, mas não é citotóxica.

Analisando o ensaio de viabilidade com diferentes concentrações de diclofenaco de sódio e dexametasona (Figuras 22b e 22c), pode-se inferir que nenhuma concentração afeta a

viabilidade celular, uma vez que estes resultados se encontram acima de 80% em todas as concentrações testadas. Pountos e colaboradores (2011) analisaram a citotoxicidade de diversos fármacos, dentre eles o diclofenaco de sódio, e demonstraram que nenhuma das drogas testadas na faixa de concentração de $3,37 \times 10^{-11}$ a $337,7 \mu\text{mol/L}$ afetou a proliferação de células-tronco mesenquimais, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (POUNTOS *et al.*, 2011).

Já Wyles e colaboradores também analisaram a citotoxicidade de diversos fármacos corticosteroides em células-tronco mesenquimais humanas. Os autores verificaram que a dexametasona era a droga menos citotóxica para esse tipo de célula e a dose de 244 mmol/L , concentração mais de 2000 vezes maior que a utilizada no presente trabalho, ainda não resultava em citotoxicidade para as células (WYLES *et al.*, 2015). Em outro estudo, foi demonstrado que pequenas doses de dexametasona, como $0,01 \mu\text{mol/L}$, mantêm a síntese de proteoglicanos do tecido cartilaginoso e inibem a hidrólise do mesmo quando lesionados por compressão na presença ou ausência de citocinas inflamatórias (GRODZINSKY *et al.*, 2017).

Dessa forma, a concentração de $100 \mu\text{mol/L}$ foi selecionada para incorporação tanto de diclofenaco quanto de dexametasona diretamente às formulações de hidrogel.

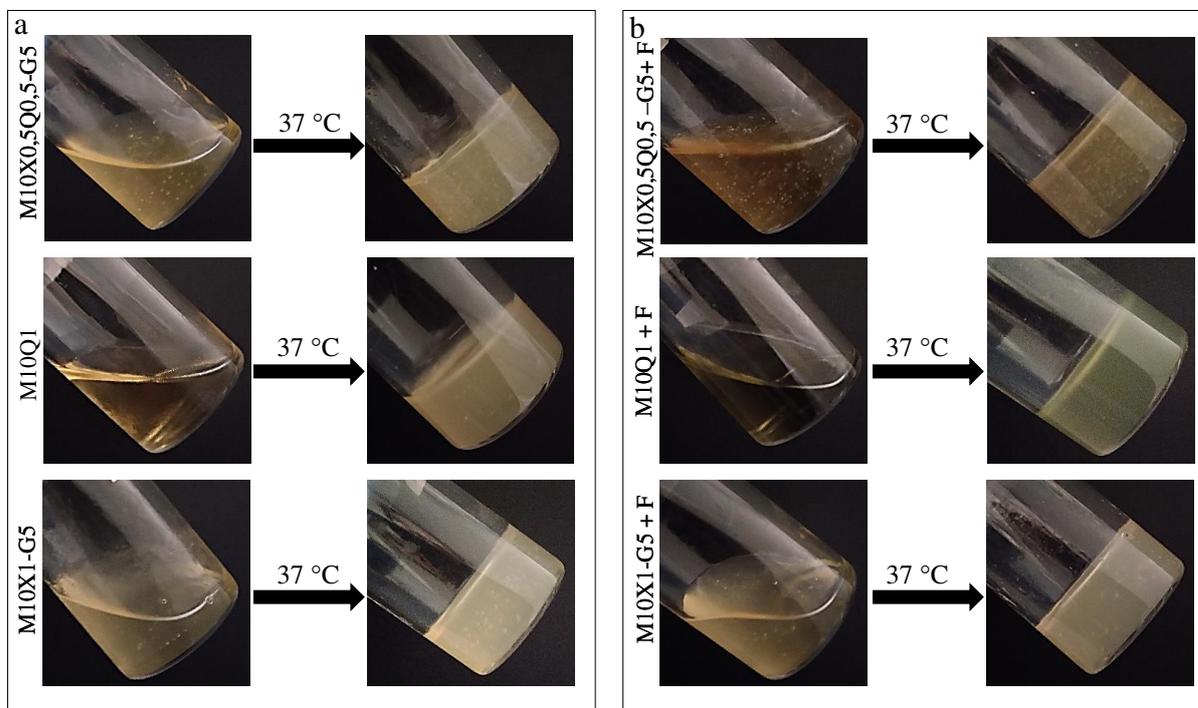
5.5 Aspecto e morfologia dos hidrogéis

Foram registradas imagens fotográficas dos hidrogéis estéreis a fim de demonstrar a homogeneidade e gelificação das soluções após o preparo tanto a 4°C quanto a 37°C , as quais foram agrupadas na Figura 23.

Pode-se verificar que todas as formulações se apresentam homogêneas, com coloração amarronzada devido ao procedimento de esterilização. Além disso, os hidrogéis produzidos na presença da goma xantana tendem a formar pequenas bolhas, o que retifica a necessidade de centrifugação prévia à aplicação.

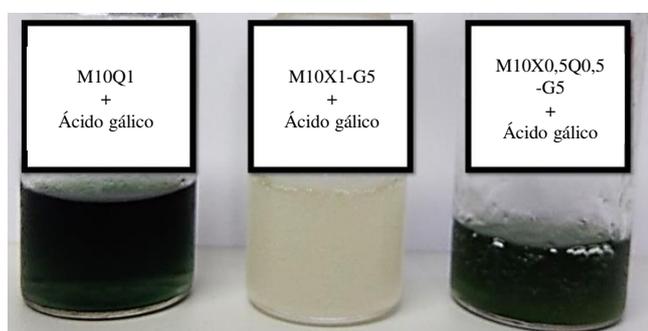
Os hidrogéis M10Q1 e M10X0,5Q0,5-G5 (de forma menos evidente) desenvolveram coloração esverdeada após a adição dos fármacos, conforme demonstrado na Figura 23b. Provavelmente, esta coloração se deveu à interação do ácido gálico com a carboximetil quitosana, uma vez que só foi observado o aparecimento da coloração nas formulações que continham este polímero e de que o ácido gálico era amplamente utilizado na antiguidade na produção de tintas (SISTACH; GIBERT; AREAL, 1999).

Figura 23 – Aspecto macroscópico dos hidrogéis estéreis produzidos na ausência (a) e na presença (b) dos fármacos em temperaturas de 4 °C e 37 °C.



Com intuito de confirmar que a cor gerada era devido ao ácido gálico, adicionou-se este fármaco nos hidrogéis a uma maior concentração (1000 $\mu\text{mol/L}$), conforme demonstrado na Figura 24.

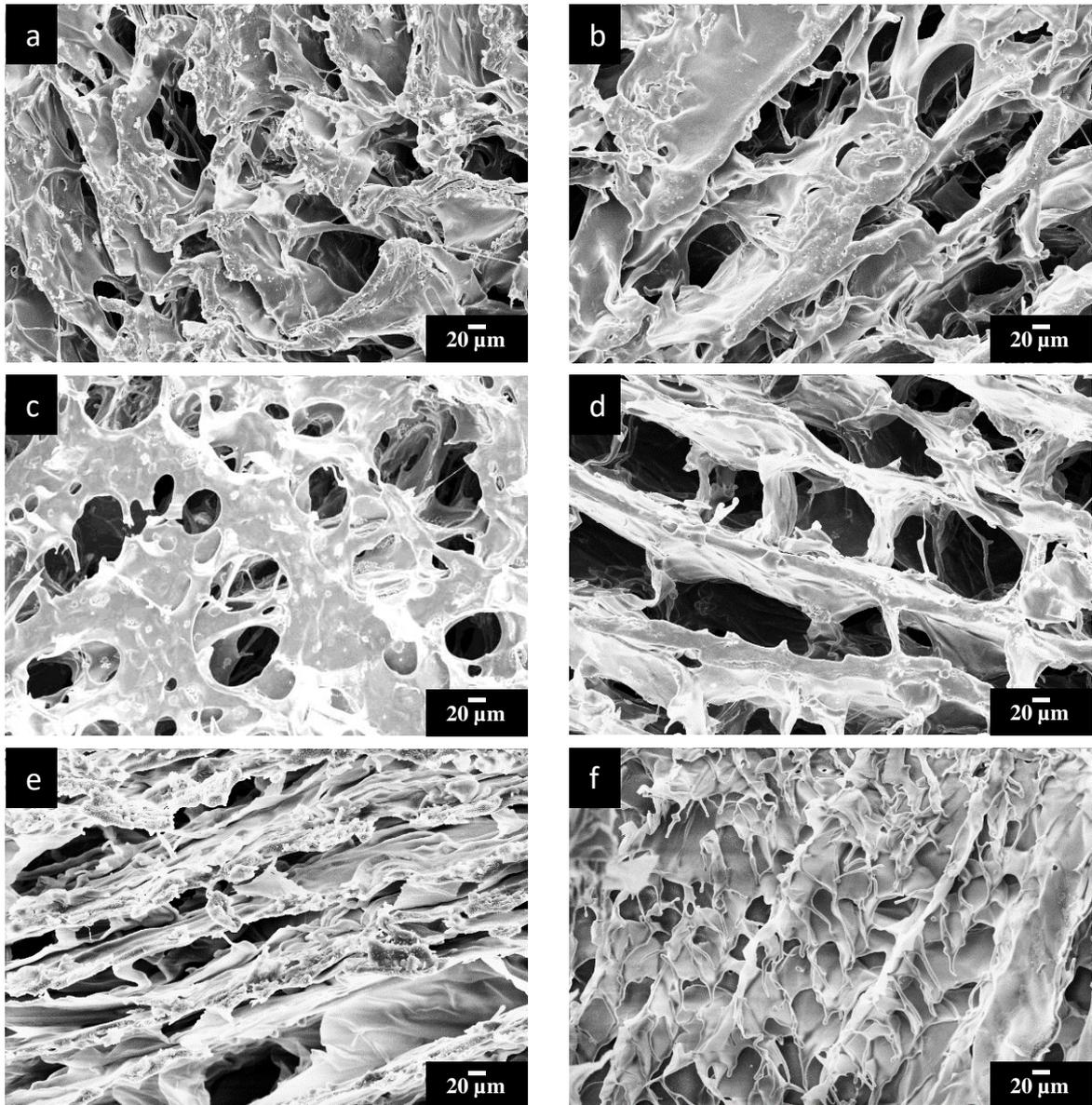
Figura 24 - Imagens dos hidrogéis M10Q1, M10X1-G5 e M10X0,5Q0,5-G5 somente com o fármaco ácido gálico adicionado diretamente na mistura polimérica na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.



Pode-se notar que ocorreu formação da coloração de forma acentuada somente nos hidrogéis com carboximetil quitosana, indicando que a hipótese levantada é válida.

Além do aspecto macroscópico, analisou-se também os hidrogéis em microscópio eletrônico de varredura com intuito de verificar como os polímeros se estruturam, conforme demonstrado na Figura 25.

Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis M10X1-G5 sem e com fármacos (a e b), M10X0,5Q0,5-G5 sem e com fármacos (c e d) e M10Q1 sem e com fármacos (e e f).



Entretanto, para uso desta técnica, as amostras necessitam de desidratação prévia para serem visualizadas, uma vez que o SEM atua em alto vácuo (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009). De forma geral, da ordem de 99% da água precisa ser removida, pois a desgaseificação

da amostra no interior da câmara de vácuo pode degradar o equipamento e os elétrons, além de poder causar o colapso de amostras parcialmente hidratadas, modificando a estrutura (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009).

A desidratação em temperatura ambiente resulta no colapso de hidrogéis em mais de 80% e na perda de sua estrutura fina (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009). Assim, técnicas alternativas para desidratação se fazem necessárias, como a liofilização. Nesta técnica, as amostras podem ser congeladas e liofilizadas em seu estado natural ou após fixação química a partir de solventes orgânicos. A liofilização com estes solventes geralmente é mais rápida e apresenta menor chance de causar crescimento disruptivo de cristais, uma vez que o solvente atuará como um crioprotector (KIRK; SKEPPER; DONALD, 2009).

Dessa forma, optou-se por fixar as amostras em formaldeído a 4% (v/v) por, aproximadamente, 18 h e, após este período, congelou-se as amostras em vapor de nitrogênio líquido, as quais foram em seguida liofilizadas, conforme já descrito na metodologia. Apesar da técnica de liofilização poder gerar poros não fidedignos à estrutura hidratada dos hidrogéis, esta técnica é válida como para se estimar os tamanhos de poros.

A análise pelo *software* ImageJ do tamanho de poros gerados nas amostras está sumarizada na Tabela 9.

Tabela 9 – Tamanho médio dos poros das formulações M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 na ausência e presença dos três fármacos.

	Amostra	Tamanho médio dos poros (μm)
Sem fármacos	M10X1-G5	122,5 \pm 44,1 ^{b, c, d}
	M10X0,5Q0,5-G5	142,5 \pm 52,1 ^{b, c, d}
	M10Q1	56,5 \pm 17,1 ^{a, c}
Com fármacos	M10X1-G5	129,3 \pm 53,6 ^{b, c, d}
	M10X0,5Q0,5-G5	156,6 \pm 29,8 ^{b, c, d}
	M10Q1	43,2 \pm 18,0 ^{a, b}

Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Pode-se verificar que a adição dos fármacos não alterou de forma significativa o tamanho dos poros dos hidrogéis gerados após a liofilização do material. Não foram observados cristais ou aglomerações de fármacos, o que indica que os mesmos se dissolveram de forma eficiente

na solução polimérica e que estão bem distribuídos nas matrizes. Além disso, verifica-se que os hidrogéis que contêm goma xantana na formulação apresentam poros relativamente maiores que o hidrogel M10Q1.

A presença de poros é importante, pois propicia o transporte de massa e simultaneamente protege as células do cisalhamento e a nova cartilagem formada dos possíveis danos mecânicos. No caso do tecido cartilaginoso, há uma maior necessidade da presença de poros, uma vez que a cartilagem apresenta natureza avascular que dificulta a remoção eficiente dos produtos metabólicos gerados no tecido (VIKINGSSON *et al.*, 2015).

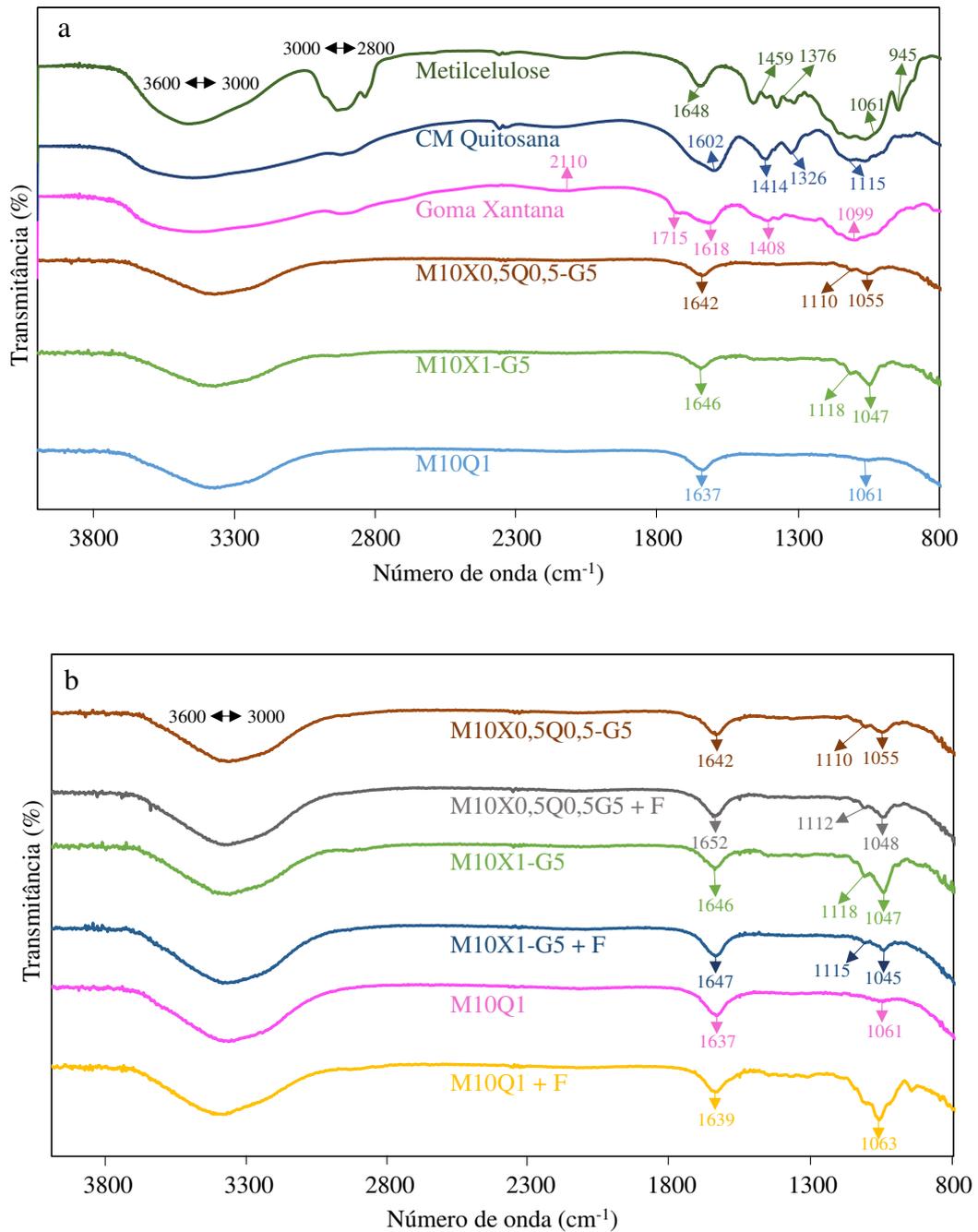
Matsiko e colaboradores (2015) produziram suportes de ácido hialurônico com colágeno com três diferentes tamanhos médios de poros (94, 130 e 300 μm) (MATSIKO; GLEESON; O'BRIEN, 2015). Os autores verificaram que o *scaffold* com poros de 300 μm estimulou a proliferação celular, a deposição de matriz e a expressão de genes condrogênicos. Esses resultados mostram a importância da microarquitetura de *scaffolds* para a engenharia do tecido cartilaginoso. Nesse sentido, os hidrogéis que possuem goma xantana em sua composição apresentam uma vantagem frente ao hidrogel composto somente por metilcelulose e carboximetil quitosana.

5.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Na Figura 26 são mostrados os espectros de FT-IR dos hidrogéis com e sem fármacos e de seus componentes isolados.

Todas amostras apresentam pico entre 3600 e 3000 cm^{-1} , relacionado ao estiramento O-H. Entre 3000 e 2800 cm^{-1} , os polímeros metilcelulose, carboximetil quitosana e goma xantana exibem o espectro de estiramento de C-H alifáticos. Este pico é mais proeminente na metilcelulose, uma vez que ela apresenta grupos metil substituídos em suas hidroxilas (VIEIRA *et al.*, 2012). Entretanto, este pico não ficou evidente nos hidrogéis, provavelmente devido a interações intermoleculares que ocorreram nas matrizes (HAZRA *et al.*, 2015).

Figura 26 - Espectros de FTIR dos polímeros metilcelulose, quitosana e xantana e dos hidrogéis M10X0,5Q0,5-G5, M10X1-G5 e M10Q1.

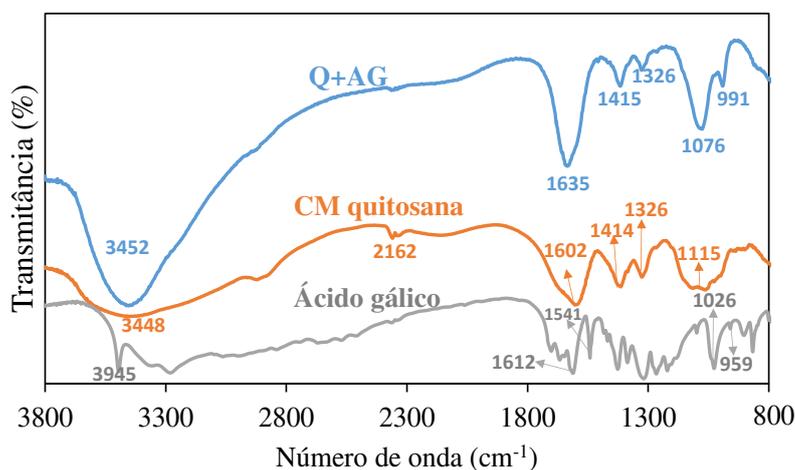


Todos os polímeros e hidrogéis apresentam pico entre 1600 e 1700 cm^{-1} , o qual indica a presença de carbono com dupla ligação. Também é possível observar em todos os espectros a presença de um pico em torno de 1100 cm^{-1} , que se refere a ligações éter.

Na Figura 26b são comparados hidrogéis com e sem fármacos. O hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 não apresentou alteração nos espectros na presença dos fármacos. Já o hidrogel M10X1-G5 teve pico em torno de 1050 cm^{-1} menos proeminente na presença dos fármacos, indicando que os grupos éter interagiram com os fármacos. De forma contrária ao hidrogel M10X1-G5, observa-se um pico menos proeminente em torno de 1050 cm^{-1} no hidrogel M10Q1 na ausência dos fármacos. Isso pode ser explicado devido a goma xantana apresentar mais grupamentos éter em sua estrutura em comparação à carboximetil quitosana. Além disso, no hidrogel M10Q1, após a adição dos fármacos, o grupo éter pode ter sido formado. Os grupamentos éter são estruturas moleculares caracterizadas pela presença de um átomo de oxigênio ligado em suas duas extremidades a átomos de carbono. Geralmente, esses grupamentos são formados pela interação de duas hidroxilas, que passam por desidratação, perdendo o átomo de hidrogênio, substituído pelo radical de carbono. Dessa forma, analisando-se a estrutura da quitosana e do ácido gálico, pode-se inferir que tal formação pode ter ocorrido entre os diversos grupamentos -OH de cada uma das moléculas, uma vez que a Q apresenta -OH nas posições 3 e 6 de seus anéis, bem como o ácido gálico apresenta -OH substituídos em todas as posições do anel.

Com o intuito de comprovar a interação do ácido gálico com a carboximetil quitosana, preparou-se também uma amostra contendo 0,5% (m/v) de carboximetil quitosana e $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ de ácido gálico em PBS. Para melhor visualização das interações, sem interferência das bandas de água, liofilizou-se a amostra. Na Figura 27 pode-se observar os espectros de FTIR desta amostra e de seus componentes isolados.

Figura 27 - Espectros de FTIR das amostras de carboximetil quitosana com ácido gálico (Q+AG), de carboximetil quitosana isolada (CM quitosana) e de ácido gálico isolado.



Pode-se observar que em torno de 1050 cm^{-1} , o espectro da amostra de carboximetil quitosana com ácido gálico fica mais proeminente, conforme o esperado, indicando que o ácido gálico interage com este polímero, formando as referidas ligações do tipo éter. Também se observa a formação de um pico em torno do número de onda de 991 cm^{-1} , correspondente aos alquenos. Estes compostos são definidos como hidrocarbonetos alifáticos insaturados, apresentando uma ligação dupla entre seus átomos de carbono (FERNANDES, FELIPE HUGO ALENCAR; SALGADO, 2016). Os alquenos podem ser formados por diversos mecanismos, como pela desidratação de álcoois ramificados ou não ramificados, na presença de ácidos fortes ou pH levemente ácido, em diversas temperaturas. A grande maioria das condições envolvem elevadas temperaturas e uso de ácidos fortes, como o ácido sulfúrico. Porém, essas condições não condizem com o presente trabalho, uma vez que o pH do hidrogel é praticamente neutro e as análises foram executadas em temperatura ambiente. Dessa forma, a condição de formação de alqueno que mais se assemelha ao do presente trabalho é a que envolve a desidratação de álcoois primários ramificados na presença de pH levemente ácido. Com o pH levemente ácido, ocorre a desprotonação da hidroxila, deixando a molécula positiva. Essa molécula, na presença de água ou de outra hidroxila, pode formar alqueno e H_3O^+ (RANU; BHAR, 1996).

Assim, acredita-se que o ácido gálico possa realizar estes dois tipos de ligações químicas com a carboximetil quitosana, o que também corrobora com o fato de não ter sido possível detectar o composto na análise da cinética de liberação, conforme discutido mais adiante. Devido à sua interação química com a matriz, não se verificou liberação do ácido gálico da matriz em quantidades detectáveis pela técnica de Folin Ciocalteu.

5.7 Caracterização mecânica dos hidrogéis

A análise das propriedades compressivas é crucial para a engenharia de tecido cartilaginoso, uma vez que este tecido é exposto constantemente a tensões decorrentes de movimentos, como caminhada e corrida, que levam a ciclos repetitivos de compressão e relaxamento tecidual em intervalos de tempos inferiores a 1 s (POPA *et al.*, 2015; RONKEN *et al.*, 2012).

As propriedades compressivas mais relevantes para esta finalidade são os módulos de equilíbrio e dinâmico. O primeiro módulo refere-se à medida da rigidez da matriz quando em equilíbrio, a qual varia de 2 a 10 MPa na cartilagem humana. Já o módulo dinâmico é definido

como a medida dos efeitos elásticos e viscosos combinados quando o hidrogel é submetido ao cisalhamento dinâmico (WONG; SAH, 2010).

Os módulos de equilíbrio e dinâmico determinados para os materiais mais promissores produzidos neste trabalho encontram-se sumarizados na Tabela 10. As curvas obtidas tanto para o modulo dinâmico como para o módulo de equilíbrio estão apresentadas no apêndice I.

Tabela 10 – Módulo de equilíbrio a 10% de deformação compressiva e módulo dinâmico em frequência de 1 Hz e amplitude de 1% de deformação para os hidrogéis.

Hidrogel	Módulo de Equilíbrio (kPa)	Módulo Dinâmico (kPa)
M10X1-G5	17,3 ± 2,1 ^a	38,6 ± 0,1 ^{a, c}
M10X1-G5 + F	29,3 ± 5,4 ^b	65,2 ± 5,7 ^b
M10X0,5Q0,5-G5	19,5 ± 1,3 ^{a, c}	31,7 ± 0,3 ^a
M10X0,5Q0,5-G5 + F	31,1 ± 4,9 ^b	61,1 ± 7,2 ^b
M10Q1	20,0 ± 2,9 ^{a, d}	31,2 ± 3,5 ^a
M10Q1 + F	30,5 ± 4,1 ^{b, c, d}	45,3 ± 3,9 ^{a, c}

Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os três tipos de hidrogéis na presença dos fármacos apresentaram módulos de equilíbrio superiores aos hidrogéis produzidos na ausência dos mesmos, não diferindo estatisticamente entre si. De maneira similar, os módulos dinâmicos desses hidrogéis também foram maiores, sendo os módulos dos hidrogéis produzidos com goma xantana (M10X1-G5 + F e M10X0,5Q0,5-G5 + F) superiores ao do hidrogel produzido na ausência deste polissacarídeo.

Possivelmente, o fato de os módulos serem superiores nos hidrogéis com fármacos foi devido à presença do ácido gálico. Este polifenol interage com o colágeno da cartilagem através de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, reticulando e estabilizando estas matrizes (MADHAN; MURALIDHARAN; JAYAKUMAR, 2002; NATARAJAN; MADHAN; TIKU, 2015). De maneira similar, este fármaco pode ter realizado os mesmos tipos de interação com a metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana, melhorando as propriedades mecânicas dos hidrogéis.

Outro fato evidenciado foi o aumento do módulo dinâmico dos hidrogéis produzidos com goma xantana. Tal evento pode ser explicado pela conformação tridimensional que a

molécula da goma de forma isolada apresenta abaixo de sua temperatura de fusão (entre 40 e 50 °C). Quando abaixo desta temperatura, como no caso do presente ensaio mecânico, a goma exibe duplas hélices rígidas e ordenadas que formam uma rede tridimensional, apresentando propriedades que atenuam deformações quando uma tensão é aplicada (LIU, ZHIJIA; YAO, 2015; ZHANG, FEI *et al.*, 2015). Outra vantagem de incluir a goma xantana na composição dos hidrogéis é que suas soluções precursoras, já em baixas concentrações, como de 0,5% (m/v), fluem sob uma determinada tensão de cisalhamento e recuperam suas propriedades mecânicas após a remoção desta tensão, evitando, assim, o vazamento da solução precursora do local de injeção (LIU, ZHIJIA; YAO, 2015).

O fluido sinovial apresenta pH fisiológico e volume de 0,5 a 4 mL em articulações não inflamadas, enquanto no processo inflamatório esse volume pode atingir volumes de até 8 mL e pH que variam de 6 a 6,8. Estes fatores poderiam alterar as propriedades mecânicas, bem como de diversas outras variáveis.

As propriedades mecânicas dos hidrogéis também influenciam a produção de proteoglicanos e a diferenciação de células em fenótipos particulares. As células apresentam a capacidade de reconhecer o microambiente mecânico ao seu redor através da interação das moléculas de adesão e de contratilidade celular com as moléculas em seu entorno. Esta interação, em conjunto com moléculas sinalizadoras solúveis, inicia uma cascata de sinalização que regula a expressão gênica e, conseqüentemente, o tipo celular (LEE, JUNMIN; ABDEEN; KILIAN, 2014). Matrizes mais macias tendem a promover diferenciação neurogênica, adipogênica e condrogênica, enquanto matrizes mais rígidas promovem a miogênese e a osteogênese, dependendo também da composição específica dos meios de cultura. Isso é aplicável na cultura 2D e 3D, uma vez que a variação da rigidez de hidrogéis influencia o comportamento e a atividade das células-tronco encapsuladas (AHEARNE; KELLY, 2013). Park e colaboradores (2011) demonstraram que géis de colágeno de 1 kPa, na presença do fator de diferenciação TGF- β , induziam a diferenciação de células-tronco em condrócitos (AHEARNE; KELLY, 2013; KURPINSKI *et al.*, 2010; PARK, JENNIFER S. *et al.*, 2011; RONKEN *et al.*, 2012).

Embora a cartilagem apresente módulo de compressão entre 2 a 10 MPa, conforme citado anteriormente, a rigidez mais baixa, como dos hidrogéis aqui apresentados, pode ocorrer ao longo do desenvolvimento deste tecido, o que já sinalizaria para este tipo de diferenciação (PARK, JENNIFER S. *et al.*, 2011; WONG; SAH, 2010). Nesse contexto, as formulações de

hidrogéis obtidas seriam indutores da diferenciação, passíveis de utilização na engenharia de tecidos cartilaginosa.

5.8 Capacidade de absorção e perda de massa

Elevadas capacidades de absorção de meio de cultura e de fluidos fisiológicos são requeridas do hidrogel para favorecer a proliferação das células e a síntese da matriz extracelular da cartilagem, todavia, o elevado intumescimento pode levar ao enfraquecimento das propriedades mecânicas dos hidrogéis (SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011) e mesmo à sua dissolução.

Os hidrogéis foram submetidos ao ensaio de capacidade de absorção em água, PBS e meio de cultivo. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Capacidade de absorção dos hidrogéis M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 em PBS, meio de cultivo e água após 24 h a 37 °C.

Hidrogel	Capacidade de Absorção (%)		
	Água	PBS	Meio de cultivo DMEM
M10X1-G5	76,7 ± 0,3 ^b	34,2 ± 7,6 ^a	32,7 ± 3,3 ^a
M10X0,5Q0,5-G5	68,0 ± 11,2 ^b	28,1 ± 6,2 ^a	23,1 ± 4,8 ^a
M10Q1	24,5 ± 2,3 ^a	27,9 ± 4,7 ^a	28,3 ± 1,3 ^a

Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Analisando-se os resultados, observa-se que a capacidade de absorção em PBS e meio de cultivo foram similares em todos os hidrogéis. Tate e colaboradores (2001), analisaram a capacidade de absorção de hidrogéis constituídos por 5% (m/v) de metilcelulose em PBS e verificaram que, em 24 h, os hidrogéis absorviam cerca de 30% de PBS ou meio de cultivo (TATE *et al.*, 2001). Comparando-se estes resultados com os obtidos no presente estudo verifica-se que os valores obtidos corroboram com os encontrados pelos referidos autores. Já para a capacidade de absorção em água, verifica-se que os hidrogéis que contêm goma xantana na composição absorvem mais líquido que o hidrogel produzido na ausência deste polímero. Isso provavelmente se deve ao fato da goma xantana apresentar elevada afinidade pela água, aumentando a capacidade de absorção do hidrogel mesmo quando presente em baixas concentrações.

Esta elevada afinidade por água se deve à estrutura molecular da goma. A goma xantana apresenta uma cadeia principal constituída de celobiose (dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose) e por uma cadeia lateral trissacarídica, composta por duas D-manoses e por um ácido D-glicurônico, ligados a uma das glicoses da cadeia principal por ligações α -1,3 (KUMAR, ANUJ; RAO; HAN, 2018; PETRI, 2015). Aproximadamente metade da D-manose terminal apresenta um resíduo de ácido pirúvico, enquanto a D-manose ligada diretamente à cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6. Estes dois grupos, assim como o ácido D-glicurônico, em pH maior que 4,5, desprotonam, tornando a goma xantana um poliânion e aumentando sua afinidade pela água (PETRI, 2015; WILLIAMS; PHILLIPS, 2003).

Devido à sua forma de produção, a goma xantana, transporta naturalmente íons Ca^{2+} que estabilizam as estruturas de suas hélices. A adição complementar de íons Ca^{2+} até 100% de equivalência estequiométrica pode ocasionar a gelificação da solução. No entanto, acima de 100% de equivalência, começa a ocorrer uma menor reticulação da solução, que pode ser atribuída à substituição parcial das ligações com os íons Ca^{2+} por ligações intramoleculares das carboxilas do ácido D-glicurônico (PETRI, 2015). Como o meio de cultivo DMEM possui íons cálcio em sua composição (200 mg/L), os grupamentos inicialmente livres para se complexarem com a água ficam menos disponíveis, ocasionando uma menor capacidade de absorção deste fluido pelo hidrogel.

Já em relação ao PBS, apesar deste não apresentar íons divalentes em sua composição, possui íons monovalentes que interagem com a água de hidratação, ocasionando a diminuição da interação desta com a molécula de xantana.

Estas capacidades de absorção indicam que todas as formulações podem ser utilizadas para o cultivo de células, pois permitem o acesso de nutrientes que auxiliam a proliferação, a síntese de matriz extracelular e a remoção de metabólitos tóxicos.

A estabilidade *in vitro* dos hidrogéis também foi investigada, uma vez que esta característica é essencial para a aplicação pretendida. Para a engenharia de tecido cartilaginoso, é necessário que o hidrogel se degrade a uma taxa compatível com formação do novo tecido e/ou a uma taxa adequada para que a liberação dos fármacos seja realizada de forma controlada (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING & MATERIALS, 2011).

Os dados de perda de massa são mostrados na Tabela 12. Foram observados valores significativos de perda de massa após a exposição dos hidrogéis em água, PBS e meio de cultivo

a 37 °C por 7 dias. No entanto, todas as formulações apresentaram maior perda de massa em água, uma vez que absorvem este fluido em maior quantidade.

Tabela 12 – Perda de massa dos hidrogéis M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 em água, PBS e meio de cultivo após 7 dias a 37 °C.

Hidrogel	Perda de Massa (%)		
	Água	PBS	Meio de cultivo DMEM
M10X1-G5	63,8 ± 5,2 ^{a, b, c}	44,9 ± 7,8 ^{c, d, e}	36,6 ± 0,0 ^{d, e}
M10X0,5Q0,5-G5	74,6 ± 5,6 ^{a, b}	52,3 ± 4,9 ^{c, d}	52,6 ± 7,8 ^{b, c, d}
M10Q1	76,5 ± 3,9 ^a	39,3 ± 5,6 ^{d, e}	30,0 ± 8,3 ^e

Mesma letra na mesma linha ou coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Analisando-se os hidrogéis de forma individual, pode-se inferir que estes não apresentam perdas de massa estatisticamente diferentes entre as soluções de PBS e de meio de cultivo. Porém, quando se compara os três hidrogéis nestes dois meios, o M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 diferem entre si na perda de massa em meio de cultivo, sendo a perda de massa do hidrogel M10X0,5C0,5-G5 a maior e a em M10Q1, a menor. Liu e Yao (2015) verificaram que hidrogéis compostos por 10% e 12% (m/v) de metilcelulose apresentaram perdas de massa de cerca de 50% e 44% em PBS, respectivamente. Os autores relataram que esta perda de massa pode ser devida à degradação do gel (LIU, ZHIJIA; YAO, 2015). Além disso, os autores avaliaram hidrogéis de metilcelulose com diferentes quantidades de goma xantana e verificaram que as taxas de erosão desses hidrogéis não eram sensíveis à concentração de xantana, o que também corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

A degradação do hidrogel concomitante à síntese de matriz extracelular é um critério importante para bons resultados na engenharia de tecidos. Um dos desafios é que o tamanho dos poros do hidrogel, que encapsula as células, é geralmente menor que o tamanho de muitas moléculas da ECM que compõem a cartilagem (CHU *et al.*, 2016). Por exemplo, a cartilagem é composta predominantemente por duas moléculas: os agreganos, que podem atingir massas molares de aproximadamente 1 a 3 MDa, e o colágeno tipo II, que pode atingir micrômetros de comprimento (CHU *et al.*, 2016). Como resultado, essas moléculas de grande tamanho são incapazes de se difundirem e depositarem no interior de um hidrogel reticulado. Assim, para formar um tecido macroscópico sem perda completa do suporte mecânico, as taxas de degradação do hidrogel devem se aproximar das taxas de síntese da ECM (CHU *et al.*, 2016).

Essa degradação geralmente é advinda da solubilização de moléculas que compõem o hidrogel no meio aquoso, mas também pode ocorrer por meio de ação enzimática. Os hidrogéis sensíveis às enzimas fornecem ambiente tridimensional que pode ser degradado por estas proteínas produzidas pelos próprios condrócitos encapsulados, de forma semelhante ao que ocorre na matriz extracelular nativa (CHU *et al.*, 2016). Vários estudos relatam bons resultados com a utilização de hidrogéis sensíveis às enzimas na engenharia de tecido cartilaginoso. Por exemplo, condrócitos incorporados em hidrogel sensível à metaloproteinase do tipo 2 produziram mais ECM do que quando incorporados em hidrogéis não degradáveis por essas enzimas (SRIDHAR *et al.*, 2015). Estudos de longa duração (12 semanas) demonstraram aumento da deposição e produção de ECM em hidrogel sensível à agreganase contendo condrócitos encapsulados (SKAALURE; CHU; BRYANT, 2015).

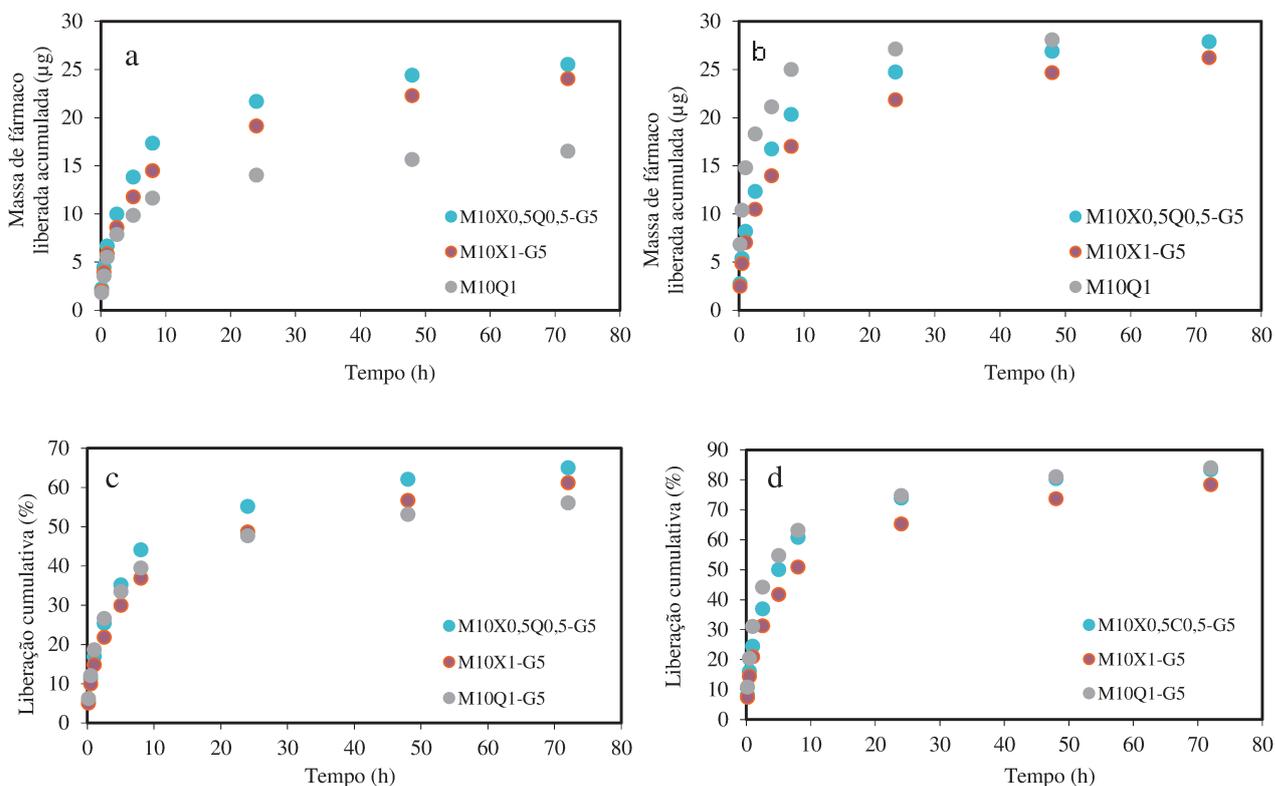
Assim, *in vivo*, a degradação dos hidrogéis pode ser aumentada devido a presença de enzimas, o que pode, de fato, ser benéfico no que diz respeito à deposição e produção de matriz extracelular, favorecendo a substituição do hidrogel na região da lesão por neotecidos.

5.9 Liberação controlada dos fármacos

A avaliação direta da concentração dos fármacos liberados por espectrofotometria de absorção de luz não se mostrou eficaz devido os três fármacos apresentarem comprimentos de onda similares (comprimentos de onda de, respectivamente 205, 220 e 276 nm para ácido gálico, dexametasona e diclofenaco de sódio). Assim, realizou-se a análise de liberação do ácido gálico a partir das três diferentes matrizes através do método de Folin-Ciocalteu, mas também não se detectou liberação suficiente deste composto em PBS (limite mínimo de detecção do método empregado de 1 µg/mL) concluindo-se, portanto, também com base nas análises de FT-IR, que a carboximetil quitosana e o ácido gálico interagem fortemente, de modo que o fármaco fica retido na matriz polimérica.

A quantificação da dexametasona e do diclofenaco de sódio liberados *in vitro* nos três tipos de hidrogéis foi analisada através de metodologias de HPLC específicas desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da UNICAMP para este fim. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 28.

Figura 28 – Cinética de liberação de dexametasona e diclofenaco de sódio dos hidrogéis M10X1-G5, M10X0,5Q0,5-G5 e M10Q1 expressa em termos da variação da concentração dos fármacos no fluido receptor PBS a cada momento para dexametasona (a) e diclofenaco de sódio (b) e em termos da fração cumulativa liberada para dexametasona (c) e diclofenaco de sódio (d).



Os hidrogéis M10X0,5Q0,5-G5 e M10X1-G5 apresentaram liberação mais rápida de dexametasona em comparação com o hidrogel M10Q1 (Fig. 28a). Isto ocorreu, provavelmente, devido ao alto grau de intumescimento que os hidrogéis que contêm goma xantana apresentam e à potencial degradação da matriz polimérica. Após as 72 h, todos os hidrogéis foram capazes de liberar de 56 a 65% da quantidade total de dexametasona incorporada (Fig. 28c).

Como mostrado na Fig. 28b, a liberação de diclofenaco de sódio foi similar em todos os tipos de hidrogéis. A liberação cumulativa foi de cerca de 88% nos hidrogéis M10X0,5C0,5-G5 e M10Q1 e aproximadamente 82% no hidrogel M10X1-G5. Provavelmente, o diclofenaco apresenta interação mais acentuada com a goma xantana, conforme indicado na análise de FT-IR.

Khodaverdi e colaboradores (2013) sintetizaram um hidrogel termorresponsivo composto pelo copolímero tri-bloco PLGA-PEG-PLGA para a liberação controlada de dexametasona. De forma geral, após 100 h foram liberados cerca de 50 a 60% da dexametasona

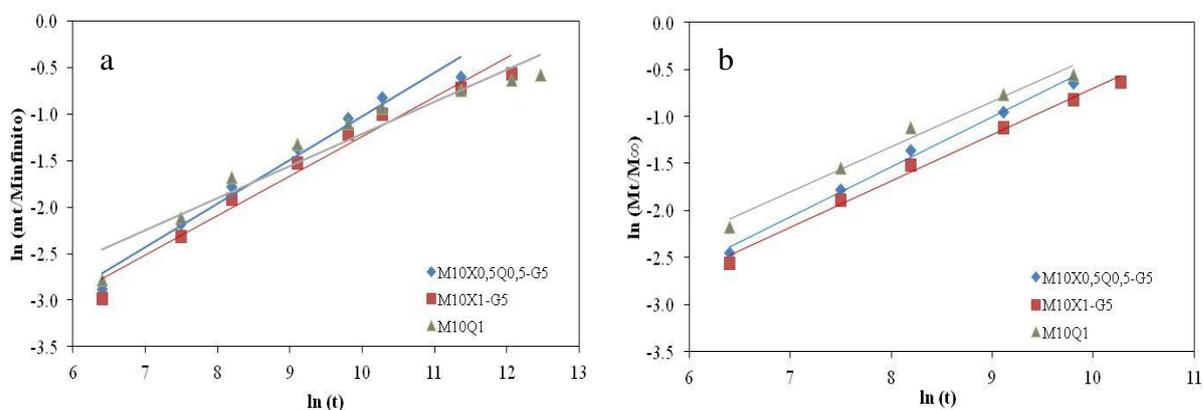
para o meio, dados próximos aos obtidos no presente estudo. Os autores também investigaram o mecanismo de liberação do fármaco, concluindo que a erosão polimérica foi o principal mecanismo de liberação.

Como a meia-vida de moléculas pequenas como a dexametasona e o diclofenaco sódico tem sido descrita em torno de 1 a 2 h na forma livre (CHIESA *et al.*, 2018), a liberação controlada de 72 h obtida neste estudo pode ser considerada satisfatória.

Para determinar o mecanismo de liberação dos fármacos, os dados compreendidos na faixa de até 60% de liberação foram ajustados ao modelo matemático de Korsmeyer-Peppas. Para todas as formulações foi plotado o gráfico $\ln(M_t/M_\infty)$ versus $\ln(t)$, conforme apresentado na Figura 29. Com a linearização, o expoente difusional n foi obtido a partir do coeficiente angular das retas enquanto a constante difusional k foi calculada a partir do coeficiente linear, os quais se encontram apresentados na Tabela 13.

Pode-se observar que os coeficientes de determinação (R^2) indicam, de forma geral, bons ajustes ao modelo, com valores de R^2 superiores a 0,97, com exceção do obtido para a formulação M10Q1, com R^2 de 0,9315 para a liberação de dexametasona. Considerando que os hidrogéis utilizados tinham formato cilíndrico com diâmetro de 2,1 cm e altura de 2,9 mm (volume de 1 mL), suas dimensões e formato os colocam entre filmes e cilindros, de forma que para a análise do significado dos parâmetros obtidos baseou-se nos valores de referência de ambos reportados para o modelo.

Figura 29 – Curvas $\ln(M_t/M_\infty)$ versus $\ln(t)$ para as três formulações de hidrogéis para obtenção dos parâmetros do modelo matemático de Kormeyer-Peppas para a dexametasona (a) e para o diclofenaco de sódio (b).



Para cilindros, quando os valores de n encontram-se abaixo de 0,45, a liberação é descrita por difusão quase Fickiana (difusão parcialmente através da matriz e parcialmente através de poros cheios de solução receptora, PBS). Se n é igual a 0,45, ocorre difusão Fickiana. Valores de n entre 0,45 e 0,89 indicam cinética de transporte anômala, que é descrita como uma combinação de mecanismos de degradação e de difusão (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). Quando n é 0,89, a equação indica cinética de liberação de ordem zero, a qual é controlada pelo fenômeno de intumescimento polimérico, relacionado ao relaxamento ou degradação da matriz.

Para filmes, por outro lado, quando os valores de n encontram-se abaixo de 0,5, a liberação é descrita por difusão quase Fickiana (difusão parcialmente através da matriz e parcialmente através de poros cheios de PBS). Se n é igual a 0,5, ocorre difusão Fickiana. Valores de n entre 0,5 e 1,0 indicam cinética de transporte anômala, que é descrita como uma combinação de mecanismos de degradação e de difusão (SIEPMANN; SIEPMANN, 2008). Quando n é igual a 1, a equação indica cinética de liberação de ordem zero, a qual é controlada pelo fenômeno de intumescimento polimérico, relacionado ao relaxamento ou degradação da matriz.

Tabela 13 - Parâmetros e coeficiente de determinação calculados segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas para a cinética de liberação de dexametasona e diclofenaco de sódio dos diferentes hidrogéis.

Formulação	Dexametasona			Diclofenaco de Sódio		
	n	$k (s^{-n})$	R^2	n	$k (s^{-n})$	R^2
M10X0,5Q0,5-G5	0,46	0,0033	0,9749	0,53	0,0031	0,9928
M10X1-G5	0,42	0,0041	0,9710	0,49	0,0037	0,9922
M10Q1	0,34	0,0095	0,9315	0,48	0,0057	0,9824

Nesse sentido, todos os hidrogéis, para os dois fármacos, apresentam liberação por mecanismo primordialmente difusivo, visto que seus valores de n estão nas imediações de 0,45 a 0,5. A formulação M10X0,5Q0,5-G5 contendo diclofenaco de sódio parece sofrer também efeito de intumescimento, enquanto as matrizes M10X1-G5 e M10Q1 contendo dexametasona liberam o fármaco por difusão parcialmente através da matriz e parcialmente através de poros cheios de solução tampão. Este mecanismo de liberação proposto corrobora os dados anteriores de capacidade de absorção. Entretanto, embora o modelo não indique fragmentação das

matrizes, verificou-se que todos os hidrogéis mostram perda de massa significativa em PBS após 7 dias. Possivelmente no tempo do estudo de liberação, de 72 h, este fator não foi preponderante.

Apesar de haver uma gama de outros modelos disponíveis na literatura, a opção pelo uso inicial do modelo de Korsmeyer e Peppas justifica-se pela aplicabilidade diagnóstica deste modelo, que dá indicações dos mecanismos predominantes na liberação por meio de uma análise bastante simplificada. Os modelos desenvolvidos por Higuchi, por exemplo, são voltados para a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes semissólidas e/ou sólidas, sendo aplicáveis para matrizes planas ou esféricas (COSTA, 2002). O uso do modelo de Hixson-Crowel também poderia se mostrar interessante no âmbito deste trabalho, uma vez que descreve o perfil de liberação em relação à dissolução da matriz, o que foi verificado neste trabalho com os dados de perda de massa, entretanto, a desestabilização da matriz somente se intensifica nos tempos mais longos do estudo. Além disso, este modelo matemático se aplica a dispositivos com formas esféricas, levando em consideração que a área de uma partícula regular é proporcional à raiz cúbica do seu volume (COSTA, 2002).

A modelagem matemática da liberação de fármacos a partir de matrizes cilíndricas é descrita na literatura, mas há escassez de soluções analíticas devido à complexidade das equações diferenciais parciais resultantes destes sistemas.

5.10 Teste de viabilidade celular indireto (MTT)

A citotoxicidade dos extratos obtidos a partir dos hidrogéis poliméricos às células-tronco mesenquimais dentárias foi analisada por via indireta, a partir da exposição dessas células aos extratos obtidos em 24 e 48h. Os resultados são mostrados na Figura 30.

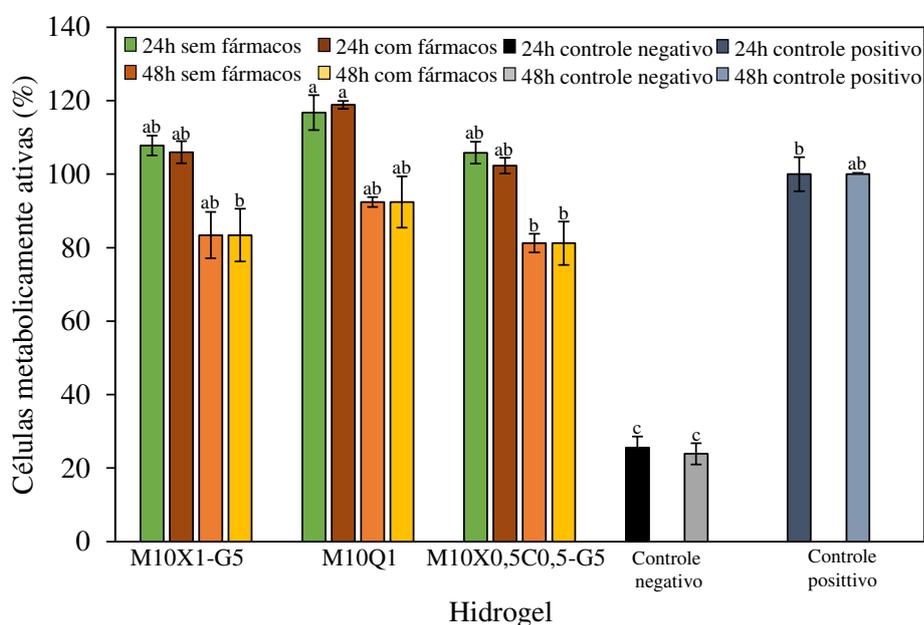
De acordo com o padrão ISO 10993-5 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009), pode-se inferir que os hidrogéis não afetam de maneira expressiva o crescimento celular, com exceção do hidrogel M10Q1 quando exposto ao extrato de 24 h, que difere do controle positivo de 24 h, indicando crescimento celular. Tang e colaboradores (2010) produziram um hidrogel de metilcelulose com quitosana na presença de fosfato de sódio. Após cultivarem células-tronco mesenquimais no hidrogel por 21 dias em meio condrogênico, verificaram que a viabilidade celular não era afetada e que as células

proliferavam ao longo do tempo, o que corrobora com os dados obtidos para o hidrogel M10Q1 (TANG, YUFENG *et al.*, 2010).

Já Tate e colaboradores (2001) analisaram a biocompatibilidade de hidrogéis compostos por diferentes concentrações de metilcelulose e de solução fosfato salina. Os pesquisadores demonstraram que tanto células corticais quanto células neurais cultivadas por 7 dias nos hidrogéis não apresentaram redução significativa na porcentagem de células viáveis quando comparadas com o controle, exceto para a formulação contendo 8% (m/v) de metilcelulose em D-PBS 5x concentrado, confirmando os dados obtidos no presente estudo.

Em síntese, os valores de viabilidade encontrados indicam que todos os suportes poliméricos produzidos possuem potencial uso como *scaffolds* para células-tronco mesenquimais dentárias na engenharia de tecido cartilaginoso.

Figura 30 - Análise de atividade mitocondrial com o indicador MTT das células cultivadas com os extratos obtidos ao longo de 24 ou 48 h dos hidrogéis M10X1-G5, M10Q1 e M10X0,5Q0,5-G5 contendo ou não os três fármacos. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).



5.11 Ensaio de viabilidade celular direto por microscopia confocal

O cultivo das células-tronco mesenquimais dentárias foi realizado diretamente nos hidrogéis M10X0,5Q0,5-G5 + F, M10X1-G5 + F e M10Q1+F e, após 7 dias, o sistema foi analisado em microscópio confocal com os corantes calceína (AM) e brometo de etídeo. As

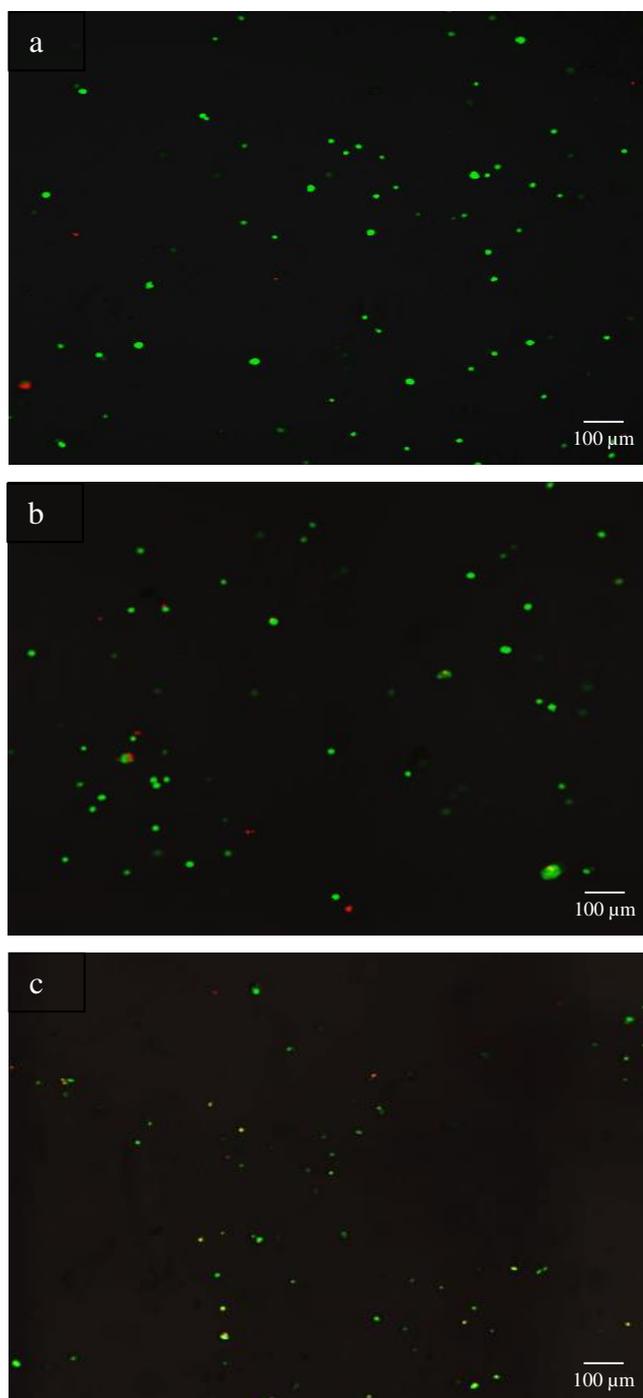
células também foram cultivadas nos hidrogéis sem os fármacos, porém, durante a etapa de lavagem com PBS, os hidrogéis sofreram dissolução, impossibilitando a análise. Este fato não ocorreu com os hidrogéis com os fármacos provavelmente devido à reticulação dos géis com o ácido gálico. As imagens obtidas estão sumarizadas na Figura 31.

Pode-se observar que em todos os hidrogéis há uma quantidade expressiva de células verdes, indicando viabilidade das mesmas. De forma oposta, observa-se baixa quantidade de células vermelhas, consideradas como células mortas, nos três hidrogéis analisados. A formulação M10X1-G5 parece apresentar células menores, mas estas células foram encontradas na parte inferior deste hidrogel, o que explica o tamanho mais reduzido em função da maior distância focal na análise.

Payne e colaboradores (2017) desenvolveram hidrogéis à base de metilcelulose combinada com colágeno e beta-glicerofosfato para engenharia de tecidos. A fim de verificar a citotoxicidade direta desses hidrogéis em relação às células-tronco mesenquimais de medula óssea humana, os pesquisadores cultivaram essas células diretamente nos hidrogéis durante 7 dias (PAYNE *et al.*, 2017). Os autores não verificaram citotoxicidade dos hidrogéis após este tempo de cultivo, corroborando com os resultados obtidos.

Em outro trabalho, Gold e colaboradores (2015) produziram hidrogéis injetáveis com propriedades reversíveis de metilcelulose modificada com grupos metacrilato funcionais através de polimerização por um sistema de iniciação redox de persulfato de amônio com ácido ascórbico. A citotoxicidade desses hidrogéis foi avaliada através do cultivo de fibroblastos dérmicos humanos neonatais na presença dos hidrogéis. A citotoxicidade foi avaliada usando o kit Live/Dead (Invitrogen) nos dias 1 e 4, não sendo também observadas quaisquer alterações na viabilidade celular (GOLD *et al.*, 2015).

Figura 31 – Microscopia confocal realizada com os reagentes LIVE/DEAD após cultivo das DPSCs nos hidrogéis M10X0,5Q,5-G5 + F (a), M10X1-G5 + F (b) e M10Q1+F (c) por 7 dias. Foi utilizada a objetiva de 40x para a captura das imagens.



5.12 Análises quantitativas de diferenciação celular dos hidrogéis cultivados diretamente em placa de 96 poços

Nesta etapa, foram utilizadas as células-tronco humana derivadas da polpa dentária, conforme previamente descrito. Durante o cultivo dessas células, alguns desafios foram identificados. Primeiramente, a obtenção do elevado número de células requerido para o ensaio, em torno de 10^7 células/mL, foi laboriosa, uma vez que o número de experimentos e replicatas adotadas eram bastante elevados. Há diversas maneiras de se realizar o cultivo de células em maior escala, como através de *spinner*, *roller bottles* e em biorreator do tipo *wave*, porém os ensaios foram realizados em garrafas tipo T, amplamente utilizadas nos laboratórios envolvidos no estudo. Foram necessárias 32 garrafas do tipo T de 175 cm^2 para a execução de todos os experimentos previstos. Devido a isso e à baixa disponibilidade de células congeladas para a etapa de inoculação, as mesmas foram utilizadas na 13^a passagem.

De forma geral, recomenda-se utilizar passagens inferiores à terceira, uma vez que as células-tronco começam a apresentar baixa expansão e diminuição do potencial de diferenciação. Entretanto, dificuldades como as mencionadas no parágrafo anterior são problemas comuns no cultivo laboratorial de células-tronco, e por esta razão, esta questão tem sido explorada por diversos autores, com vistas a determinar até que ponto uma dada linhagem pode ser cultivada sem prejuízos às funções dela esperadas.

Por exemplo, foi já demonstrado que células-tronco derivadas da medula óssea apresentam encurtamento dos telômeros e alterações morfológicas no decorrer das passagens (IZADPANAHI *et al.*, 2008).

Em um estudo mais recente, foi comparada a capacidade de diferenciação neural de células-tronco da medula óssea na quarta e quadragésima passagem. Os resultados indicaram que, em ambas as passagens, as células-tronco exibiram expressão positiva de marcadores neuronais e dopaminérgicos, liberaram dopamina e exibiram atividade neuronal espontânea (SHALL *et al.*, 2018). Entretanto, na quarta passagem as células exibiram formação de rede neural significativamente maior que as células na quadragésima passagem (SHALL *et al.*, 2018).

Yang e colaboradores (2018) também analisaram a influência do número de passagens em células-tronco derivadas da medula óssea. As células foram manipuladas até a oitava passagem e analisadas a cada passagem quanto a diversos aspectos. As CTMs perderam gradualmente a forma típica de fuso semelhante a fibroblastos no decorrer das passagens,

levando a anormalidades morfológicas. Verificou-se também que a taxa de duplicação celular diminuiu ao longo do tempo e que a expressão do marcador de células-tronco CD146 diminuiu com o aumento do número de passagens somente quando as CTMs foram cultivadas em meio DMEM. As CTMs nas passagens 4 e 8 foram capazes de se diferenciar em células semelhantes a adipócitos, enquanto a osteogênese das CTMs na passagem tardia foi significativamente comprometida (YANG *et al.*, 2018).

Assim, pode-se inferir que CTMs em passagens menores são mais eficientes na diferenciação celular *in vitro*, porém células em passagens maiores também são capazes de se diferenciar. Naturalmente, o comportamento celular é dependente da composição do meio de cultura e também da própria origem das células, dentre outros fatores.

No caso de células extraídas da polpa dentária, diversos trabalhos comparam o comportamento destas em diferentes passagens. Wang e colaboradores (2018), por exemplo, compararam as propriedades biológicas de SHEDs e DPSCs nas passagens 4 e 20. As células atingiram o estado de senescência após expansão até a vigésima passagem, uma vez que foram verificadas alterações morfológicas, diminuição da capacidade de proliferação e migração, diminuição do potencial de diferenciação e aumento da apoptose celular. A expressão de marcadores de senescência também aumentou de forma significativa com o aumento do número de passagens. Entretanto, ambos os tipos celulares mantiveram baixa imunogenicidade durante o cultivo a longo prazo (WANG, HUIHUI *et al.*, 2018).

Patel e colaboradores (2009) também compararam as propriedades das células-tronco da polpa dentária em diferentes passagens. Primeiramente, os pesquisadores determinaram o protocolo de extração mais eficiente, o qual indicou que a incubação do tecido pulpar triturado mecanicamente com 0,25% de Tripsina/EDTA e cultura subsequente em meio α -MEM forneceu condições ideais para crescimento e expansão celular. As culturas foram analisadas quanto à expressão gênica, proliferação, morfologia e capacidade de diferenciação até a vigésima passagem. Os autores verificaram que ocorreu diminuição da capacidade proliferativa das células até a sétima passagem. Contudo, após esta passagem, as células recuperaram seu potencial proliferativo, demonstrando altas taxas de crescimento até a vigésima passagem. Em relação ao potencial de diferenciação, a expressão gênica de marcadores osteogênicos e dentinogênicos diminuiu com o aumento do número de passagens. Mas, em contrapartida, a expressão de TGF- β -1, -2 e -3 aumentou até a décima passagem, assim como os marcadores de células-tronco (PATEL *et al.*, 2009).

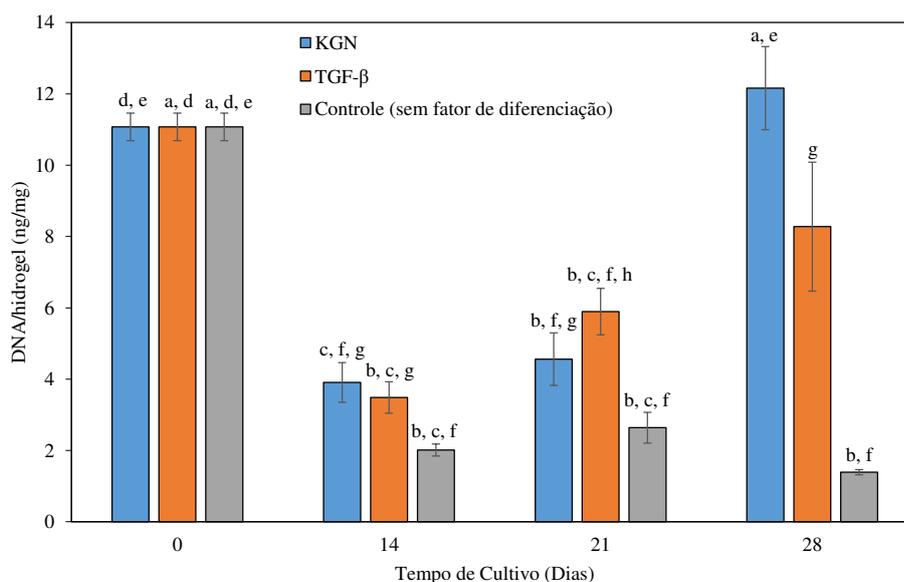
5.12.1 Digestão dos hidrogéis com papaína

Após realizada a digestão dos hidrogéis, obteve-se uma mistura homogênea, a qual foi utilizada nas etapas posteriores de quantificação de DNA e GAGs.

5.12.2 Quantificação de DNA por fluorescência

As quantidades de DNA determinadas normalizadas pela massa de hidrogel são mostradas na Figura 32.

Figura 32 – Quantificação de DNA pelo ensaio PicoGreen das DPSC cultivadas no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 + F nos tempos 0, 14, 21 e 28 dias. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).



Analisando o gráfico gerado, pode-se inferir que após 14 dias de cultivo as quantidades celulares decaem em torno de 3 vezes em comparação ao início do experimento (dia 0). A hipótese levantada foi de que essas células foram liberadas do hidrogel, uma vez que o hidrogel apresenta alta capacidade de absorção de fluidos, possibilitando a migração das células para regiões mais próximas da borda do hidrogel ou mesmo para o meio de cultura externo a ele. Além disso, deve-se considerar também a perda de massa apresentada pelo hidrogel, que concomitantemente contribuiria com essa redução celular.

Assim, em consequência das múltiplas trocas periódicas de meio de cultura requeridas ao longo do cultivo e de potenciais perdas de material por degradação, as células que migraram para as regiões próximas à superfície do gel ou para o meio foram subsequentemente removidas e descartadas do sistema. A morte celular também poderia ser uma causa da redução da quantidade de DNA, porém os ensaios de citotoxicidade indicam que as células incorporadas no hidrogel permanecem metabolicamente ativas.

Kim e colaboradores (2016) verificaram características similares. Os pesquisadores produziram hidrogéis termorresponsivos de metilcelulose combinado com matriz extracelular (ECM) solúvel de tecido adiposo humano para o tratamento de feridas de pele. Neste hidrogel, os autores incorporaram células-tronco de tecido adiposo (hASC), sendo o conjunto aplicado sobre lesões de pele profundas. Os pesquisadores sugeriram que, devido à degradação do hidrogel, células e fragmentos de ECM foram liberados na lesão, auxiliando a geração de uma nova matriz em feridas de pele, observando que, após 7 dias de tratamento, o tamanho da lesão do grupo tratado com hidrogel embebido com as hASC ($37,6 \pm 5,9\%$) foi significativamente menor quando comparado com o grupo sem tratamento ($65,9 \pm 4,4\%$) e com o grupo tratado com o hidrogel na ausência de células ($57,4 \pm 4,5\%$) (KIM *et al.*, 2016).

Analisando os tempos de cultivo de 21 e 28 dias, nota-se que as células que ficaram retidas nos hidrogéis cultivados nos meios condrogênicos se multiplicaram, visto o aumento da quantidade de DNA. Entretanto, as células que ficaram retidas no hidrogel cultivado somente em meio suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino não mantiveram o mesmo padrão de crescimento. Isso pode ser explicado pelo fato de os fatores de diferenciação propiciarem um ambiente adequado para o crescimento celular. Segundo Lum e colaboradores (2005), células animais são influenciadas por fatores extrínsecos que promovem sinais para ativação da proliferação e do crescimento celular. Na ausência desses sinais, como no caso do controle negativo do presente ensaio, o crescimento e divisão celular cessam, e a morte celular programada se inicia (LUM *et al.*, 2005).

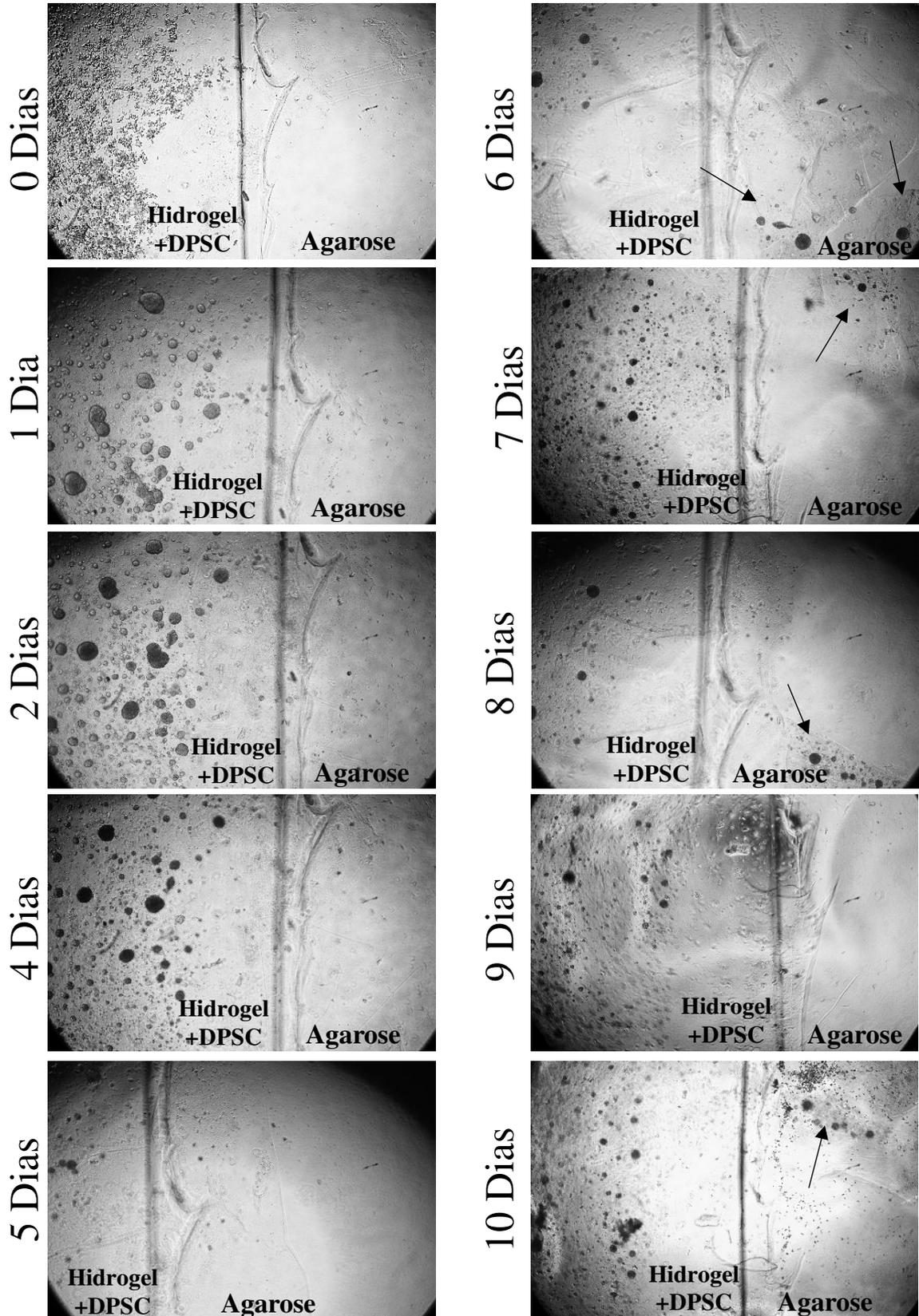
5.12.3 Migração das células DPSCs no hidrogel

Com o intuito de analisar o comportamento e a migração celular no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5, o conjunto foi acompanhado em microscópio óptico por 10 dias. As imagens registradas encontram-se compiladas na Figura 33.

Pode-se observar que no dia 0, as células se apresentavam distribuídas de forma praticamente individual, contudo, já no dia 1, as células iniciaram um movimento migratório que culminou na formação de agregados celulares. Até o dia 5, observa-se que esses agregados ficaram cada vez mais densos, indicando que mais células estavam se aglomerando ou que as células formadoras do agregado estavam se multiplicando. No dia 6, verifica-se que parte do hidrogel se soltou (indicado pelas setas), deslocando-se sobre a agarose e levando consigo alguns dos agregados celulares formados. Este fato corrobora com a hipótese levantada de que parte das células eram descartadas com as trocas periódicas de meio de cultivo. A imagem do tempo de 8 dias deixa tal fato mais evidente (também indicado pelas setas).

Apesar de não se verificar migração celular para a agarose, a qual seria um hidrogel mais atrativo, a observação da formação de agregados celulares é de grande valia no que diz respeito à condrogênese. A diferenciação de células-tronco em condrócitos intercorre em diferentes estágios, sendo primeiramente realizada adesão entre as células, seguida de proliferação/diferenciação e diferenciação/hipertrofia (VINATIER; GUICHEUX, 2016). A adesão celular é iniciada quando as células-tronco mesenquimais passam pela chamada condensação, processo assistido pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, como fibronectinas e N-caderinas, e também pela produção de TGF- β . Após a condensação, as células iniciam o estágio de proliferação e diferenciação, secretando assim os componentes da matriz extracelular do tecido cartilaginoso, como colágeno tipo II e glicosaminoglicanos sulfatados (STUDER *et al.*, 2012). Dessa forma, tal evidência indica que o hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 é atrativo na condrogênese celular.

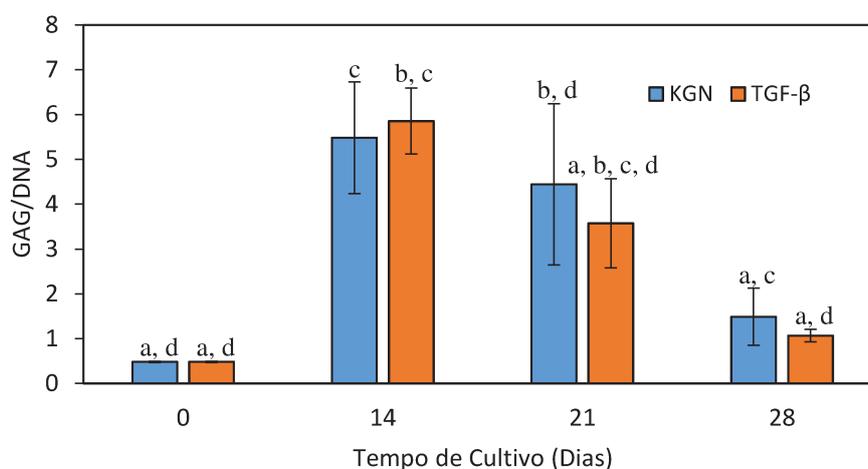
Figura 33 – Imagens obtidas durante o cultivo das DPSCs no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 por 10 dias em conjunto com agarose. O risco central refere-se ao corte da agarose realizado com lâmina para retirada de parte deste polímero. As setas mostram partes de hidrogel com células que se soltaram durante o cultivo.



5.12.4 Quantificação de glicosaminoglicanos

As quantidades de GAGs determinadas e normalizadas pela quantidade de DNA são mostradas na Figura 34.

Figura 34 – Quantificação de GAG pelo ensaio de DMMB das DPSC cultivadas no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 + F nos tempos 0, 14, 21 e 28 dias. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).



Os controles realizados com meio de cultivo suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino apresentaram elevada concentração de GAG em todos os tempos de cultivo (dados não mostrados), resultado que divergia do esperado. Segundo Warren (2000), o reagente DMMB pode apresentar uma interferência com amostras ricas em soro, o que explica o resultado anômalo encontrado (Warren, 2000). Dessa forma, o controle foi excluído do gráfico com o intuito de facilitar a análise.

Ocorreu produção de glicosaminoglicanos sulfatados nos períodos de 14 e 21 dias, conforme esperado. Naderi-Meshkin e colaboradores (2014) obtiveram resultados similares quando encapsularam células-tronco humanas e de ratos da medula-óssea em hidrogéis termorresponsivos constituídos de quitosana reticulada com β -glicerofosfato e hidroxietil celulose (CH-GP-HEC). Após cultivo dessas células no hidrogel com meio suplementado com TGF- β , os autores verificaram produção de proteoglicanos já no tempo de 14 dias pelo ensaio de DMMB (NADERI-MESHKIN *et al.*, 2014).

Todavia, a quantidade de GAGs do presente ensaio decresceu no tempo de 28 dias. Este fato pode estar relacionado com a hipertrofia de condrócitos. Alguns condrócitos localizados

em diferentes zonas do tecido cartilaginoso podem começar a secretar Ihh (indutor de hipertrofia celular). Este tipo de condrócito passa a ser chamado de hipertrófico, o qual apresenta aumento de volume e secreta colágeno tipo X, metaloproteinase 13 (MMP-13) e VEGF. Cada uma dessas substâncias possui um diferente papel, como a degradação de colágeno tipo II e de GAGs pelas MMP-13, a proliferação de condrócitos não hipertróficos e produção de colágeno tipo X pelas Ihh (STUDER *et al.*, 2012).

Este contexto poderia explicar o aumento da quantidade de DNA encontrada ao passo que a quantidade de GAGs decresce.

5.13 Análises citoquímicas dos hidrogéis cultivados com células-tronco mesenquimais dentárias

As imagens de microscopia obtidas são mostradas na Figura 35. Comparando-se as imagens citoquímicas dos hidrogéis cultivados com TGF- β 3 ou com Kartogenina, não se identificou diferença na tonalidade da coloração, indicando que não há diferenças entre os dois fatores em respeito à produção de glicosaminoglicanos, o que também corrobora com os dados quantitativos obtidos pelo ensaio de DMMB. Estes dados também são mostrados por Valiani e colaboradores (2018).

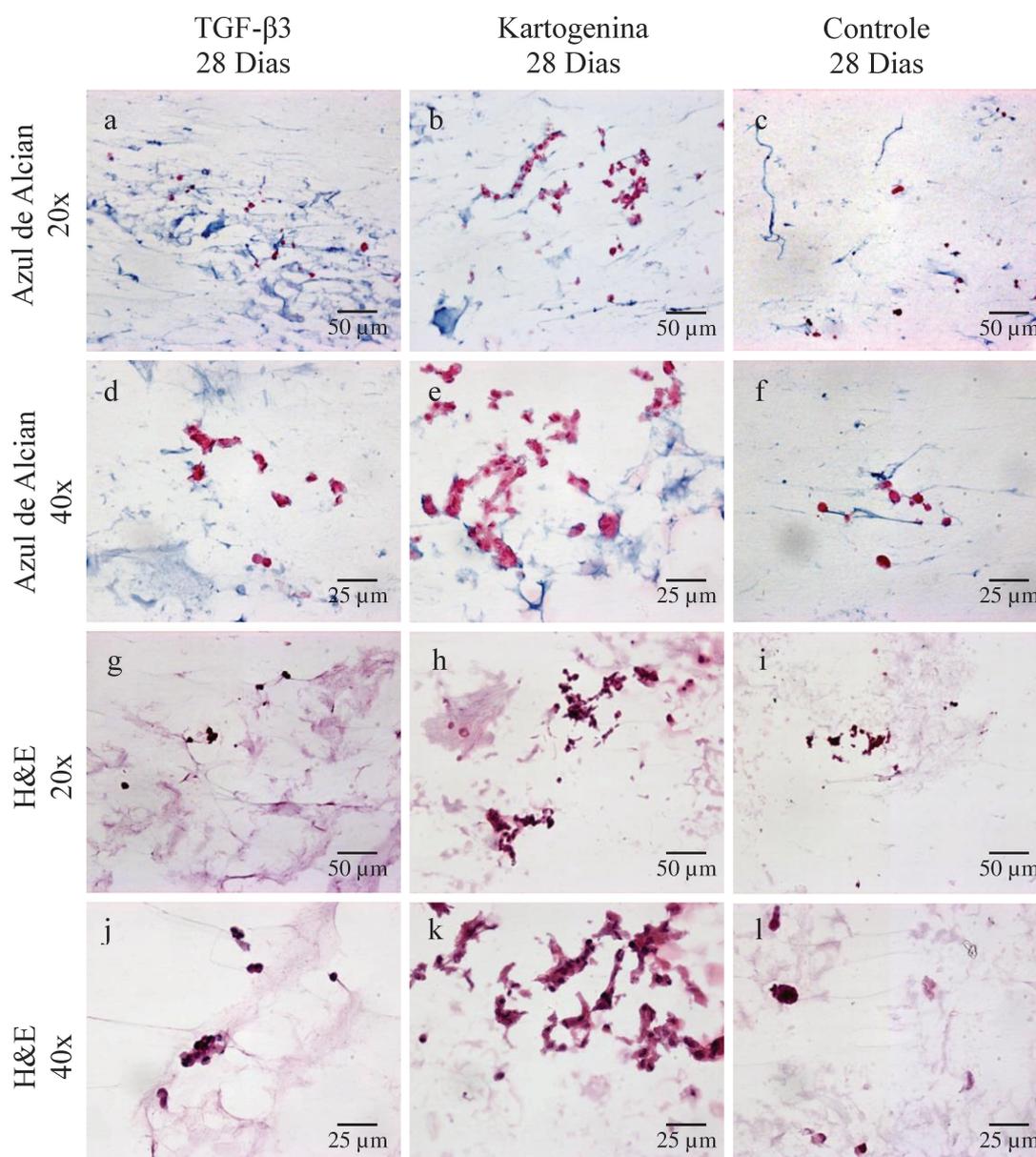
Estes pesquisadores compararam os fatores de crescimento Kartogenina e TGF- β na diferenciação de células-tronco adiposas em condrócitos quando cultivadas em *scaffolds* constituídos de fibrina. Através de análises citoquímicas e de PCR em tempo real, os autores revelaram que as células cultivadas tanto com Kartogenina quanto com TGF- β apresentaram produção de GAGs similares (VALIANI *et al.*, 2018).

Já a coloração realizada nos hidrogéis com hematoxilina e eosina (Figura 35 g-l) revelou que as células encapsuladas adotaram morfologia aproximadamente circular, mas não se distribuíram homogeneamente no hidrogel. Isso provavelmente ocorreu devido à migração das células no interior dos hidrogéis, conforme discutido anteriormente.

A morfologia circular também pode ser considerada um indicativo de diferenciação condrogênica. Durante a morfogênese, as células-tronco passam por mudanças dramáticas no que diz respeito aos seus formatos à medida que se diferenciam em distintas linhagens. As células osteogênicas, por exemplo, inicialmente assumem morfologia achatada quando começam a calcificar a matriz, enquanto que as células condrogênicas se agrupam nos estágios

iniciais de diferenciação, apresentando morfologia circular (GAO; MCBEATH; CHEN, 2010). Em contraste, quando condrócitos são retirados da cartilagem articular condensada e cultivados em substratos planos, os marcadores específicos de condrócitos são regulados negativamente, ou seja, as células se dediferenciam (BENYA; PADILLA; NIMNI, 1978). Assim, a morfologia circular apresentada pelas células nas imagens citoquímicas pode ser considerada mais um indicativo de diferenciação condrogênica.

Figura 35 – Análises citoquímicas dos hidrogéis cultivados por 28 dias em meio condrogênico suplementado com TGF- β ou com Kartogenina, corados com azul de Alcian e H&E.



Apesar da liberação das células-tronco ser um fator positivo em relação à engenharia de tecido cartilaginoso, as análises *in vitro* de diferenciação são prejudicadas, uma vez que o menor número de células, assim como a falta de homogeneidade de distribuição celular, interfere na capacidade de diferenciação e mesmo na detecção das células remanescentes.

Para contornar essas dificuldades, foi proposto pelo grupo do *Trinity College Dublin* realizar o cultivo das células no hidrogel dentro de poços preparados com agarose através de um molde produzido por impressão 3D. Todavia, como o número de células é elevado e a disponibilidade das células da polpa dentária humana era baixa, optou-se por utilizar as células-tronco da medula óssea porcina disponíveis no laboratório da Irlanda em maior concentração.

As células porcinas apresentam algumas vantagens frente às hDPSC, sendo possível obter o dobro do número de células por garrafa, o que implica em economia de reagentes e tempo de bancada. Soma-se a isso o fato das células porcinas serem mais facilmente obtidas em laboratório, o que também afeta diretamente o custo final do experimento e possibilita a utilização de passagens mais baixas.

5.14 Cultivo das células-tronco da medula óssea porcina no hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 confinado em molde de agarose

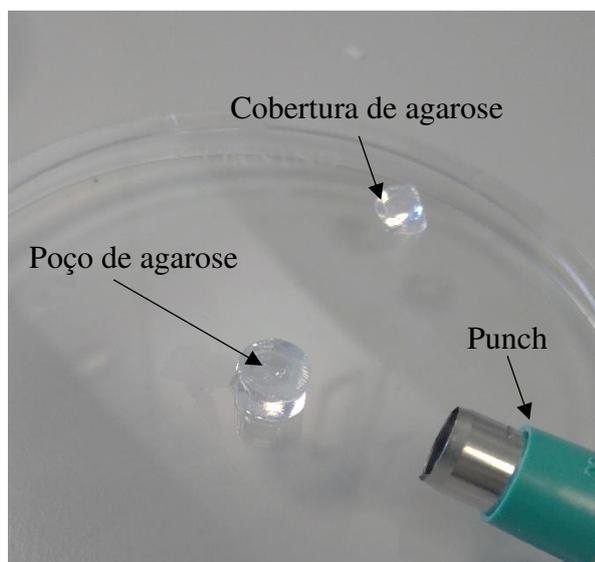
Foram preparados 4 moldes de agarose, utilizando o mesmo molde positivo estéril. Durante o preparo, algumas dificuldades foram encontradas, como a ineficiência de produção, visto a disponibilidade de um único molde para a produção de quatro grupos e, devido à concentração de agarose ser relativamente baixa para que fossem produzidos moldes com poros maiores, que possibilitavam a entrada de meio de cultivo até os hidrogéis, alguns dos materiais moldados sofreram ruptura durante o processo de desmoldagem e remoção.

O hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 foi preparado mais concentrado visando a diluição futura que ocorreria com a adição das células ao sistema. Com isso, o hidrogel apresentou elevada viscosidade, sendo necessárias diversas homogeneizações para se obter uma solução uniforme, o que pode ter causado excessivo cisalhamento nas células-tronco porcinas.

Após a adição dos hidrogéis com células aos poços de agarose e gelificação do sistema, adicionou-se 10 mL de agarose a 37 °C no topo dos hidrogéis para confinar os mesmos.

As amostras do hidrogel foram coletadas em diferentes tempos através de um punch de 8 mm estéril, conforme observado no exemplo da Figura 36. O material coletado foi analisado por meio do ensaio de LIVE/DEAD.

Figura 36 – Punch de 8 mm, poço de agarose e cobertura de agarose.

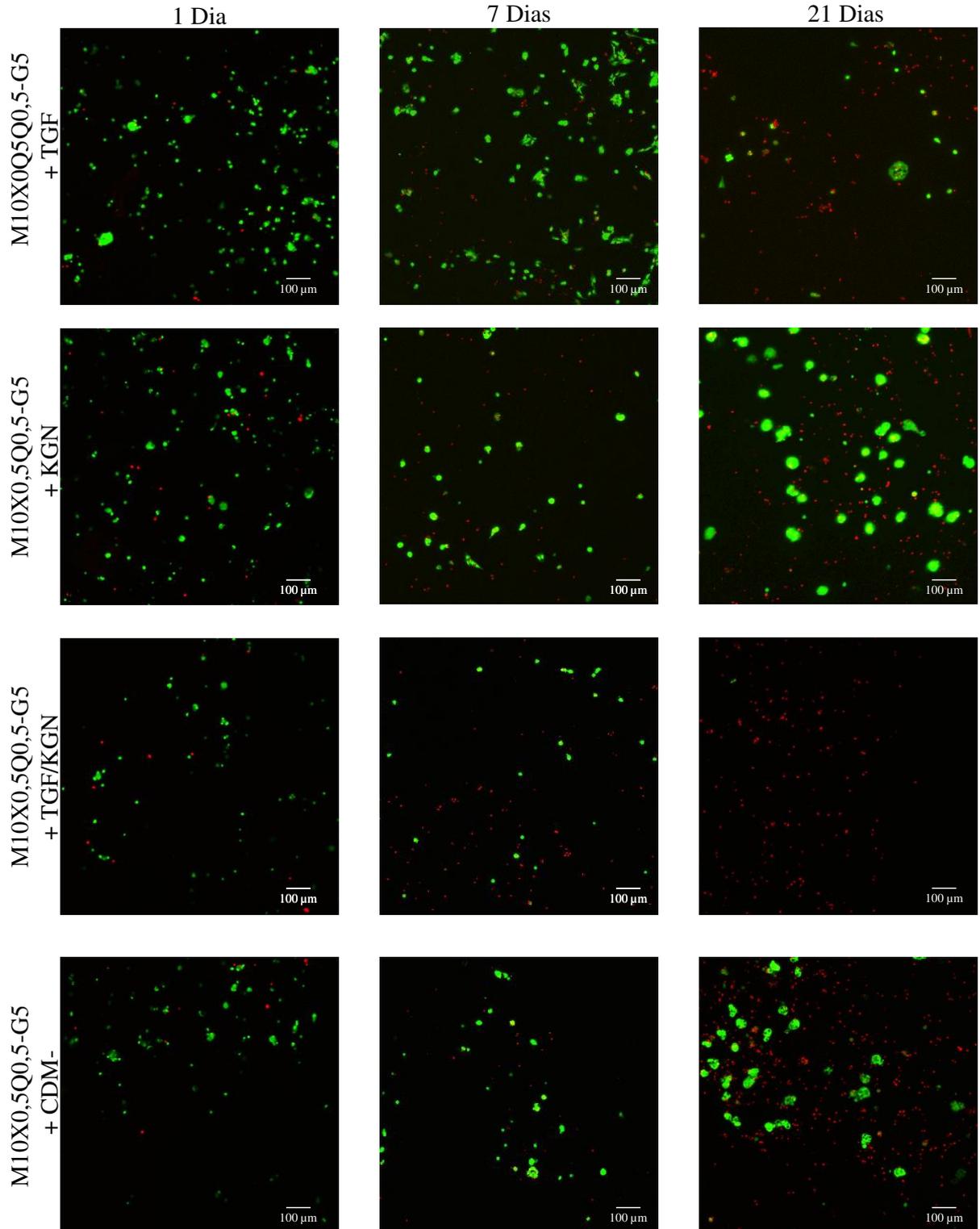


Este ensaio mostrou-se problemático com relação a vários aspectos. Por exemplo, a visualização exata do poço foi prejudicada, uma vez que todo o sistema apresentava o mesmo aspecto sob análise visual direta e a mesma transparência e, como o procedimento era realizado de forma estéril, em fluxo laminar, a manipulação era ainda mais dificultada.

A localização do hidrogel contendo as células também foi prejudicada, visto que os hidrogéis, na maioria dos casos, ficavam aderidos na cobertura de agarose, e não no próprio poço, tornando sua recuperação complicada. Isso provavelmente deve ter ocorrido devido a adição da agarose líquida para a formação da cobertura do sistema de confinamento, a qual pode ter penetrado superficialmente nos poros do hidrogel, causando esta leve adesão. Ainda, como a parte superior da agarose se desprendia da base quando amostrados com o punch, e lavagens eram realizadas para retirada dos corantes, ocorreu perda celular, gerando imagens heterogêneas ao longo das amostras.

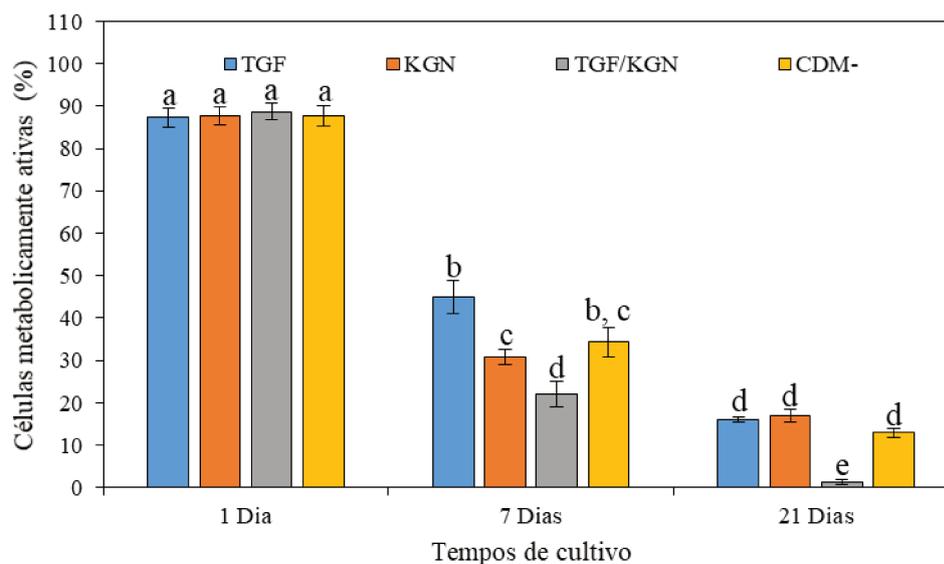
Os resultados alcançados são sumarizados na Figura 37. Pode-se verificar que há uma grande fração de células vivas, mas também se nota que um elevado número de células morreu ao longo do processo em todos os meios testados.

Figura 37 – Imagens do hidrogel M10X0,5Q0,5-G5 inoculado com células-tronco porcinas cultivadas em meios de cultura contendo diferentes promotores de diferenciação, obtidas através de microscópio de fluorescência no ensaio LIVE/DEAD nos tempos de cultivo de 1, 7 e 21 dias.



As imagens foram analisadas através do software ImageJ visando quantificar a concentração das células metabolicamente ativas, obtendo-se o gráfico da Figura 38.

Figura 38 – Quantificação das células metabolicamente ativas cultivadas nos diferentes meios e nos tempos de cultivo de 1, 7 e 21 dias. Mesma letra indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

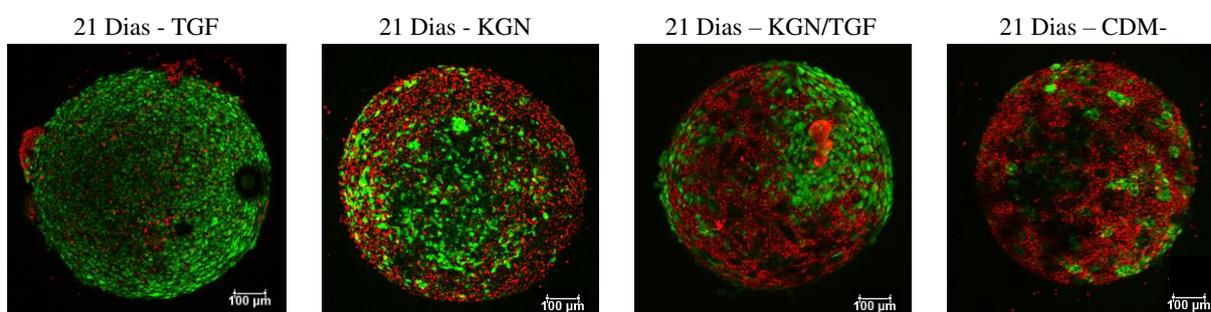


No tempo de cultivo de 1 dia, verifica-se que a grande maioria das células se encontravam viáveis, já que poucos pontos vermelhos foram identificados proporcionalmente aos verdes. Segundo a quantificação apresentada na Figura 38, obteve-se uma média de 90% de viabilidade celular. Após sete dias de cultivo, a viabilidade das células cultivadas em todos os meios decaiu para cerca de 30 a 50%. Como este fato não foi verificado no primeiro cultivo, no qual as células com os hidrogéis não foram confinados na agarose, acredita-se que tal confinamento tenha prejudicado a transferência eficaz dos nutrientes, incluindo oxigênio, e de fatores de diferenciação para as células, ocasionando, assim, morte celular precoce. Além disso, conforme já comentado, para a adequada mistura da suspensão celular à formulação concentrada e muito viscosa de hidrogel, houve necessidade de grande repetição do procedimento de homogeneização, o que pode causar excessivo estresse e comprometer a viabilidade celular. No tempo de 21 dias, as células metabolicamente ativas decaíram ainda mais, indicando que a estratégia de confinar o hidrogel na agarose realmente não foi eficaz para contornar a liberação das células para o meio de cultivo.

Devido a estes resultados de baixa viabilidade, não seria possível verificar com acurácia a diferenciação das células pelo ensaios quantitativos de DNA e glicosaminoglicanos. Assim, foi orientado pelo grupo do *Trinity College Dublin* a não realização dos demais experimentos de caracterização.

Em relação aos controles de esferoides do ensaio, as imagens que compõem a Figura 39 foram obtidas também através do ensaio LIVE/DEAD.

Figura 39 – Controle de diferenciação utilizando esferóides de célula-tronco porcinas com os quatro diferentes meios de cultivo.



No caso do ensaio com esferoides, a quantificação pelo software ImageJ não foi possível de ser realizada devido a distância entre as células ser pequena, impedindo que o software identificasse as células de maneira isolada. Mas, analisando-se qualitativamente a Figura 39, pode-se verificar que a maior viabilidade celular, após 21 dias de cultivo, foi detectada no grupo tratado com TGF- β 3. Os esferoides tratados com a kartogenina também apresentaram elevada viabilidade, entretanto inferior à dos esferoides tratados com o TGF- β 3. A combinação de ambos os fatores de diferenciação gerou resultados aquém dos esperados, com viabilidade inferior quando comparada com os tratamentos com os fatores isolados. O controle negativo, tratado com meio CDM sem fatores de diferenciação, indicou a maior morte celular.

De forma geral, a presença de fatores de crescimento eleva a expansão proliferativa das células e também auxilia a viabilidade das mesmas devido à inibição indireta de fatores pró-apoptóticos (VANDER HEIDEN *et al.*, 2001). Dessa forma, os resultados obtidos condizem com o esperado, uma vez que os esferoides tratados com meio CDM na ausência dos fatores de diferenciação apresentaram a menor viabilidade. Além disso, Zhu e colaboradores (2017), mostraram que a presença de kartogenina em hidrogéis compostos de ácido hialurônico e

quitosana utilizados para o cultivo de células-tronco do tecido adiposo aumenta a viabilidade dessas células quando comparados com o cultivo dessas células no mesmo hidrogel na ausência do fator de diferenciação, o que também corrobora com os dados obtidos (ZHU *et al.*, 2017).

Em relação à maior viabilidade observada com o TGF- β , Rocha e colaboradores (2011) obtiveram resultados similares. Estes pesquisadores produziram hidrogéis de carragena para a engenharia de tecido cartilaginoso, no qual encapsularam o fator de diferenciação TGF- β . Comparando-se com o hidrogel produzido na ausência do fator, a viabilidade das células-tronco do tecido adiposo foi significativamente maior, indicando que este fator de crescimento favorece a sobrevivência celular (ROCHA *et al.*, 2011).

A literatura indica que a combinação dos fatores de diferenciação kartogenina e TGF- β 3 favorece a diferenciação de células-tronco em condrócitos (LIU, CHUN *et al.*, 2015), porém não foi identificado nenhum trabalho que analise a viabilidade celular quando esta combinação de fatores é empregada.

Os resultados alcançados apontam ainda que há a necessidade de que novos protocolos sejam desenvolvidos para possibilitar a análise do comportamento celular em hidrogéis com maior acurácia. Mas, vale ressaltar que havia ainda grande proporção de células vivas logo após a inoculação, o que possibilitaria o deslocamento dessas para a região lesada *in vivo* e sua diferenciação em condrócitos, aumentando o potencial de recuperação. Ademais, é importante ressaltar que as células-tronco não são imunogênicas quando ainda se apresentam em seu estado indiferenciado. Após a diferenciação, estas células são capazes de ativar o sistema imune, sendo ideal utilizar células do próprio paciente para a finalidade de regeneração.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 Conclusões

Analisando-se o panorama geral deste trabalho, pode-se concluir que os hidrogéis produzidos apresentaram propriedades promissoras para a aplicação na engenharia de tecido cartilaginoso. Diversas adaptações foram necessárias nos hidrogéis inicialmente propostos, sendo analisadas um total de 26 formulações, as quais, através de um estudo sistemático, geraram 8 composições relevantes em relação à temperatura de gelificação, com grande potencial para gerar diversos outros estudos embasados na presente tese. Estas formulações mais promissoras, que apresentaram temperaturas de gelificação em torno de 30 °C, foram as compostas por 10% ou 8% (m/v) de metilcelulose, contendo 0,5 a 2% (m/v) de goma xantana com 5% (v/v) de glicerol de forma isolada ou em conjunto com 0,5 a 2% (m/v) de carboximetil quitosana.

As caracterizações realizadas indicaram que as formulações compostas por 10% (m/v) de metilcelulose, 0,5 ou 1% (m/v) de xantana e 0,5 ou 1% (m/v) de carboximetil quitosana foram adequadas quanto à toxicidade e à liberação controlada dos fármacos, sendo ainda passíveis de esterilização por calor úmido, de absorver elevadas quantidades de fluidos e apresentando grupamentos livres para futuras interações com as células.

O hidrogel contendo 10% de metilcelulose, 0,5% de xantana e 0,5% de carboximetil quitosana, com 5% de glicerol e contendo fármacos foi escolhido dentre os demais como o que apresenta maior inovação quanto à composição e por apresentar-se mais fluido que o hidrogel que contém maior concentração de goma xantana (M10X1-G5) em baixa temperatura, o que facilita a incorporação das células. Esta formulação não apresenta citotoxicidade indireta e direta por um curto período de tempo quando exposta às células-tronco da polpa dentária. Após o cultivo dessas células em conjunto com o hidrogel em meio condrogênico, verificou-se que as mesmas são capazes de se diferenciar em condrócitos, fato relevante na engenharia de tecido cartilaginoso, uma vez que estas células diferenciadas produzirão matriz extracelular, auxiliando no tratamento da osteoartrite. Ademais, uma elevada quantidade de células foi liberada para o meio de cultivo, fato este positivo no que diz respeito à migração das células inoculadas para as regiões lesadas.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Como foram obtidas 8 formulações com características adequadas quanto à temperatura de gelificação e somente 3 formulações foram caracterizadas de forma integral, recomenda-se a análise futura das outras 5 formulações desenvolvidas com o intuito de se verificar se alguma delas apresenta características superiores no que se refere a engenharia do tecido cartilaginoso. Além disso, pode-se testar outras aplicações dos hidrogéis desenvolvidos, como, por exemplo, em feridas de pele e na liberação controlada de variados tipos de fármacos e compostos bioativos. Além disso, pode-se analisar a factibilidade da utilização dessas formulações não só em centros cirúrgicos, mas também em consultórios médicos.

Recomenda-se também avaliar se seria possível a aplicação dos biomateriais produzidos no auxílio da implantação de próteses articulares. Devido a suas diversas características reológicas positivas, como a elevada viscosidade, o envolvimento de próteses com o hidrogel antes da implantação poderia ser um fator positivo por auxiliar na visco-suplementação da prótese, bem como na diminuição da dor e inflamação local após o procedimento, uma vez que contém agentes anti-inflamatórios.

Outra recomendação seria a comparação dos biomateriais obtidos neste trabalho a hidrogéis comerciais disponíveis no mercado (por exemplo, CARES e Caripatch). Espera-se que as formulações produzidas nesta tese apresentem benefícios adicionais, em decorrência da presença de agentes bioativos e de células-tronco ao invés de condrócitos já diferenciados. A dexametasona e o diclofenaco de sódio diminuiriam a dor e inflamação do local, enquanto o ácido gálico, por reticular o hidrogel, geraria características mecânicas superiores. A utilização de células-tronco é mais interessante, uma vez que não demanda a retirada de condrócitos de outros locais do corpo, evitando mais uma lesão tecidual no paciente. A composição dos hidrogéis aqui propostos também apresenta características superiores, conforme já discutido em diversos pontos desta tese.

Em relação à liberação controlada de fármacos, sugere-se dar continuidade aos ensaios de liberação com o agente bioativo ácido gálico em HPLC.

Sugere-se também realizar o estudo da cinética de degradação do hidrogel para determinar seu impacto na liberação dos agentes bioativos.

A encapsulação prévia dos agentes bioativos em micropartículas ou em lipossomas pode ser também uma alternativa para que a liberação seja realizada de forma ainda mais lenta e

controlada, aumentando a efetividade dos hidrogéis nos sintomas mais comuns, como a dor gerada pela osteoartrite. Assim, as aplicações de injeções intra-articulares poderiam ser realizadas com espaços de tempos mais amplos, aumentando, portanto, a adesão dos pacientes ao tratamento.

Como o fluido sinovial apresenta pH fisiológico e volume de 0,5 a 4 mL em articulações não inflamadas, enquanto no processo inflamatório esse volume pode atingir volumes de até 10 vezes maiores e pH que variam de 6 a 6,8, esses fatores poderiam alterar as propriedades mecânicas, o perfil de liberação dos fármacos, bem como as temperaturas de gelificação das formulações. Assim, sugere-se realizar ensaios levando-se em consideração tais parâmetros de diluição e pH.

Devido ao fato de ser sugerida a aplicação injetável dos hidrogéis, recomenda-se avaliar a resistência ao cisalhamento dos hidrogéis, através de análises em que se varia a frequência de compressão em temperatura constante a 37 °C. Com essas análises, poderia ser mimetizada a passagem do hidrogel pelo êmbolo da seringa durante a aplicação.

Poderiam ser realizados também ensaios *in vivo* com os hidrogéis já caracterizados, verificando de maneira mais direta a utilização das formulações de hidrogéis desenvolvidas como um tratamento para enfermidades que afetam o tecido cartilaginoso. Além disso, análises do tecido após administração do hidrogel *in vivo* são mais padronizadas, o que facilitaria a definição das melhores formulações para a diferenciação de células e consequente recuperação tecidual.

A impressão de arquiteturas 3D com biotintas é outra vertente que vem sendo amplamente explorada, e a utilização das formulações desenvolvidas na presente tese se faria interessante para este fim. Como os hidrogéis desenvolvidos no presente estudo apresentam gelificação em condições fisiológicas, isso os torna mais atraentes para encapsulação prévia de células para a bioimpressão, desde que o sistema de impressão seja projetado para o trabalho com materiais termorresponsíveis.

Poderiam ser também exploradas a incorporação de outros polissacarídeos na formulação do hidrogel, visando sua melhoria, como o alginato, a glicomanana e a, goma guar, dentre outros.

7. APÊNDICE I

Figura 40 – Gráficos obtidos após teste mecânico de compressão dinâmico para os hidrogéis sem e com fármacos.

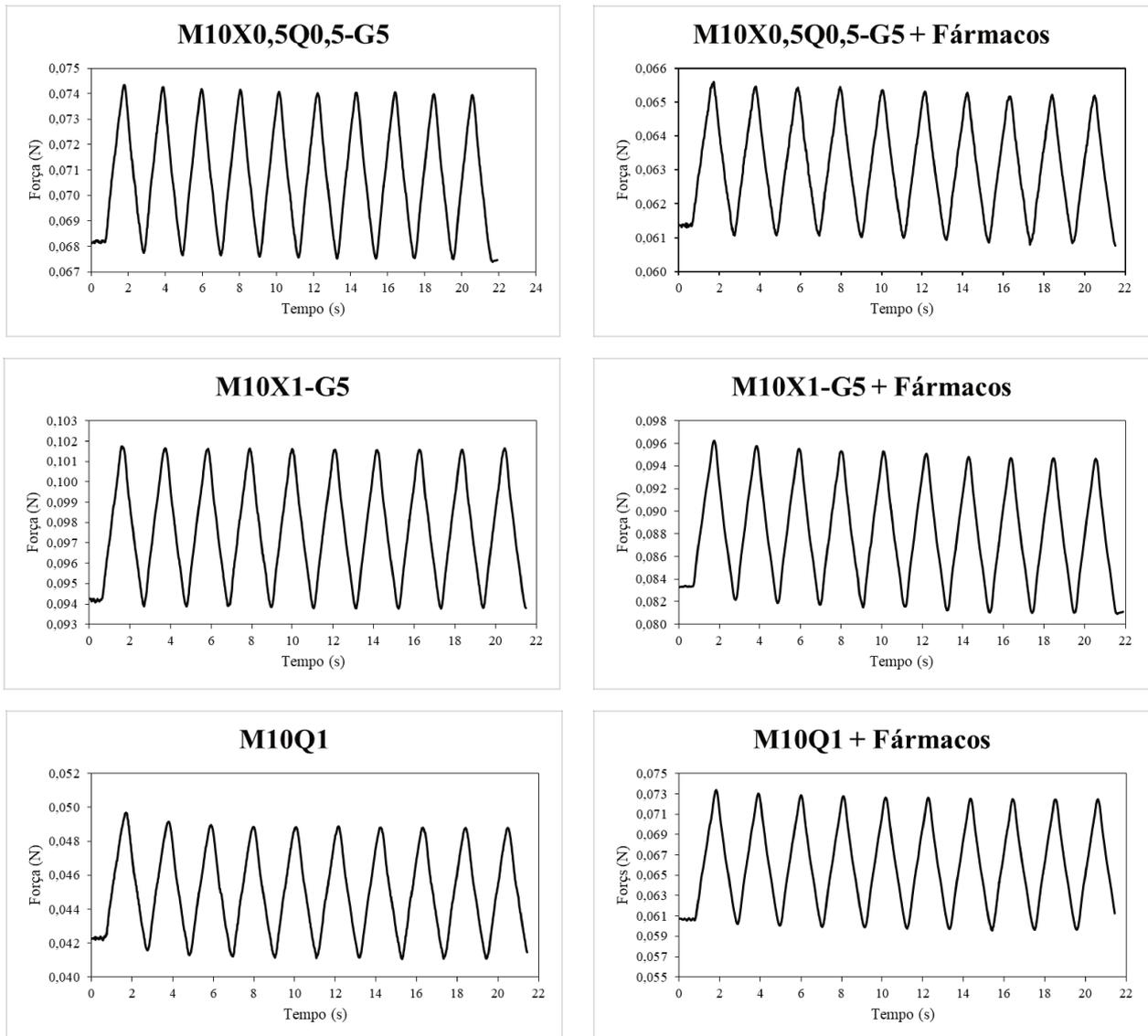
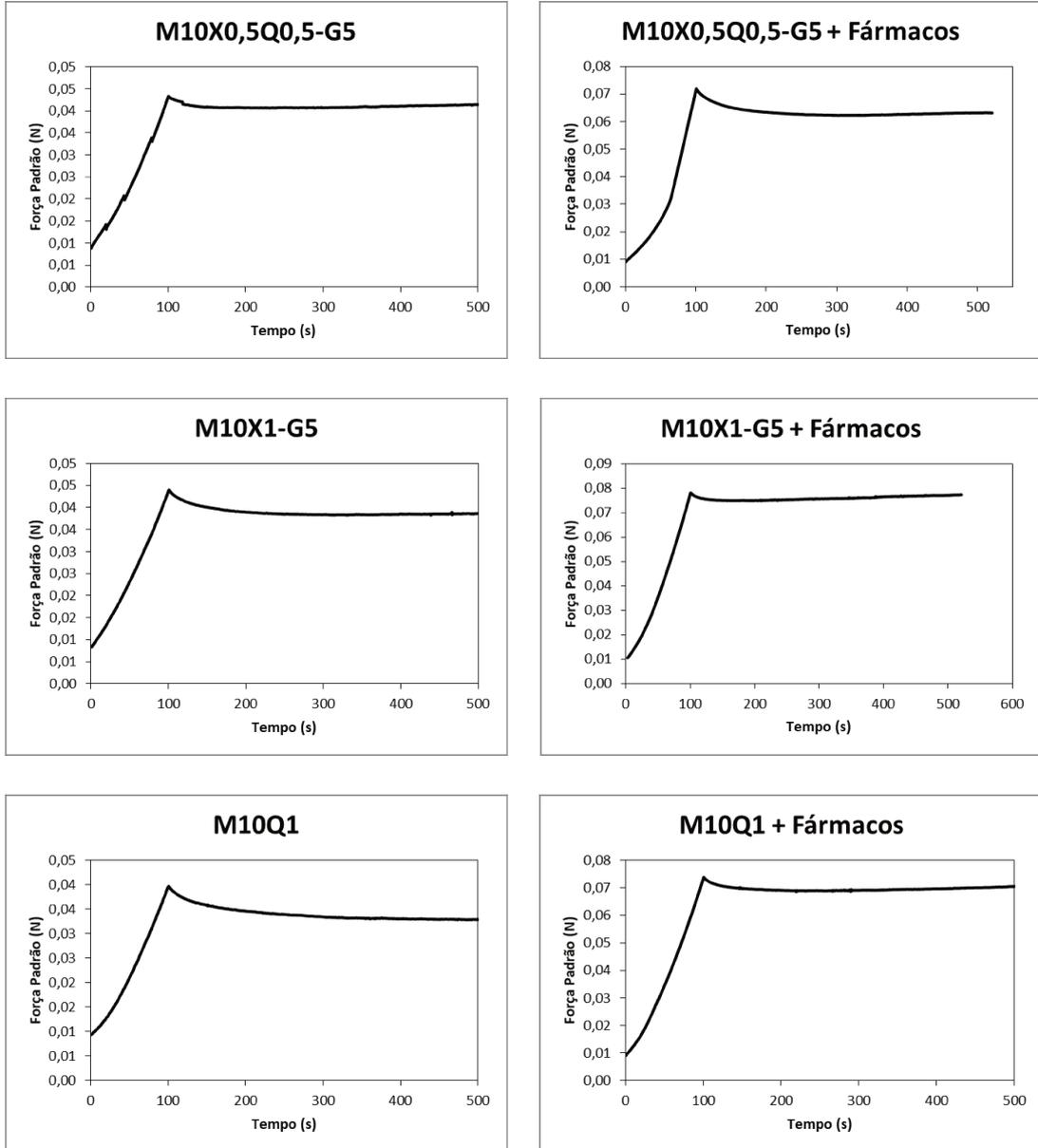


Figura 41 – Gráficos obtidos após teste mecânico de compressão em equilíbrio para os hidrogéis sem e com fármacos.



8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Consulta Pública nº 109 - Orientação Técnica Referente a Indicadores de Qualidade do Ar Interior em Ambientes de Serviços de Saúde*. . [S.l: s.n.]. , 2003

AHEARNE, Mark; KELLY, Daniel J. A comparison of fibrin, agarose and gellan gum hydrogels as carriers of stem cells and growth factor delivery microspheres for cartilage regeneration. *Biomedical Materials*, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.

AHMED, Mahmoud M. *et al.* Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, n. 1, p. 61–69, jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.004>>.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING & MATERIALS. *Standard Guide for Characterization of Hydrogels used in Regenerative Medicine. ASTM F2900-11*. West Conshohocken, PA 19428-2959. United States: [s.n.]. , 2011

ANDRZEJEWSKA, ANNA; LUKOMSKA, BARBARA; JANOWSKI, MIROSLAW. Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*, v. 37, p. 855–864, 2018.

ARDEN, Nigel *et al.* *Atlas of Osteoarthritis*. [S.l.]: Servier, 2014.

ARVIDSON, S. A. *et al.* Interplay of phase separation and thermoreversible gelation in aqueous methylcellulose solutions. *Macromolecules*, v. 46, n. 1, p. 300–309, 2013.

BADHANI, Bharti; SHARMA, Neha; KAKKAR, Rita. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances*, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.

BAJPAYEE, Ambika G.; GRODZINSKY, Alan J. Cartilage-targeting drug delivery: can electrostatic interactions help? *Nature Reviews Rheumatology*, v. 13, n. 3, p. 183–193, 2017.

BAMGBOSE, Babatunde Olamide *et al.* Effects of co-administered dexamethasone and diclofenac potassium on pain, swelling and trismus following third molar surgery. *Head & Face Medicine*, v. 1, n. 1, p. 11, 7 dez. 2005. Disponível em: <<http://head-face-med.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-160X-1-11>>.

BARBOSA, Isabelle *et al.* Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*, v. 13, p. 647–653, 2003.

BÉDOUET, Laurent *et al.* Intra-articular fate of degradable poly(ethyleneglycol)-hydrogel microspheres as carriers for sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 456, n. 2, p. 536–544, nov. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.016>>.

BELLINI, Márcia Zilioli *et al.* Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 125, p. E421–E431, 2012.

BELLINI, Márcia Zilioli; DE OLIVA-NETO, Pedro; MORAES, Ângela Maria. Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 58, n. 2, p. 289–299, 2015.

BENYA, Paul D.; PADILLA, Silvia R.; NIMNI, Marcel E. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, v. 15, n. 4, p. 1313–1321, 1978.

BHOSALE, Abhijit M.; RICHARDSON, James B. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, v. 87, n. 1, p. 77–95, 2008.

BINDAL, Aditya *et al.* Effect of Steam Sterilization on the Rheology of Polymer Solutions. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 8, n. 3, p. 219–228, 2003.

CHAMIEH, Frédéric *et al.* Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 38814, 2016.

CHANG, Chunyu *et al.* Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. *European Polymer Journal*, v. 46, n. 1, p. 92–100, 2010.

CHANG, Chunyu; ZHANG, Lina. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, n. 1, p. 40–53, 2011.

CHEN, Qing *et al.* Carboxymethyl-chitosan protects rabbit chondrocytes from interleukin-1B-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, v. 541, n. 1–2, p. 1–8, 2006.

CHIA, Yi Chen *et al.* Anti-Neoplastic effects of gallic acid, a major component of toona sinensis leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. *Molecules*, v. 15, n. 11, p. 8377–8389, 2010.

CHIESA, Enrica *et al.* Intra-Articular Formulation of GE11-PLGA Conjugate-Based NPs for Dexamethasone Selective Targeting — In Vitro Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 1–22, 2018.

CHU, Stanley *et al.* Understanding the Spatiotemporal Degradation Behavior of Aggrecanase-Sensitive Poly(ethylene glycol) Hydrogels for use in Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, v. 10, p. 1–51, 2016.

COSTA. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 141–153, jun. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

COSTA, Paulo; SOUSA LOBO, José Manuel. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.

COUTO, Angélica G. *et al.* Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, n. 1, p. 124–131, 2013.

CUSHING, M C; ANSETH, K S. Hydrogel Cell Cultures. *Science*, v. 316, n. 5828, p. 1133–1134, 2007.

DA COSTA, Bruno R. *et al.* Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: A network meta-analysis. *The Lancet*, v. 387, n. 10033, p. 2093–2105, 2016.

DAROZ, Renato Luiz Dias *et al.* Prevention of postoperative pericardial adhesions using thermal sterile carboxymethyl chitosan. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 23, n. 4, p. 480–487, 2008.

DAS, Siddharth Kumar; FAROOQI, Abid. Osteoarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, v. 22, n. 4, p. 657–675, 2008.

DUARTE, Ana Rita C; MANO, João F.; REIS, Rui L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal*, v. 45, n. 1, p. 141–148, 2009.

DUTTA, Pradip Kumar. *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*. Dehradun, India: Springer, 2016.

ELRON-GROSS, Inbar *et al.* A novel Diclofenac-carrier for local treatment of osteoarthritis applying live-animal MRI. *Journal of Controlled Release*, v. 135, n. 1, p. 65–70, 2009.

ELRON-GROSS, Inbar; GLUCKSAM, Yifat; MARGALIT, Rimona. Liposomal dexamethasone-diclofenac combinations for local osteoarthritis treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 376, n. 1–2, p. 84–91, 2009.

EMA. *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Assessment report: MACI*. [S.l.: s.n.], 2013

FATIMI, Ahmed *et al.* Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: The influence of pH, temperature and sterilization. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 3423–3432, 2009.

FELLOWS, Christopher R. *et al.* Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. *Frontiers in Genetics*, v. 7, p. 1–20, 2016.

FENG, Chao *et al.* Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 457, n. 1, p. 158–167, 2013.

FENG, Qian *et al.* Cell-mediated degradation regulates human mesenchymal stem cell chondrogenesis and hypertrophy in MMP-sensitive hyaluronic acid hydrogels. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, p. 1–7, 2014.

FERNANDES, Felipe Hugo Alencar; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Critical reviews in analytical chemistry / CRC*, v. 46, n. 3, p. 257–65, 2016.

FERNANDES, Tiago Lazzaretti *et al.* Development of a Novel Large Animal Model to Evaluate Human Dental Pulp Stem Cells for Articular Cartilage Treatment. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 14, n. 5, p. 734–743, 2018.

GALATO, D *et al.* Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox report: communications in free radical research*, v. 6, n. 4, p. 243–50, 2001.

GAO, Lin; MCBEATH, Rowena; CHEN, Christopher S. Stem Cell Shape Regulates a Chondrogenic Versus Myogenic Fate Through Rac1 and N-Cadherin. *STEM CELLS*, v. 23, p. 564–572, 2010.

GARCÍA-OCHOA, F *et al.* Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, v. 18, n. 7, p. 549–579, nov. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975000000501>>.

GAUT, Carrie; SUGAYA, Kiminobu. Critical review on the physical and mechanical factors involved in tissue engineering of cartilage. *Regenerative Medicine*, v. 10, n. 5, p. 665–679, 2015.

GOLD, Gittel T. *et al.* Development of crosslinked methylcellulose hydrogels for soft tissue augmentation using an ammonium persulfate-ascorbic acid redox system. *Carbohydrate Polymers*, v. 134, p. 497–507, 2015.

GRODZINSKY, Alan J. *et al.* Intra-articular dexamethasone to inhibit the development of post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 35, n. 3, p. 406–411, 2017.

GUPTA, Michelle S; COOPER, Elana S; NICOLL, Steven B. Transforming growth factor-beta 3 stimulates cartilage matrix elaboration by human marrow-derived stromal cells encapsulated in photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels: Potential for nucleus pulposus replacement. *Tissue Engineering Part A*, v. 17, n. 21–22, p. 2903–2910, 2011.

HAN, Guanying *et al.* Low molecular weight xanthan gum for treating osteoarthritis. *Carbohydrate Polymers*, v. 164, p. 386–395, 2017.

HAN, Guanying; WANG, Guilan; *et al.* Preparation of xanthan gum injection and its protective effect on articular cartilage in the development of osteoarthritis. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 2, p. 1837–1842, 2012.

HAN, Guanying; SHAO, Huarong; *et al.* The protective effect of xanthan gum on interleukin-1B induced rabbit chondrocytes. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 870–875, 2012.

HARDIN, John a.; COBELLI, Neil; SANTAMBROGIO, Laura. Consequences of metabolic and oxidative modifications of cartilage tissue. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 11, p. 521–529, 2 set. 2015.

HAZRA, Moumita *et al.* Designing polymeric microparticulate drug delivery system for hydrophobic drug quercetin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 4, p. 429–436, 2015.

HEALEY, Emma L. *et al.* A nurse-led clinic for patients consulting with osteoarthritis in general practice: development and impact of training in a cluster randomised controlled trial. *BMC Family Practice*, v. 17, n. 1, p. 173, 2016.

HOLLANDS, P.; ABOYEJI, D.; ORCHARTON, M. Dental pulp stem cells in regenerative medicine. *British Dental Journal*, v. 224, n. 9, p. 747–750, 2018.

HONGBIN, W *et al.* Carboxymethylated chitin reduces MMP-1 expression in rabbit ACLT osteoarthritic cartilage. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 63, n. 4, p. 369–72, 2004.

HUANG, Brian J.; HU, Jerry C.; ATHANASIOU, Kyriacos A. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials*, v. 98, p. 1–22, 2016.

HUANG, Chieh Cheng *et al.* Injectable cell constructs fabricated via culture on a thermoresponsive methylcellulose hydrogel system for the treatment of ischemic diseases. *Advanced Healthcare Materials*, v. 3, n. 8, p. 1133–1148, 2014.

HUANG, Yen Hua *et al.* Dental Stem Cells and Tooth Banking for Regenerative Medicine. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, v. 2, n. 3, p. 111–117, 2010.

HUEBNER, Kyla D.; SHRIVE, Nigel G.; FRANK, Cyril B. Dexamethasone inhibits inflammation and cartilage damage in a new model of post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 32, n. 4, p. 566–572, 2014.

IBARRA, Juan C. D.; HELBLING, Ignacio M.; LUNA, Julio A. Mathematical modeling of drug delivery from cylindrical implantable devices. *Mathematical Methods in the Applied Sciences*, v. 37, n. 17, p. 2677–2688, 30 nov. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mma.3007>>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5 “Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in*

in vitro cytotoxicity". Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. [S.l: s.n.], 2009

ISO/EN10993-5. International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices. 2009, [S.l: s.n.], 2009. p. 42.

ITOH, Y. *et al.* Pulp Regeneration by 3-dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs. *Journal of Dental Research*, v. 97, n. 10, p. 1137–1143, 2018.

IZADPANA, Reza *et al.* Long-term In vitro Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Research*, n. 11, p. 4229–4239, 2008.

JENKINS, Thomas Lee; LITTLE, Dianne. Synthetic scaffolds for musculoskeletal tissue engineering: cellular responses to fiber parameters. *Regenerative Medicine*, v. 4, n. 1, p. 15, 2019.

JEONG, Byeongmoon; WAN, Sung; HAN, You. Thermosensitive sol – gel reversible hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*, v. 54, p. 37–51, 2002.

JOHNSON, K. *et al.* A Stem Cell-Based Approach to Cartilage Repair. *Science*, v. 336, n. 6082, p. 717–721, 2012.

JUAN, A San *et al.* Degradation of chitosan-based materials after different sterilization treatments Degradation of chitosan-based materials after different sterilization treatments. *Materials Science and Engineering*, v. 31, p. 1–5, 2012.

JUNG, Joohee; BAE, Ki Hwan; JEONG, Choon-Sik. Anti-Helicobacter pylori and antiulcerogenic activities of the root Cortex of Paeonia suffruticosa. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 36, p. 1535–1539, 2013.

KANG, Mi Lan *et al.* Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. *Biomaterials*, v. 35, n. 37, p. 9984–9994, 2014.

KARAMZADEH, Raziéh; BAGHABAN, Mohamadreza. Dental-Related Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. [S.l.]: InTech, 2013. .

KERKIS, Irina; CAPLAN, Arnold I. Stem Cells in Dental Pulp of Deciduous Teeth. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 18, n. 2, p. 129–138, 2012.

KHOR, Eugene; LIM, Lee Yong. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.

KIM, Eun Ji *et al.* Injectable and Thermosensitive Soluble Extracellular Matrix and Methylcellulose Hydrogels for Stem Cell Delivery in Skin Wounds. *Biomacromolecules*, v. 17, n. 1, p. 4–11, 2016.

KIRK, S E; SKEPPER, J N; DONALD, A M. Application of environmental scanning electron microscopy to determine biological surface structure. *Journal of Microscopy*, v. 233, p. 205–224, 2009.

KLOUDA, Leda. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 97, p. 338–349, 2015.

KOBAYASHI, Kazuto; HUANG, Ching-I; LODGE, Timothy P. Thermoreversible gelation of aqueous methylcellulose solutions. *Macromolecules*, v. 32, p. 7070–7077, 1999.

KORSMEYER, Richard W. *et al.* Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 15, n. 1, p. 25–35, maio 1983. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378517383900649>>.

KRATZ, Jadel Müller *et al.* Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p. 437–442, 2008.

KREMER, F; RICHTERING, W. *Gels: Structures, Properties, and Functions*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. v. 136.

KRISHNAMOORTHY, Ganesan *et al.* Experimental and theoretical studies on Gallic acid assisted EDC/NHS initiated crosslinked collagen scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, v. 43, p. 164–171, 2014.

KUBO, Isao *et al.* Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 4, p. 573–580, 2002.

KUBO, Isao; XIAO, Ping; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: Structural criteria and mode of action. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 3, p. 347–350, 2001.

KUMAR, Anuj; RAO, Kummara Madhusudana; HAN, Sung Soo. Application of xanthan gum

as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 180, n. August 2017, p. 128–144, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.009>>.

KUMAR, Dileep *et al.* Knee Articular Cartilage Segmentation from MR Images. *ACM Computing Surveys*, v. 51, n. 5, p. 1–29, 2018.

KURPINSKI, Kyle *et al.* Transforming growth factor- β and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells*, v. 28, n. 4, p. 734–742, 2010.

KWON, Heenam *et al.* Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 15, n. 9, p. 550–570, 2019.

KWON, Hyuck Joon. Chondrogenesis on sulfonate-coated hydrogels is regulated by their mechanical properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 17, p. 337–346, 2012.

LEE, Junmin; ABDEEN, Amr A; KILIAN, Kristopher A. Rewiring mesenchymal stem cell lineage specification by switching the biophysical microenvironment. *Scientific Reports*, v. 4, p. 20–27, 2014.

LEE, Wonjae; PARK, Jon. 3D patterned stem cell differentiation using thermo-responsive methylcellulose hydrogel molds. *Scientific reports*, v. 6, p. 29408, 2016.

LI, L. *et al.* Gel network structure of methylcellulose in water. *Langmuir*, v. 17, n. 26, p. 8062–8068, 2001.

LIN, Xiao *et al.* Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of a Novel Sulfonamido-Based Gallate as Pro-Chondrogenic Agent for the Treatment of Cartilage. *Molecules*, v. 22, n. 1, p. 3, 2016.

LIU, Chun *et al.* Kartogenin, transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-7 coordinately enhance lubricin accumulation in bone-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, v. 39, n. 9, p. 1026–1035, 2015.

LIU, Mei *et al.* Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone research*, v. 5, p. 1–20, 2017.

LIU, Zhijia; YAO, Ping. Injectable thermo-responsive hydrogel composed of xanthan gum and

methylcellulose double networks with shear-thinning property. *Carbohydrate Polymers*, v. 132, p. 490–498, 2015.

LU, Yihong CS; EVANS, Christopher H; GRODZINSKY, Alan J. Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. *Arthritis Research & Therapy*, v. 13, n. 5, p. R142, 2011.

LUM, Julian J *et al.* Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell*, v. 120, p. 237–248, 2005.

LUO, Yangchao; WANG, Qin. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 64, p. 353–367, 2014.

LV, Feng-Juan *et al.* Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, v. 32, n. 6, p. 1408–1419, 2014.

MADHAN, B.; MURALIDHARAN, C.; JAYAKUMAR, R. Study on the stabilisation of Collagen with vegetable tannins in the presence of acrylic polymer. *Biomaterials*, v. 23, n. 14, p. 2841–2847, 2002.

MAGNIN, Delphine. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, n. 4, p. 437–453, 2004.

MAHINROOSTA, Mostafa *et al.* Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*, v. 8, p. 42–55, 2018.

MAHIR, Laila *et al.* Impact of knee osteoarthritis on the quality of life. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, v. 59, p. e159, 2016.

MAMIDI, M.K. *et al.* Mesenchymal stromal cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 24, n. 8, p. 1307–1316, 2016.

MANUGUERRA-GAGNE *et al.* Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes Tissue Regeneration in a Glaucoma Model Through Laser-Induced Paracrine Factor Secretion and Progenitor Cell Recruitment. *STEM CELLS*, v. 31, p. 1136–1148, 2013.

MATSIKO, Amos; GLEESON, John P.; O'BRIEN, Fergal J. Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition. *Tissue Engineering Part A*, v. 21, n. 3–4, p. 486–497, 2015.

MAUCK, Robert L.; BURDICK, Jason A. Engineering cartilage tissue. *Tissue Engineering: From Lab to Clinic*, v. 60, p. 493–520, 2011.

MESALLATI, Tariq. A Comparison of Self-Assembly and Hydrogel Encapsulation as a Means to Engineer Functional Cartilaginous Grafts Using Culture Expanded Chondrocytes. *Tissue engineering: Part C*, v. 20, n. 1, p. 52–63, 2014.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, Nazma N.; TIWARI, Ashutosh. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters*, v. 1, n. 1, p. 11–33, 2010.

MOYER, R. F. *et al.* Osteoarthritis year in review 2014: Mechanics - basic and clinical studies in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 22, n. 12, p. 1989–2002, 2014.

NADERI-MESHKIN, Hojjat *et al.* Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. *Cell Biology International*, v. 38, p. 72–84, 2014.

NARAYANAN, Deepa; JAYAKUMAR, R.; CHENNAZHI, K. P. Versatile carboxymethyl chitin and chitosan nanomaterials: A review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 6, n. 6, p. 574–598, 2014.

NASATTO, Pauline L. *et al.* Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. *Polymers*, v. 7, n. 5, p. 777–803, 2015.

NATARAJAN, Venkatachalam; MADHAN, Balaraman; TIKU, Moti L. Intra-articular injections of polyphenols protect articular cartilage from inflammation-induced degradation: Suggesting a potential role in cartilage therapeutics. *Plos One*, v. 10, n. 6, 2015.

NELSON, A.E. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 26, n. 3, p. 319–325, 2018.

NORRIS, Christopher M. Healing. *Managing Sports Injuries*. [S.l.]: Elsevier, 2011. p. 1–27. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702034732000058>>.

OPENSTAX. 9.4 Synovial Joints. In: OPENSTAX (Org.). . *Anatomy and Physiology*. [S.l.]: OpenStax, 2013. p. 58–78.

PARK, Hyejin *et al.* Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 1, p. 4779–4786, 2013.

PARK, Jennifer S. *et al.* The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials*, v. 32, n. 16, p. 3921–3930, 2011.

PATEL, Minal *et al.* Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. *Archives of Oral Biology*, v. 54, n. 10, p. 898–908, 2009.

PAYNE, Christina *et al.* A methylcellulose and collagen based temperature responsive hydrogel promotes encapsulated stem cell viability and proliferation in vitro. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 7, n. 1, p. 132–146, 2017.

PELTON, R. W. *et al.* Immunohistochemical localization of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 in the mouse embryo: Expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *Journal of Cell Biology*, v. 115, n. 4, p. 1091–1105, 1991.

PERRY, Brandon C. *et al.* Collection, Cryopreservation, and Characterization of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Banking and Clinical Use. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 14, n. 2, p. 149–156, 2008.

PETRI, Denise F S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 23, p. 1–13, 2015.

POPA, Elena G *et al.* Chondrogenic potential of injectable k-carrageenan hydrogel with encapsulated adipose stem cells for cartilage tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, p. 550–563, 2015.

POUNTOS, Ippokratis *et al.* NSAIDS inhibit in vitro MSC chondrogenesis but not osteogenesis: implications for mechanism of bone formation inhibition in man. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 15, n. 3, p. 525–534, 2011.

QI, Xiaole *et al.* Intra-articular Administration of Chitosan Thermosensitive in Situ Hydrogels Combined with Diclofenac Sodium-Loaded Alginate Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 105, n. 1, p. 122–130, 2016.

RAINSFORD, K D; KEAN, W F; EHRLICH, G E. Review of the pharmaceutical properties and clinical effects of the topical NSAID formulation, diclofenac epolamine. *Current medical research and opinion*, v. 24, n. 10, p. 2967–2992, 2008.

RANU, Brindaban C.; BHAR, Sanjay. DEALKYLATION OF ETHERS. A REVIEW. *Organic Preparations and Procedures International*, v. 28, n. 4, p. 371–409, ago. 1996. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00304948909356417>>.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

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*, v. 26, n. 5, p. 493–507, 2011.

RONKEN, S. *et al.* A comparison of healthy human and swine articular cartilage dynamic indentation mechanics. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, v. 11, n. 5, p. 631–639, 2012.

SÁ-LIMA, Helena *et al.* Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose hydrogel as a three-dimensional extracellular matrix for cartilage-engineered applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 98 A, n. 4, p. 596–603, 2011.

SANFILIPPO, Sandra *et al.* Viability assessment of fresh and frozen/thawed isolated human follicles: Reliability of two methods (Trypan blue and Calcein AM/ethidium homodimer-1). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 28, n. 12, p. 1151–1156, 2011.

SARKAR, Nitis. Kinetics of thermal gelation of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 195–203, 1995.

SCHMITZ, N. *et al.* Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 18, p. S113–S116, 2010.

SHALL, Gabrielle *et al.* Effects of Passage Number and Differentiation Protocol on the Generation of Dopaminergic Neurons from Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 720, 2018.

SHAO, Huarong *et al.* Intra-articular injection of xanthan gum reduces pain and cartilage damage in a rat osteoarthritis model. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, n. 2, p. 1850–1857, 2013.

SHEN, Xiaoping *et al.* Hydrogels Based on Cellulose and Chitin: Fabrication, Properties, and Applications. *Green Chem.*, v. 18, p. 53–75, 2016.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 364, n. 2, p. 328–343, 2008.

SIGMA-ALDRICH. *Methylcellulose - M7140 - Product Information Sheet.*

SINGER, Victoria L. *et al.* Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence- based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry*, v. 249, n. 2, p. 228–238, 1997.

SISTACH, Carme M; GIBERT, Josep M; AREAL, Rogelio. Ageing of Laboratory Iron-gall Inks Studied by Reflectance Spectrometry. *Restaurator*, v. 20, p. 151–166, 1999.

SKAALURE, Stacey C.; CHU, Stanley; BRYANT, Stephanie J. An Enzyme-Sensitive PEG Hydrogel Based on Aggrecan Catabolism for Cartilage Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, v. 4, p. 420–431, fev. 2015.

SPILLER, Kara L; MAHER, Suzanne A; LOWMAN, Anthony M. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, v. 17, n. 4, p. 281–99, 2011.

SRIDHAR, Balaji V. *et al.* Development of a Cellularly Degradable PEG Hydrogel to Promote Articular Cartilage Extracellular Matrix Deposition. *Advanced Healthcare Materials*, v. 4, p. 702–713, abr. 2015.

STUDER, Deborah *et al.* Molecular and Biophysical Mechanisms Regulating Hypertrophic Differentiation in Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *European Cells and Materials*, v. 24, p. 118–135, 2012.

SULISTIO, Adrian *et al.* Intra-articular Treatment of Osteoarthritis with Diclofenac-Conjugated Polymer Reduces Inflammation and Pain. *ACS Applied Bio Materials*, v. 2, n. 7, p. 2822–2832, 2019.

SUNIL, PM *et al.* Stem cell therapy in oral and maxillofacial region: An overview. *Journal of*

Oral and Maxillofacial Pathology, v. 16, n. 1, p. 58, 2012.

SWORN, G. Xanthan gum. *Handbook of Hydrocolloids*. [S.l.]: Elsevier, 2009. p. 186–203.

TAN, H W; AZIZ, A R Abdul; AROUA, M K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 118–127, 2013.

TANG, Yajun *et al.* An improved complex gel of modified gellan gum and carboxymethyl chitosan for chondrocytes encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, n. 1, p. 46–53, 2012.

TANG, Yufeng *et al.* Production and characterisation of novel injectable chitosan/methylcellulose/salt blend hydrogels with potential application as tissue engineering scaffolds. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 3, p. 833–841, 2010.

TATE, Matthew C. *et al.* Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. *Biomaterials*, v. 22, n. 10, p. 1113–1123, 2001.

THIRUMALA, Sreedhar; GIMBLE, Jeffrey; DEVIREDDY, Ram. Methylcellulose Based Thermally Reversible Hydrogel System for Tissue Engineering Applications. *Cells*, v. 2, n. 3, p. 460–475, 2013.

VALIANI, A. *et al.* Comparison between the effect of kartogenin and TGF β 3 on chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in fibrin scaffold. *Bratislava Medical Journal*, v. 118, n. 10, p. 591–597, 2018.

VANDER HEIDEN, M. G. *et al.* Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, n. 17, p. 5899–5912, 2001.

VIEIRA, Júlia G. *et al.* Synthesis and characterization of methylcellulose from cellulose extracted from mango seeds for use as a mortar additive. *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 80–87, 2012.

VIKINGSSON, L. *et al.* Relationship between micro-porosity, water permeability and mechanical behavior in scaffolds for cartilage engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 48, p. 60–69, 2015.

VINATIER, C.; GUICHEUX, J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells

to osteoarthritis treatments. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, v. 59, n. 3, p. 139–144, 2016.

WALTER, Sebastian G; OSSENDORFF, Robert; SCHILDBERG, Frank A. Articular cartilage regeneration and tissue engineering models: a systematic review. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 139, p. 305–316, 2019.

WANG, Huihui *et al.* Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. *Molecular Medicine Reports*, v. 17, n. 5, p. 6551–6559, 2018.

WANG, Weiguang; RIGUEUR, Diana; LYONS, Karen M. TGF β signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, v. 102, n. 1, p. 37–51, 2014.

WEN, Liang *et al.* Gallic acid can play a chondroprotective role against AGE-induced osteoarthritis progression. *Journal of Orthopaedic Science*, v. 20, n. 4, p. 734–741, 2015.

WERNECKE, Chloe; BRAUN, Hillary J.; DRAGOO, Jason L. The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, v. 3, n. 5, p. 1–7, 2015.

WESTIN, Cecilia. *Adesão, crescimento e diferenciação de células-tronco mesenquimais dentárias em suportes porosos de quitosana-xantana e PCL projetados para o tratamento da osteoartrite*. 2016. 1–125 f. Universidade Estadual de |Campinas (UNICAMP), 2016.

WESTIN, Cecília B *et al.* Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the presence of kartogenin. *Materials Science and Engineering: C*, v. 80, p. 594–602, nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117303259>>.

WILLIAMS, P A; PHILLIPS, G O. GUMS: Properties of Individual Gums. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, n. 1990, p. 2992–3001, 2003.

WONG, Benjamin L.; SAH, Robert L. Effect of a focal articular defect on cartilage deformation during patello-femoral articulation. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 28, n. 12, p. 1554–1561, 2010.

WYLES, Cody C *et al.* Differential Cytotoxicity of Corticosteroids on Human Mesenchymal

Stem Cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 473, p. 1155–1164, 2015.

Y., Zaira *et al.* Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. [S.l.]: InTech, 2013. .

YAMAOKA, Hisayo *et al.* Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 78A, n. 1, p. 1–11, 2006.

YANG, Yueh-Hsun Kevin *et al.* Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 9, n. 1, p. 131, 2018.

YOON, Chong Hyeon *et al.* Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*, v. 80, n. 3, p. 274–279, 2013.

YU, Lin; DING, Jiandong. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society reviews*, v. 37, n. 8, p. 1473–81, 2008.

ZHANG, Fei *et al.* Viscosifying properties of corn fiber gum with various polysaccharides. *Food hydrocolloids*, v. 43, p. 218–227, 2015.

ZHANG, Jianying; WANG, James H-C. Kartogenin induces cartilage-like tissue formation in tendon-bone junction. *Bone research*, v. 2, p. 12–17, 2014.

ZHANG, Lijie *et al.* The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng.*, v. 37, n. 1–2, p. 1–57, 2009.

ZHANG, Zhiwei *et al.* Intra-Articular Injection of Cross-Linked Hyaluronic Acid-Dexamethasone Hydrogel Attenuates Osteoarthritis: An Experimental Study in a Rat Model of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 4, p. 1–14, 2016.

ZHU, Yanxia *et al.* Development of kartogenin-conjugated chitosan–hyaluronic acid hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials Science*, v. 5, n. 4, p. 784–791, 2017.