

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR A ARCABOUÇOS DE POLI (3-
HIDROXIBUTIRATO) FUNCIONALIZADOS COM FIBRONECTINA

Bruna Nunes Teixeira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Rio de Janeiro

Abril de 2013

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR A ARCABOUÇOS DE POLI (3-
HIDROXIBUTIRATO) FUNCIONALIZADOS COM FIBRONECTINA.

Bruna Nunes Teixeira

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.

Prof. Gutemberg Gomes Alves, D. Sc.

Prof. Luiz Carlos Pereira, D. Sc.

Dra. Marcia Soares Sader, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

ABRIL DE 2013

Teixeira, Bruna Nunes

Investigação da resposta celular a arcabouços de poli(3-hidroxi-butirato) funcionalizados com fibronectina./ Bruna Nunes Teixeira – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013

XVI, 94 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2013.

Referencias Bibliográficas: p. 87 - 95.

1. Biomateriais. 2. Poli(3-hidroxi-butirato). 3. Arcabouços Porosos. 4. Engenharia tecidual. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título

*Dedico este trabalho a minha avó,
Maria de Lourdes. Saudades sempre
sempre sempre!*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter conduzido meus passos até aqui. Agradeço também a São José, meu intercessor nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Marlice, que sempre me apoiaram e deram total suporte ao longo dos meus anos de estudo. Sem vocês, nenhuma conquista teria acontecido ou valido apenas. Nunca poderei retribuir tudo o que vocês já fizeram por mim.

A minha “rimã” Kelly, pelo incentivo e por todo o orgulho que sente de mim. A minha madrinha Magda, que sempre sabe o que dizer pra me deixar animada e a minha prima Mônica, por acompanhar minha jornada e torcer pelo meu sucesso. Amo vocês!

A minha família, por acompanharem todas as fases da minha vida e vibrarem por cada conquista já realizada.

A minha orientadora, professora Rossana Mara Thiré. Não apenas por tornar esse projeto possível, mas também por ser um exemplo de ser humano e profissional. Obrigada por ter me acolhido quando bati no laboratório pedindo “asilo científico” e por ter acreditado no meu potencial.

A minha colega de trabalho e amiga Taíla. Pela companhia no início da empreitada, pelas dicas, pelos conselhos, pelas correções, pelas conversas engraçadas... E, acima de tudo, pela troca de conhecimentos que foi tão enriquecedora!

Ao professor Gutemberg Alves, pela colaboração fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

À PHB Industrial S/A, por ter fornecido a matéria-prima deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

Aos funcionários do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Obrigada por toda ajuda e por serem sempre tão solícitos.

Aos professores Ricardo Tadeu Lopes e Inaya Lima, do laboratório de Instrumentação Nuclear (COPPE/UFRJ), pelas análises de microtomografia.

Ao professor José Nelson Couceiro, que despertou em mim a paixão pela pesquisa, ainda na graduação. As amigas do laboratório de Virologia Molecular, Marta, Aninha e Alba, que, além de me ensinarem técnicas laboratoriais, me ensinaram a ser uma pessoa disciplinada e comprometida. Obrigada pela amizade.

Aos meus colegas e, acima de tudo, amigos, que fazem ou fizeram parte do laboratório de biopolímeros: Tati, Márcio, Diogo, Diego, Felipe, Laura, Roberta, Sabrina, Clara, Paulo Henrique e Patrícia. Pessoal, sem vocês tudo teria sido imensamente mais difícil e muito, mas muito sem graça.

Aos colegas da Unidade de Pesquisa Clínica, do Hospital Universitário Antônio Pedro, em especial a querida Sharlene, a Adriana Linhares, Letícia, Dani e Róber. Obrigada por me acolherem e me ajudarem. A Luciana, do Laboratório de Cultura de células/CBPF.

Ao meu amigo-irmão Carlos Henrique, por todo o carinho, cumplicidade e amor.

Aos meus amigos, Bárbara, Camylle, Carol, Thiago, Taiana, Gisele, Aline e Anderson, que me ajudaram a distrair e abstrair sempre que foi preciso. A minha psicóloga Silvia, que me deixou muito mais sã em nosso tempo de trabalho juntas.

As queridas amigas de mestrado Carol e Camila, que passaram comigo por toda a empreitada de disciplinas. Pelas horas de estudo, pelas boas risadas e conversas e pelo incentivo. Não posso esquecer a queridíssima Renatinha, muito obrigada pelas conversas sempre engraçadas e reconfortantes.

A todos aqueles que torceram por mim e acreditaram que tudo daria certo.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR A ARCABOUÇOS DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) FUNCIONALIZADOS COM FIBRONECTINA.

Bruna Nunes Teixeira

Abril/2013

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta de células osteoblásticas MC3T3 aderidas sobre arcabouços de poli(3-hidroxitirato) – PHB - funcionalizados com fibronectina (Fn) imobilizada por adsorção física (PHB-FN) ou por ligação covalente (PHB-EDC-FN). Os arcabouços apresentaram porosidade de 85%, determinada por microtomografia. Por meio da estimativa de carga superficial, foi possível comprovar a imobilização da Fn e observar diferenças na forma de imobilização desta proteína em função do método utilizado. Os arcabouços foram considerados não-citotóxicos. A dosagem da atividade da fosfatase alcalina indicou que as células cultivadas nos três grupos de arcabouços estavam ativas e diferenciando-se em osteoblastos por volta do 14º dia. Foi verificado que a imobilização com Fn via ligação covalente propiciou maior espreadimento das células nas primeiras 48h de cultura em comparação com os demais grupos. Por outro lado, após 21 dias de cultivo, as células depositadas sobre todos os grupos apresentavam atividade e morfologia semelhante, com deposição de componentes de matriz extracelular. Os resultados sugerem que a imobilização de Fn sobre arcabouços de PHB e o método utilizado para a sua imobilização não afetam a atividade celular tardia e sua morfologia neste período.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

INVESTIGATION OF CELLULAR RESPONSE TO POLY (3-HYDROXYBUTYRATE) SCAFFOLDS FUNCTIONALIZED WITH FIBRONECTIN.

Bruna Nunes Teixeira

April/2013

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Department: Metallurgy and Materials Engineering

The aim of this study was to evaluate the response of MC3T3 osteoblastic cells adhered on poly(3-hydroxybutyrate) - PHB - scaffolds functionalized with fibronectin (Fn), which was immobilized by physical adsorption (PHB-FN) or by covalent bond (PHB-EDC-FN). The scaffolds showed 85% of porosity, as determined by microtomography. By the surface charge estimative, it was possible to confirm the immobilization of Fn and observe differences in immobilization of the protein depending on the method used. The scaffolds were considered non-cytotoxic. Determination of alkaline phosphatase activity indicated that cells cultured on the three groups of scaffolds were active and differentiating into osteoblasts at around the 14th day. It was found that immobilization via covalent bond with Fn provided greater spreading of the cells within the first 48 h of culture when compared with the other groups. On the contrary, after 21 days of culture, the cells cultured on all groups had similar activity and morphology, with deposition of extracellular matrix components. The results suggest that immobilization of Fn on PHB scaffolds and the method used for its immobilization did not affect the late cellular activity and their morphology in this period.

Índice Geral

CAPÍTULO 1 - Introdução e Objetivo.....	1
1.1. Introdução	1
1.2. Objetivos.....	4
CAPÍTULO 2 – Revisão Bibliográfica	5
2.1. Engenharia Tecidual	5
2.2. Biomateriais.....	8
2.2.1. Biomateriais poliméricos:	9
2.2.2. Polihidroxialcanoatos.....	10
2.2.3. Poli (3-hidroxibutirato)	11
2.2.4. Arcabouços tridimensionais	14
2.3. Funcionalização da superfície	16
2.3.1. Fibronectina.....	18
2.4. Adesão e Proliferação Celular	21
2.5. Tecido ósseo	23
3.1. Materiais.....	29
CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos.....	30
3.2. Produção dos arcabouços.....	30
3.2.1. Solução de PHB.....	30
3.2.3. Faixa granulométrica do agente porogênico	30
3.2.4. Produção de poros pelo processo de lixiviação de sacarose	31
3.2.5. Hidrólise com solução de NaOH.....	32
3.3. Caracterização físico-química dos arcabouços.....	32
3.3.1. Análise Termogravimétrica (TGA)	32

3.3.2. Caracterização morfológica dos arcabouços por Microtomografia.....	33
3.3.3. Análise morfológica dos arcabouços por microscopia eletrônica de varredura	34
3.3.4. Determinação da porosidade aparente dos arcabouços.....	35
3.4. Avaliação das propriedades mecânicas dos arcabouços pós-hidrólise	36
3.5. Ativação da superfície	37
3.5.1. Incorporação do agente de acoplamento	37
3.5.2. Imobilização de Fibronectina	38
3.6. Caracterização dos arcabouços de PHB modificados	38
3.6.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	38
3.6.2 Estimativa de cargas sobre os arcabouços por cristal violeta.....	40
3.7. Análise estatística	40
3.8. Estudo da interação arcabouço-osteoblastos.....	41
3.8.1. Cultura de células ósseas.....	41
3.8.2. Análise de citotoxicidade	42
3.8.3. Dosagem de proteínas totais, fosfatase alcalina e íons cálcio	42
3.8.4. Morfologia Celular e Micro-análise elementar da superfície dos arcabouços ..	44
CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussão.....	46
4.1. Produção e caracterização físico-química dos arcabouços	46
4.1.1. Análise termogravimétrica	47
4.1.2. Análise morfológica dos arcabouços	49
4.1.3. Avaliação das propriedades mecânicas dos arcabouços pós-hidrólise	58
4.2. Caracterização dos arcabouços de PHB modificados	60
4.2.1. Composição química.....	60
4.3. Cultura de células ósseas.....	69
4.3.1. Citotoxicidade.....	69
4.3.2. Dosagem de proteína totais, fosfatase alcalina e íons cálcio	71
4.3.4. Morfologia celular	77

CAPÍTULO 5 – Conclusões	84
5.1. Conclusões	84
5.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	85
CAPÍTULO 6 – Referências Bibliográficas.....	87

Índice de Figuras

Figura 2.1. Estrutura química dos polihidroxicanoatos.....	11
Figura 2.2. Estrutura química do Poli (3-hidroxi-butirato).....	12
Figura 2.3. Estrutura da fibronectina plasmática e seus respectivos domínios de ligação.....	20
Figura 2.4. Estrutura básica do tecido ósseo.....	24
Figura 2.5. Esquema da ativação do processo de reabsorção óssea mediado pela ligação de RANK/RANKL/OPG.....	26
Figura 4.1. Arcabouço de PHB produzido pela técnica de lixiviação de particulado.....	46
Figura 4.2. Análise termogravimétrica de (a) arcabouço antes do processo de lixiviação e de (b) arcabouço lixiviado.....	48
Figura 4.3. Imagens de microtomografia de arcabouços de PHB antes da hidrólise.....	49
Figura 4.4. Imagens de microtomografia de arcabouços de PHB hidrolisados.....	50
Figura 4.5. Gráfico da distribuição de poros em arcabouço de PHB não hidrolisados.....	51

Figura 4.6. Gráfico da distribuição de poros em arcabouço de PHB não hidrolisados.....	52
Figura 4.7. Micrografias de MEV mostrando a alta porosidade da superfície de arcabouços de PHB em contato com moldes de vidro (a), em relação a superfície em contato com o ar (b).....	54
Figura 4.8. Micrografias da seção transversal (a) e da seção lateral (b) dos arcabouços.....	55
Figura 4.9. Curva tensão compressiva x deformação de um arcabouço PHB.....	59
Figura 4.10. Espectro de FTIR do PHB hidrolisado.....	61
Figura 4.11. Representação dos espectros de arcabouços de PHB modificados com Fn.....	62
Figura 4.12. Detalhamento dos espectros de FTIR dos arcabouços de PHB, PHB-EDC-FN e PHB-FN.....	63
Figura 4.13. Arcabouços corados por cristal violeta, após eluição por metanol e seus respectivos valores de absorbância (porcentagem de absorção de luz).....	65
Figura 4.14. Intensidade da cor azul dos arcabouços de PHB (a), PHB-FN (b) e PHB-EDC-FN (c).....	67
Figura 4.15. Gráfico da análise de citotoxicidade por incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos das células MC3T3. Estão representados os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas respectivas barras de erro.....	70

Figura 4.16. Dosagem de proteínas totais, produzidas pelas células MC3T3, ao longo de 21 dias de cultura. Constam os valores encontrados para cada tempo/amostra e tempo/controle, e as suas respectivas barras de erro.....	72
Figura 4.17. Atividade da enzima fosfatase alcalina, produzida pelas células MC3T3, ao longo de 21 dias de cultura. Constam os valores encontrados para cada tempo/amostra e tempo/controle, e as suas respectivas barras de erro (* p < 0,05).....	73
Figura 4.18. Atividade da enzima fosfatase alcalina, produzida pelas células MC3T3, ao longo de 21 dias de cultura, normalizada pelo padrão de proteínas totais produzidas pelas células, nos respectivos tempos (* p < 0,05).....	75
Figura 4.19. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB, com 2 dias de cultura.....	77
Figura 4.20. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-FN, com 2 dias de cultura.....	78
Figura 4.21. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-EDC-FN, com 2 dias de cultura. (b) Detalhamento da área analisada em (a).....	78
Figura 4.22. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB, com 21 dias de cultura.....	80
Figura 4.23. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-FN, com 21 dias de cultura.....	81
Figura 4.24. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-FN, com 21 dias de cultura.....	81

Figura 4.25. Micrografia de MEV da lateral externa de um arcabouço de PHB após 21 dias de cultura.....83

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

Ao longo dos anos, a medicina regenerativa lança mão de diversos recursos para o tratamento de tecidos e órgãos danificados. O transplante é uma das técnicas mais empregadas na cura de lesões ou doenças que levam a perda das funções teciduais normais. Porém, os diferentes tipos de transplantes apresentam determinadas limitações, como a escassez de doadores e de material doado, o risco de contaminação do organismo receptor por patógenos oriundos do organismo doador, além do risco de rejeição do material transplantado. Devido a esses fatores, é crescente a busca por alternativas que possam ser utilizadas, com eficácia, no tratamento de injúrias (BADYLAK *et. al.*, 2010).

Os materiais utilizados para regeneração tecidual podem ser classificados como temporários ou permanentes, de origem natural ou sintética, quanto às classes podem ser poliméricos, metálicos, cerâmicos ou materiais compósitos. Ligas metálicas são amplamente empregadas na regeneração de lesões ósseas, porém apresentam desvantagens, tais como a baixíssima taxa de degradação em ambiente biológico, ter o potencial carcinogênico no organismo e a possibilidade de corrosão do material, com a liberação de partículas que podem estimular uma resposta imune aguda no paciente. Além disso, em alguns casos, os implantes metálicos necessitam de remoção, expondo o paciente aos riscos de uma nova cirurgia. Essas desvantagens associadas ao uso de ligas metálicas no organismo fazem com que os materiais poliméricos e compósitos ganhem cada vez mais espaço como alternativas para utilização na medicina regenerativa (BARBANTI *et. al.*, 2005).

A engenharia tecidual é uma área interdisciplinar que abrange conhecimentos das ciências da saúde (biologia, medicina, entre outras) e da engenharia. Seu principal foco é a busca por substitutos biológicos que possam reparar tecidos danificados e/ou desempenhar funções de tecidos saudáveis (NEREM E SAMBANIS, 1995).

Para que um biomaterial seja um candidato em potencial para ser usado na regeneração de um sítio do corpo, deverá possuir algumas características básicas, tais como biocompatibilidade, capacidade de biodegradação e bioreabsorção e propriedades mecânicas compatíveis àquelas apresentadas pelo tecido a ser regenerado. Além disso, deve ser facilmente fabricado e produzido. Muitos dos materiais poliméricos apresentam essas características e, por isso, se tornaram alvo de estudos da engenharia tecidual (LIU *et. al.*, 2009).

Os biomateriais podem ser moldados em arcabouços porosos. A interconexão desses poros é fundamental para os processos de adesão, espraiamento e crescimento celular no material (MURPHY *et. al.*, 2010). As propriedades mecânicas do arcabouço terão papel importante na diferenciação celular, uma vez que é preciso fornecer à célula uma superfície que apresente rigidez para suportar seu peso e certa tenacidade para que o material não frature e perca suas características estruturais tão facilmente. Essa última característica irá variar de acordo com o tipo de tecido a ser produzido.

Dentre os polímeros, os polihidroxialcanoatos se destacam como possíveis alternativas para uso na regeneração tecidual, pois possuem algumas das propriedades desejadas para um biomaterial. São poliésteres produzidos por diferentes tipos microbianos. Os polihidroxialcanoatos podem ser capazes de regenerar diversos tecidos, como osso, cartilagem, pele, tendão entre outros.

O poli (3-hidroxi-butilato), também chamado PHB, é um polímero pertencente ao grupo dos polihidroxialcanoatos (SUDESH *et. al.*, 2000). Apesar de ser biodegradável, bioreabsorvível e biocompatível com diversos tipos celulares não possui grupamentos sinalizadores de adesão celular em sua superfície, ou seja, não é bioativo.

Os arcabouços de PHB podem ser produzidos de diferentes maneiras e podem ser modificados, fazendo com que esse material possa atender as necessidades específicas dos diferentes tratamentos para a qual ele será empregado (PUPPI *et al.*, 2010). Um desses processos de modificação acontece pela imobilização de proteínas na superfície do material, a fim de aperfeiçoar os processos biológicos (GARCÍA *et al.*, 1999). Uma molécula que pode ser imobilizada no arcabouço é a **fibronectina (Fn)**, proteína adesiva que se encontra na forma solúvel no plasma e insolúvel na matriz extracelular e que participa de diversos processos fisiológicos, como a cicatrização, adesão celular, migração, espreadimento, diferenciação e proliferação (VALLIÈRES *et al.*, 2007). Essa proteína possui sítios de ligação para integrinas, que são proteínas inseridas na membrana citoplasmática das células funcionando como receptores que promovem a adesão célula-matriz e célula-célula.

A adesão das células ao material é o processo chave, que irá desencadear cascatas sinalizadoras que induzirão a proliferação das células e, assim, a colonização do arcabouço. Portanto promover a adesão de forma que haja a **interação** da célula com a superfície do material, e não apenas o **contato** entre eles, é um passo fundamental para a criação de um tecido, *in vitro* (BAUJARD-LAMOTTE *et al.*, 2008).

Após a colonização do arcabouço pelas células, é necessário avaliar a morfologia celular, que deve condizer com os padrões encontrados em tecido ósseo saudável e também avaliar o comportamento metabólico destas células, acompanhando a produção de marcadores de atividade osteoblástica, tais como fosfatase alcalina, fosfato de cálcio e algumas citocinas produzidas por essa linhagem. A dosagem de RANKL e OPG expressos pelas células osteoblásticas permite avaliar a atividade celular, se o metabolismo está funcionando corretamente e, além disso, estimar se processos fundamentais na remodelação do tecido ósseo serão feitos de maneira adequada.

1.2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de células da linhagem osteoblástica MC3T3 cultivadas sobre arcabouços porosos de PHB funcionalizados com fibronectina (Fn), visando a aplicação deste material na área de engenharia ssea.

Objetivos específicos:

- Produção dos arcabouços pela técnica de lixiviação de particulado, utilizando sacarose como agente porogênico;
- Avaliação das características morfológicas, químicas e mecânicas de arcabouços de PHB;
- Funcionalização dos arcabouços com a proteína Fn via ligação covalente ou adsorção física;
- Estudo do comportamento de células MC3T3 cultivadas nos arcabouços porosos de PHB modificados com fibronectina;
- Avaliação da resposta celular ao tipo de método de imobilização de Fn utilizado.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Engenharia Tecidual

Com o avanço da medicina e demais ciências, pesquisadores vêm buscando alternativas eficientes no tratamento de órgãos e tecidos danificados. Atualmente, transplante é uma das técnicas mais utilizadas na medicina regenerativa e se dividem em:

1. Transplante autólogo - O tecido a ser transplantado é retirado do próprio receptor;
2. Transplante alógeno - O tecido transplantado é obtido a partir de um doador da mesma espécie do receptor;
3. Transplante heterólogo - O tecido a ser transplantado é obtido a partir de uma espécie diferente da espécie do receptor.

Os transplantes autólogos e alógenos vêm desempenhando um bom papel na regeneração de tecidos e órgãos danificados, porém, a escassez de doadores da mesma espécie em oposição ao grande número de pacientes que necessitam de transplante, a possibilidade de rejeição imune e o risco de lesão e infecção no local em que o tecido transplantado é retirado (no caso de transplante autólogo) são algumas das desvantagens desse procedimento. Outra alternativa no tratamento de órgãos e tecido lesionados é a reconstrução cirúrgica. Porém, muitas vezes, esse procedimento deixa algum tipo de

sequela nos pacientes, tais como incontinência urinária, deformação na superfície reconstruída, entre outras. Devido a essas desvantagens nas técnicas usualmente empregadas, inúmeros esforços vêm sendo concentrados na busca de novas formas de restauração e manutenção de tecidos e órgãos (ALSBERG *et al.*, 2001).

A engenharia tecidual é uma área interdisciplinar que agrega conhecimentos de engenharia e de ciências biológicas e médicas a fim de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou forneçam ao receptor funções de tecidos saudáveis (LANGER e VACANTI, 1993; LIU e MA, 2004). Em 1988 foi realizado o primeiro encontro de medicina regenerativa cujo assunto era exclusivamente a engenharia tecidual. Nele surgiu a seguinte definição:

A engenharia tecidual consiste na aplicação dos princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida para a compreensão fundamental da estrutura/função de tecidos normais em relação a tecidos doentes, em mamíferos, e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar suas funções (NEREM E SAMBANIS, 1995).

Um tecido vivo íntegro consiste em um conjunto de células organizadas com estrutura tridimensional característica. Por isso, entender o comportamento celular do tecido alvo e suas necessidades mecânicas e fisiológicas é um passo fundamental para a produção de um substituto biológico que possa desempenhar bem suas funções específicas (ESPOSITO *et al.*, 2010). Diferentes tipos celulares podem ser usados na regeneração tecidual: células tronco embrionárias, células tronco de adultos, linhagens de células progenitoras específicas de determinados tecidos e células tronco

pluripotentes com diferenciação induzida (BADYLAK & NEREM, 2010). O crescimento destas é feito em matrizes naturais ou sintéticas (arcabouços – *scaffolds*).

A engenharia tecidual abrange quatro áreas principais. A primeira consiste no uso de matrizes acelulares (arcabouços artificiais ou partes de tecido vivo submetidas ao processo de de-celularização) que estimulam as habilidades do corpo do receptor a orientar e direcionar o crescimento do novo tecido. A segunda área engloba o uso de matrizes com células inseridas. Quando implantada no receptor, a matriz é degradada lentamente e vai sendo substituída pela matriz extracelular que vai sendo depositada pelas células. A terceira baseia-se no uso de moléculas de sinalização de crescimento e/ou diferenciação, que contribuem para a regeneração tecidual. E, por último, o uso de injeções contendo apenas células ou células carregadas em hidrogéis, que são inseridas diretamente no tecido danificado e recebem sinais indutores de proliferação, promovendo a regeneração (ATALA, 2007).

A produção de cada tecido ou órgão irá requerer técnicas de cultivo celular específicas, além de diferentes tipos de arcabouços que atendam as necessidades do tecido, a fim de obter melhora dos resultados. A escolha do material para a confecção de um arcabouço, bem como a escolha de seu formato e dimensões, quantidade de poros, dentre outros, deve ser feita levando em consideração que eles deverão proporcionar o crescimento celular adequado e possibilitar que as células permaneçam viáveis depois de certo tempo de cultivo (ATALA, 2007; MISRA *et al.*, 2010).

2.2. Biomateriais

Diversos materiais vêm sendo utilizados como opções no tratamento de tecidos danificados. Esses materiais compreendem metais, cerâmicos, polímeros ou compósitos. Em revisão publicada por (WILLIAMS, 1999), a seguinte definição para biomateriais é utilizada:

...qualquer material, natural ou artificial, que compreende o todo ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, acrescenta ou substitui uma função natural.

Ligas metálicas vêm sendo utilizadas com frequência em cirurgias regenerativas. No entanto, metais e alguns materiais cerâmicos, sofrem pouca ou nenhuma degradação em ambiente biológico, sendo necessária, em alguns processos regenerativos, a realização de procedimentos cirúrgicos para sua retirada. Na maior parte dos casos, os metais são deixados no local da lesão permanentemente (LANGER & VACANTI, 1993).

A permanência prolongada dos implantes metálicos em um organismo apresenta uma série de riscos, tais como: a corrosão do implante, a possibilidade do material gerar uma resposta imune aguda, o potencial carcinogênico e, em alguns casos, o implante metálico causa alterações na fisiologia óssea (FERREIRA *et al.*, 2008). Por isso, polímeros e compósitos surgem como as principais alternativas para a produção de arcabouços na engenharia tecidual (LIU e MA, 2004; BADYLAK e NEREM, 2010).

Para que um material seja considerado uma alternativa de uso na engenharia tecidual, o mesmo deverá ter algumas características básicas, tais como biocompatibilidade, capacidade de ser degradado em ambiente biológico, ser facilmente produzido, além de possuir boas propriedades mecânicas para o suporte celular (YANG *et. al.*, 2001).

2.2.1. Biomateriais poliméricos:

Dentre os materiais utilizados para a regeneração tecidual, os polímeros se destacam graças a algumas de suas características, tais como a composição química, que lhes confere boa flexibilidade e a possibilidade de ser moldado de acordo com necessidades específicas. Outro fator muito atrativo dessa classe de biomateriais é fato de sua composição molecular permitir, na maioria dos casos, que sejam degradados em ambiente biológico (LIU & MA, 2004). Duas classes de polímeros são empregadas como biomateriais: os polímeros de origem natural e os polímeros de origem sintética. Um exemplo de polímero natural é o colágeno, proteína mais abundante no corpo de mamíferos, que pode ser purificado através de tratamentos enzimáticos e extraído com sal/ácido. Já os polímeros sintéticos, onde se incluem os α -hidróxi-ácidos, são degradados por hidrólise não enzimática e o tempo para essa degradação depende de suas propriedades físicas e químicas. Os polímeros naturais possuem, como principal vantagem, a capacidade de reconhecimento biológico. Porém, não são produzidos em larga escala e suas características físicas, químicas e estruturais variam muito dentro do mesmo grupo. Em contrapartida, os polímeros sintéticos podem ser produzidos em larga escala, sem que aconteçam grandes alterações em sua estrutura e propriedades (ATALA, 2007).

Poliésteres de origem natural são amplamente utilizados na confecção de arcabouços. São polímeros que degradam, principalmente, por hidrólise, devido à quebra das ligações ésteres, formando grupos terminais carboxila e hidroxila (FERREIRA *et al.*, 2008). Os produtos desta degradação são metabólitos não tóxicos que, geralmente, são eliminados do organismo na forma de dióxido de carbono e água. Essa taxa de degradação pode ser controlada de acordo com suas propriedades físicas (temperatura de transição vítrea, grau de cristalinidade, peso molecular, entre outros). São termoplásticos e, por isso, facilmente moldáveis de acordo com a arquitetura desejada (DUTTA & DUTTA, 2009).

2.2.2. Polihidroxicanoatos

Pertencentes ao grupo dos poliésteres, os polihidroxicanoatos são cadeias alifáticas produzidas por determinados grupos de microrganismos, tais como *Escherichia coli* recombinante, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, entre outros (Figura 2.1). O tamanho das cadeias desses polímeros tende a variar muito e o radical é alterado de acordo com o tipo que é produzido. Essa mudança no radical afeta diversas características do material, tais como hidrofobicidade, temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e o grau de cristalinidade (X_c). O ponto de fusão dos polihidroxicanoatos varia entre 40° a 180°C, o grau de cristalinidade gira em torno de 50% e possuem alto peso molecular. Os polihidroxicanoatos, geralmente, são biodegradáveis e biocompatíveis. (CHEN & WU, 2005).

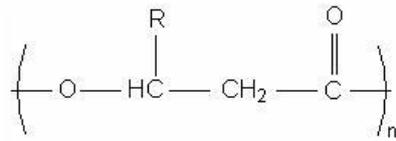


Figura 2.1. Estrutura química dos polihidroxicanoatos

Com a finalidade de encontrar biomateriais que sejam boas alternativas à regeneração tecidual, alguns tipos de polihidroxicanoatos vêm sendo estudados, tais como o poli (3-hidroxiacetato) (PHA), poli (3-hidroxi-3-fenilacetato) (PHB), poli (4-hidroxiacetato), poli (3-hidroxiacetato) (PHBV) e copolímeros como PHA/PHBV. Apenas o PHB e o PHBV são produzidos em larga escala, processo que acontece através da extração do material, que se encontra armazenado em vacúolos citoplasmáticos na célula microbiana. Após a extração, são purificados através de tratamento enzimático (NAIK *et. al.*, 2008).

2.2.3. Poli (3-hidroxiacetato)

O PHB é um polihidroxicanoato, amplamente produzido por bactérias, tais como *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e outras (CHOI & LEE, 1997). Os microrganismos podem acumular grânulos de PHB em seu citoplasma quando estão em situação de escassez de nutrientes: essa macromolécula funcionará como reserva energética para a célula (MADISON & HUISMAN, 1999).

O monômero de sua cadeia é o (R)-3-hidroxi-butirato (LENZ & MARCHESSAULT, 2005) (Figura 2.2). É compatível com diversos grupos de células e, por isso, possui grande aplicabilidade para a regeneração de diversos tecidos. É biodegradável, biocompatível e bioreabsorvível, porém não apresenta grupamentos químicos superficiais que induzam a adesão, proliferação e diferenciação celular, ou seja, não se trata de um material bioativo (GRIFFITH, 2000). A degradação desse polímero acontece de forma lenta, sendo controlada pelo crescimento das células do tecido. O PHB não é tóxico para as células, uma vez que sua decomposição leva a um produto normalmente encontrado no sangue, o ácido D-3-hidroxi-butírico (MISRA *et al.*, 2010).

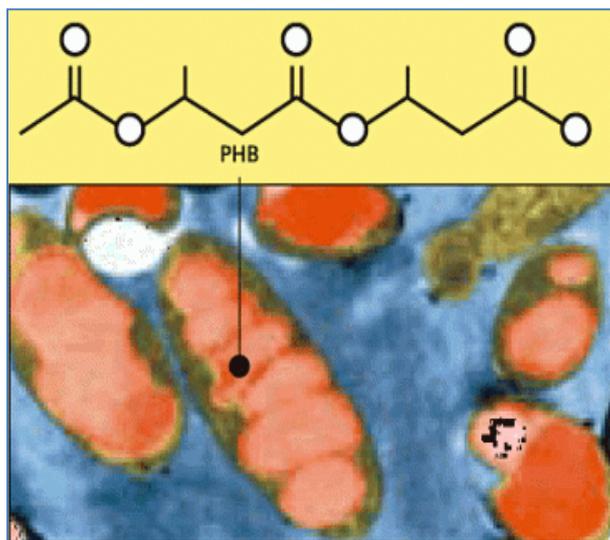


Figura 2.2. Estrutura química do Poli (3-hidroxi-butirato)

Por ser um polímero produzido por microrganismos, suas propriedades tendem a sofrer pequenas variações de acordo com o modo na qual ocorreu sua síntese, com o

tipo de microrganismo envolvido no processo e o ambiente ao qual esse microrganismo foi exposto.

A temperatura de fusão do PHB gira em torno dos 175°C e sua temperatura de transição vítrea gira em torno dos 5°C (LEE, 1996). Sua cristalinidade varia entre 55% e 80%. O PHB apresenta diversas propriedades, tais como: resistência a umidade, pureza óptica e piezoelectricidade. Essa última propriedade auxilia no processo de osteogênese. O PHB é um material termicamente instável, se decompondo na temperatura de 200°C, que é muito próxima a sua temperatura de fusão (PHILIP *et. al.*, 2007).

As propriedades mecânicas do PHB (Young de 3,5 GPa e resistência a tração de 40MPa) são semelhantes às propriedades do polipropileno, um plástico utilizado na confecção de brinquedos, tubos, seringas, entre outros. Entretanto, o PHB possui alongamento de ruptura de apenas 5%, muito abaixo dos 400% do polipropileno, o que caracteriza esse material como um plástico duro e quebradiço (LEE, 1996).

O PHB apresenta certa permeabilidade ao oxigênio e resistência aos raios ultravioleta, porém sofre degradação quando exposto a ambientes ácidos ou básicos. É um material solúvel em clorofórmio e outros hidrocarbonetos halogenados. A degradação mais acelerada desse material acontece em ambientes como esgoto, solos úmidos, rúmen, água do mar e *in vivo*. A degradação *in vitro* se dá de forma lenta e controlada (ARKIN & HAZER, 2002). Em trabalho publicado em 2002, Freier *et. al* fizeram um levantamento do tempo de degradação do PHB *in vivo*, que variaram de acordo com a forma com a qual o material foi moldado (filme ou arcabouço), a forma de preparo da solução polimérica e, também, com o sítio na qual o biomaterial foi implantado. Por exemplo, amostras de filmes de PHB implantadas via intraperitoneal,

em ratos, mostraram uma rápida degradação inicial, com desaceleração da taxa de degradação após quatro semanas (FREIER *et al.*, 2002).

Estas características de degradação frente ao ambiente fizeram com que o PHB seja objeto de estudos relativos à regeneração de diversos tecidos, tais como cartilagem, tecido nervoso e tecido ósseo. Além das aplicações na engenharia tecidual, esse polímero pode ser utilizado como substituto sustentável aos plásticos não degradáveis. Esse biomaterial também vem sendo estudado como alternativa para a produção de biocombustíveis.

2.2.4. Arcabouços tridimensionais

Células podem ser cultivadas, *in vitro*, utilizando suportes em duas dimensões (2D), onde há formação de monocamadas, ou utilizando suportes em três dimensões (3D), conhecidos como arcabouços, onde múltiplas camadas são formadas. O crescimento em matriz 2D não simula, corretamente, as condições encontradas pelas células *in vivo*. Principalmente porque, ao formar um tecido *in vivo*, as células crescem e se dispõem em 3D, cercadas por matriz extracelular, células de outros tecidos e excretas celulares. A arquitetura específica do tecido, suas propriedades químicas e mecânicas e a comunicação célula-célula são perdidas sob as condições simplificadas da matriz 2D (TIBBITT E ANSETH, 2009). O meio de cultura fornece inúmeros fatores que irão auxiliar o crescimento celular, porém, a ausência de uma matriz extracelular natural, onde existem proteínas covalentemente ligadas que desempenham papel fundamental na morfologia celular, faz com que o crescimento e diferenciação dessas células sejam diferentes daquele encontrado *in vivo* (DUTTA E DUTTA, 2009).

Ao contrário do cultivo em matriz 2D, o cultivo em arcabouços possibilita recriar a arquitetura e funções de diferentes tecidos. Além disso, essa estrutura tecidual consegue se manter estável, sob certas condições. Ao longo do tempo, pesquisas vêm mostrando que o uso desse tipo de matriz torna o estudo de tecidos, *in vitro*, mais próximos das condições encontradas *in vivo* (PAMPALONI *et al.*, 2007).

A fabricação dos arcabouços dependerá das características de massa e superfície do material desejado, além da finalidade para qual o arcabouço será utilizado. As técnicas usualmente empregadas para fabricação de arcabouços poliméricos envolvem calor e/ou pressão ou o uso de solventes orgânicos, visando moldar o material de acordo com a forma de interesse. Atualmente, emprega-se, ainda, técnicas de prototipagem rápida para desenvolver diferentes tipos e formatos de arcabouços. Escolher a técnica apropriada de fabricação do arcabouço é fundamental para que este possua características que satisfaçam as necessidades das células dos diferentes tecidos, que serão cultivadas sobre eles (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011).

A composição química do material utilizado será importante na simulação do ambiente e na regulação do fenótipo (DUTTA E DUTTA, 2009). O arcabouço ideal não deve ser imunogênico, possuir certa tenacidade (visando à estabilização das células que se depositam estiradas sobre ele, o que varia de acordo com o tecido), deve ser poroso de forma a permitir o crescimento e arranjo das células em 3D e estes deverão ser interconectados (KHALED E VAFAI, 2003).

A porosidade do arcabouço, bem como o tamanho desses poros, é de fundamental importância na sobrevivência e proliferação celular. A interconexão dos poros permitirá o crescimento celular, a migração de células além do fluxo de nutrientes

e oxigênio (MURPHY *et. al.*, 2010). O arcabouço também deve ser de fácil produção e manuseio e ser adaptável a diferentes ambientes do corpo (HOLLISTER, 2005).

Com o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo de células em matriz 3D, os estudos sobre o comportamento e morfologia celular, estrutura e função de tecidos, bem como o estudo da liberação de drogas em um tecido alvo serão cada vez mais eficientes. Ao recriar um ambiente similar a um tecido vivo, *in vitro*, haverá a redução no uso de modelos animais para esses estudos (CHEN *et. al.*, 2001).

2.3. Funcionalização da superfície

As propriedades físicas e químicas de uma superfícies têm influência direta na resposta celular. O tratamento de superfície realizado em um material para a engenharia de tecido ósseo tem como objetivos a redução do tempo de carregamento após a cirurgia, acelerar o crescimento e a maturação dos osteoblastos, garantir o sucesso dos materiais enxertados em regiões altamente danificadas (que apresentam menor quantidade de tecido), obter maior área possível de osseointegração, promover contato osso-material sem a interposição de camadas proteicas amorfas, atrair células osteoprogenitoras e proteínas de ligação específicas para células osteogênicas (Fn) (BRANDÃO *et.al.*, 2010).

Para a formação de um tecido, *in vitro*, utilizando um arcabouço como suporte para as células, é importante promover alterações superficiais com agentes que conduzam a orientação das células e organizem o processo de adesão celular, permitindo, assim, a migração, diferenciação e posterior estabelecimento do tecido.

Uma das técnicas empregadas na modificação de biomateriais é a imobilização de proteínas na superfície de arcabouços, a fim de mediar a interação célula-biomaterial (MA, 2008).

São, usualmente, empregados três tipos de modificações de superfícies:

- Modificação biológica - consiste na incorporação de biomoléculas, geralmente macromoléculas, na superfície do material, visando promover o reconhecimento da superfície pelas células, proporcionando maior adesão, proliferação, migração e diferenciação. As macromoléculas mais utilizadas são das classes das proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e compostos moleculares (lipoproteínas, glicoproteínas);
- Métodos físico-químicos - consiste na imobilização de grupamentos químicos à superfície do material;
- Métodos de recobrimento - consiste na deposição de recobrimentos ou filmes finos sobre a superfície dos materiais (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos apontam proteínas de matriz extracelular atuando como sítios de ancoramento das integrinas celulares (heterodímeros transmembrana que interagem com os filamentos do citoesqueleto na porção intramembrana), que são fundamentais nos processos de adesão e espraiamento celular (YANG *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2007).

Proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos covalentemente ligados. No total, existem 20 aminoácidos diferentes que estão agrupados em polares e apolares. As diferentes combinações destes aminoácidos e as diferentes estruturas assumidas por eles levam a formação das proteínas existentes. A estrutura primária das proteínas consiste na cadeia formada pelos aminoácidos. A estrutura secundária das proteínas diz respeito aos arranjos estáveis entre os resíduos de aminoácidos, dando

origem a padrões estruturais recorrentes. A estrutura terciária se dá a partir das interações do tipo ligações de hidrogênio entre as cadeias, levando a formação de dobras, curvas e espirais, formas conhecidas como conformação proteica. Quando a proteína possui duas ou mais subunidades peptídicas, o arranjo espacial que ela assume é conhecido como estrutura quaternária (NELSON & COX, 2011).

Essas macromoléculas estão presentes tanto nas células como na matriz extracelular e são responsáveis por diversos processos de sinalização. A matriz extracelular é uma espécie de arcabouço natural da célula, formada por diversas moléculas de matriz, incluindo as glicoproteínas, fibronectina, colágeno, laminina, proteoglicanas e outras moléculas como os fatores de crescimento (ALBERTS *et al.*, 2010a).

Diferentes tipos proteicos podem ser utilizados a fim de funcionalizar uma superfície. Ao escolher utilizar as proteínas oriundas da matriz extracelular, o processo de adesão das células a superfície do material será favorecido. Já a utilização dos fatores de crescimento favorecem os processos de proliferação e diferenciação celular (MA *et al.*, 2007).

2.3.1. Fibronectina

A Fibronectina (Fn) é uma glicoproteína dimérica, cuja massa molar varia de 440.000 a 500.000 Da. É uma das principais proteínas de matriz extracelular, onde se apresenta em sua forma insolúvel. Também está presente no plasma, onde se encontra em sua forma solúvel, fluídos extracelulares e tecido conectivo e está ligada a superfície das células (GIAMBLANCO *et al.*, 2011). Essa proteína apresenta papel importante na

adesão, migração e diferenciação celular. A Fn apresenta, em sua estrutura, sequências de aminoácidos que funcionam como sítios de ligação para receptores presentes na superfície celular, as integrinas. Essa sequência de aminoácidos é conhecida por RGD (R= Arginina, G= Glicina e D= Ácido aspártico) (Magnusson & Mosher, 1998) (Figura 2.3). Uma vez que células precursoras de osteoblastos humanos secretam fibronectina e também interagem com estas proteínas, a imobilização destas na superfície de arcabouços contribui significativamente para a regeneração de tecido ósseo (MENDONÇA *et al.*, 2009).

Mendonça *et. al.* (2009) estudaram a adsorção de Fn em arcabouços de PHB e observaram que a conformação dessa proteína sobre a superfície do material possui grande relevância para a bioatividade. A estrutura terciária da Fn está sujeita a variações de acordo com o ambiente a qual ela é exposta. Quando a fibronectina se encontra estendida na superfície de um dado material ela expõe seus sítios de reconhecimento para integrinas. Essa exposição dos sítios de reconhecimento é de suma importância nos processos de ancoragem e adesão celular (RUOSLAHT, 1988). Em estudo realizado em 1999, García *et. al.* estudaram a adsorção da FN em diferentes superfícies, demonstrando que a conformação da proteína aderida a substratos pode ser modificada para regular sua interação com os receptores presentes na superfície celular, as Integrinas.

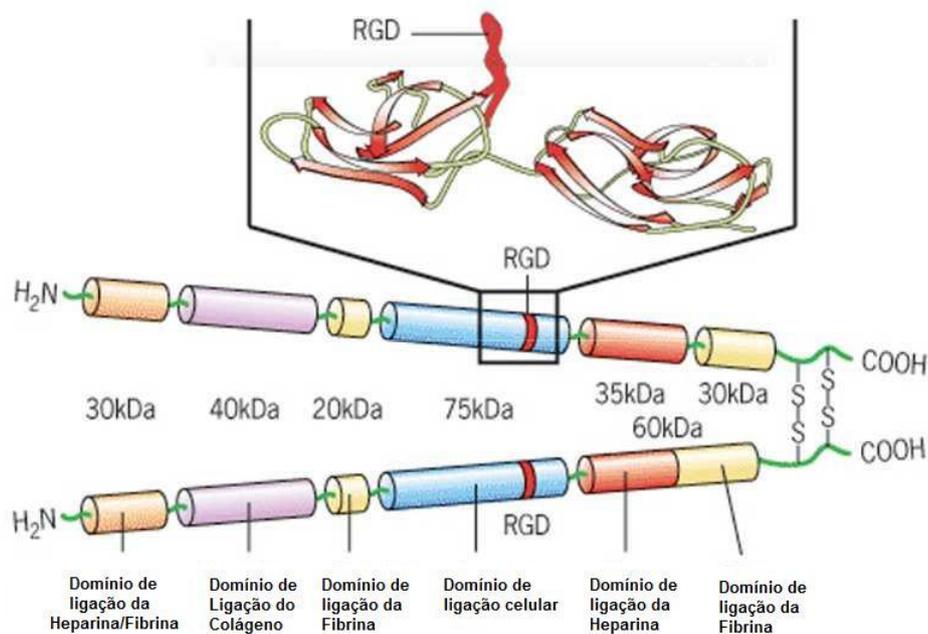


Figura 2.3. Estrutura da fibronectina plasmática e seus respectivos domínios de ligação (<http://www.farmacologiaoculare.com/2009/01/19/i-peptidi-rgd-per-la-modulazione-del-deflusso-di-umore-acqueo/>)

Mendonça *et. al.* (2009) estudaram a adsorção de Fn em arcabouços de PHB e observaram que a conformação dessa proteína sobre a superfície do material possui grande relevância para a bioatividade. A estrutura terciária da Fn está sujeita a variações de acordo com o ambiente a qual ela é exposta. Quando a fibronectina se encontra estendida na superfície de um dado material ela expõe seus sítios de reconhecimento para integrinas. Essa exposição dos sítios de reconhecimento é de suma importância nos processos de ancoragem e adesão celular (RUOSLAHT, 1988). Em estudo realizado em 1999, García *et. al.* estudaram a adsorção da FN em diferentes superfícies, demonstrando que a conformação da proteína aderida a substratos pode ser

modificada para regular sua interação com os receptores presentes na superfície celular, as integrinas.

A conformação da Fn aderida à superfície de um biomaterial dependerá, principalmente, da composição química da superfície. Por exemplo, um material que apresente grande concentração de grupamentos hidroxila (OH) em seus terminais de cadeia, terá um caráter mais hidrofílico em relação àqueles que apresentam menos hidroxilas em seus terminais. A interação da proteína com um substrato que possui mais afinidade com a água será um fator determinante para sua conformação quando aderida (RICO *et. al.*, 2009)

O tipo de ligação entre a proteína e o substrato determina a conformação assumida pela Fn. Zhang *et al.* (2007) observaram que a fibronectina ligada covalentemente a uma superfície era forçada a desenovelar sobre ela, o que levava a exposição de aminoácidos negativos e a formação de uma nova camada para a adsorção de outras moléculas de proteína. Ou seja, a ligação covalente induz a formação de multicamadas de proteínas. Já a adsorção física da Fn à superfície se limita a formação de uma única camada proteica sobre o material.

2.4. Adesão e Proliferação Celular

Para que as células possam se desenvolver e se organizar, formando um tecido, é necessário que aconteçam interações dos receptores presentes na superfície destas células com diversas moléculas presentes na matriz extracelular. Essa interação entre as células e a matriz consiste no processo de adesão, que vai muito além do simples contato célula-matriz e engloba a ligação específica receptor-ligante, que irá disparar uma cascata de sinalização, levando à alterações morfofuncionais da célula (SILVA e

MENEZES, 2004; BERRIER e YAMADA, 2007). As células se aderem às proteínas de matriz (fibronectina, por exemplo) através das integrinas.

Integrinas, como dito anteriormente, são heterodímeros transmembrana. Se ligam ao citoesqueleto celular via talina e vinculina, configurando o processo chave para o início da formação de um novo tecido. As integrinas, quando aderidas a um substrato, podem se agregar formando uma placa na porção interna da membrana citoplasmática, na qual uma grande quantidade de filamentos do citoesqueleto estão ancorados. Esse processo é chamado de adesão focal. A partir dessa adesão, a integrina expõe, em sua porção intracelular, sítios de ligação específicos para sua interação com os filamentos de actina presentes no citoesqueleto. Esses filamentos sofrem rearranjos que permitem a célula mudar sua conformação em resposta ao ambiente externo (ALBERTS *et al.*, 2010b).

Após a adesão celular, começam os processos de migração, diferenciação e proliferação.

É desejável que os biomateriais utilizados como suporte celular apresentem similaridade físico-química com a matriz extracelular, a fim de auxiliar na diferenciação das células ou, até mesmo, para que ocorra uma maior interação do material com o organismo (SANTOS JR E WADA, 2007). Uma vez que o material possua características similares às aquelas apresentadas pela matriz extracelular, ao realizar uma cultura a célula passa a colonizar o arcabouço, que deve se manter íntegro por tempo suficiente para que ocorra a organização dessas células e deposição de matriz extracelular secretada por elas formando, então, um tecido íntegro.

2.5. Tecido ósseo

O tecido ósseo é uma variação de tecido conjuntivo, que tem por função a sustentação interna de vertebrados e regulação dos níveis de cálcio (Ca^+) no sangue. Suas células secretam proteínas e polissacarídeos, que se reúnem de forma organizada, formando a matriz extracelular (ALBERTS *et al.*, 2010b). Essa matriz é mineralizada, reforçada por sais de cálcio e composta, em sua maioria, por colágeno tipo I. Os outros constituintes da matriz extracelular óssea são proteoglicanas e proteínas não colagenosas. Duas formas de tecido ósseo são encontradas o tecido ósseo compacto (confere as propriedades mecânicas e protege o tecido como um todo) e o tecido ósseo esponjoso (funções metabólicas) (Figura 2.4). Quatro tipos celulares diferentes constituem esse tecido (MARKS JR E HERMEY, 2002):

1. Osteoblastos – Presentes na superfície óssea são responsáveis pela síntese da matriz extracelular. Quando em intensa atividade sintética, apresentam formato cuboide;
2. Osteoclastos – Também presentes na superfície óssea, são responsáveis pela reabsorção do tecido, atuando na renovação óssea;
3. Células mesenquimais – São células tronco precursoras dos osteoblastos;
4. Osteócitos – Osteoblastos maduros inseridos na matriz óssea mineralizada, são responsáveis pela manutenção da matriz extracelular.

O tecido ósseo é dinâmico e está sempre passando por processos de remodelação, em resposta aos esforços mecânicos e mudanças hormonais sofridos pelo organismo. Essa remodelação óssea exige um equilíbrio entre a reabsorção feita pelos osteoclastos e a síntese de matriz desempenhada pelos osteoblastos. Os osteócitos

possuem um papel fundamental na remodelação óssea, gerando sinais enviados a osteoblastos e osteoclastos presentes na superfície do osso por meio de um sistema de canalículos. Os osteoclastos reabsorvem matriz, criando poros no tecido conhecidos como Lacunas de Howship. Em seguida, os osteoclastos sofrem apoptose e, então, são enviados sinais de acoplamento aos osteoblastos para que sejam recrutados até a cavidade de reabsorção. Os osteoblastos começam a sintetizar matriz extracelular, que, por fim, se mineraliza (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

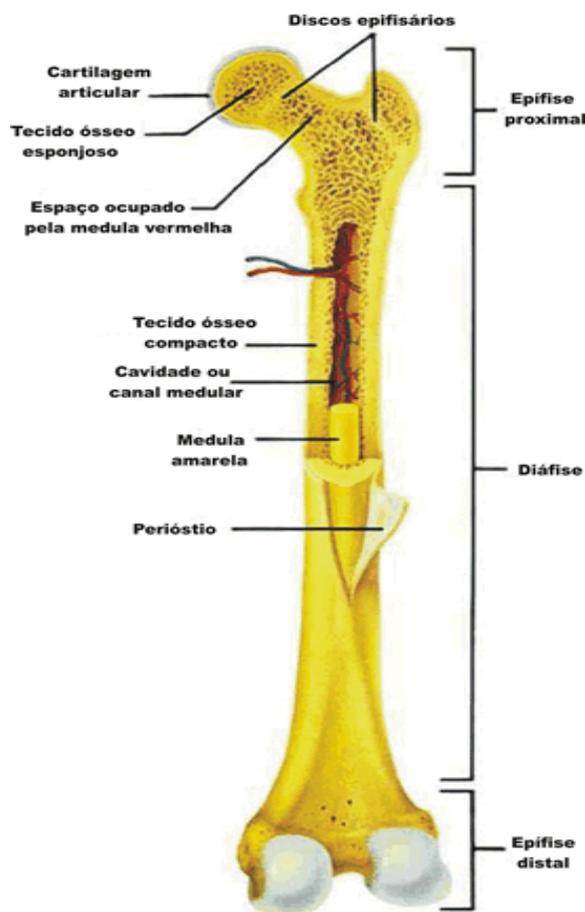


Figura 2.4. Estrutura básica do tecido ósseo

(http://materiasvestibulando.blogspot.com.br/2010_03_01_archive.html)

O processo de remodelação óssea é regulado por diversos hormônios e citocinas, tais como hormônios da paratireoide, vitamina D3, interleucina-1, fatores de crescimento (TGF- β), membros da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF- α), entre outros. Estudos recentes demonstram que os membros da superfamília do fator de necrose tumoral e seus receptores RANK, RANKL e Osteoprotegerina (OPG) desempenham um papel chave na ativação de osteoclastos. Enquanto RANKL é produzido por osteoblastos e células tronco presentes na medula óssea, o receptor RANK é produzido por células pré osteoclásticas e outras células dessa linhagem. A interação RANK/RANKL estimula a formação e diferenciação de osteoclastos. O fator OPG é produzido por osteoblastos e compete com o fator RANKL pela ligação no receptor RANK. A interação RANK/OPG inibe a diferenciação e proliferação dos osteoclastos e, conseqüentemente, impede a reabsorção óssea (VEGA *et. al.*, 2007; XIONG E O'BRIEN, 2012) (Figura 2.5).

A relação entre RANKL/OPG representa um papel determinante da remodelação óssea. O aumento de RANKL em relação à OPG é evidente em diversos casos de enfermidades do osso. Quando osteoblastos expressam grande quantidade de RANKL, ocorre perda óssea, destruição de articulações e outras doenças associadas à diminuição da densidade mineral do tecido. A expressão exacerbada de RANKL também está associada a casos de metástase em pacientes com câncer ósseo (YUAN *et al.*, 2008).

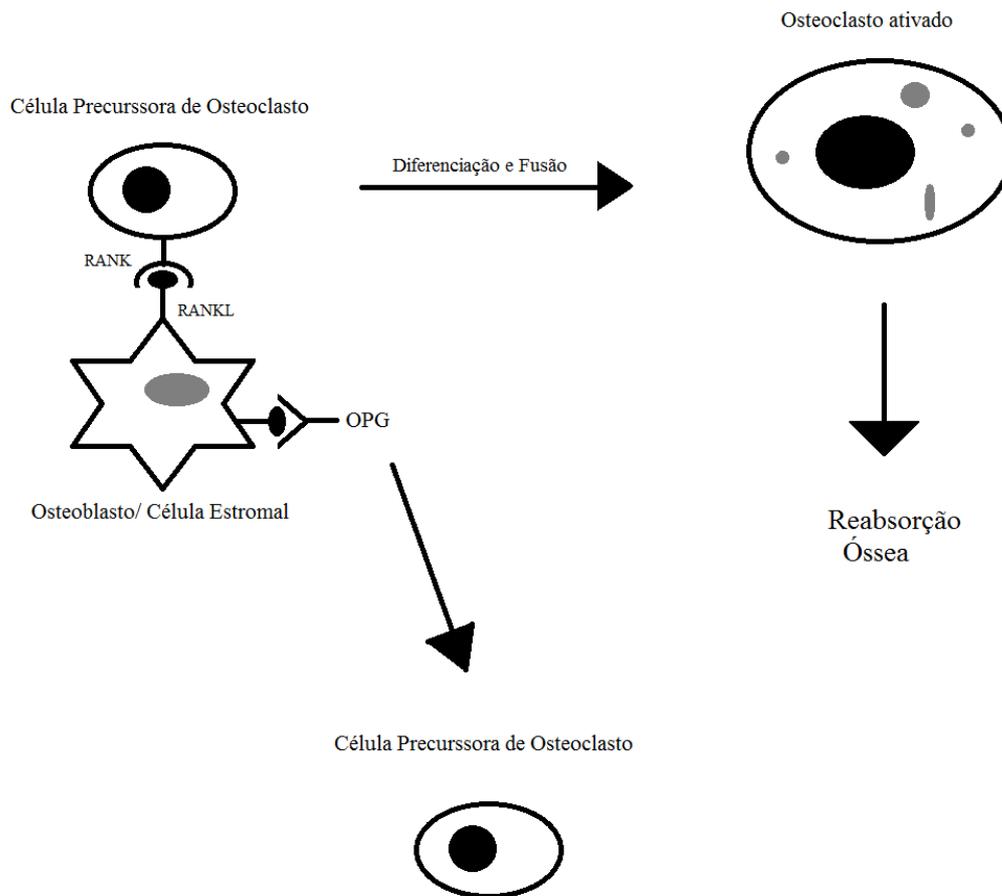


Figura 2.5. Esquema da ativação do processo de reabsorção óssea mediado pela ligação de RANK/RANKL/OPG

A angiogênese também tem papel fundamental na osteogênese, sendo executada pelas células osteoprogenitoras presentes no canal medular dos ossos. Qualquer alteração na formação dos vasos sanguíneos pode levar ao aparecimentos de patologias ósseas, tais como osteonecrose, osteomielite ou osteoporose (RUPANI *et. al.*, 2012).

Na maioria das lesões ósseas, a cura acontece sem a necessidade de procedimentos mais elaborados. Porém, em grandes lesões ocasionadas por traumas,

tumores, infecções, distúrbios bioquímicos ou desenvolvimento anormal do esqueleto existe a necessidade de intervenções cirúrgicas visando à regeneração tecidual, fusão espinhal e o aumento da consolidação da fratura. Para o tratamento dessas lesões são utilizados enxerto ósseo autólogo, enxerto ósseo alógeno, enxerto ósseo heterólogo e, também, matriz óssea desmineralizada, bem como metais, cerâmicos e polímeros, os chamados biomateriais (MEIJER *et al.*, 2007).

Atualmente, os procedimentos mais utilizados na regeneração desse tecido são os enxertos com osso autólogo, na qual pequenas peças ósseas são retiradas do próprio paciente em locais de fácil acesso. A preferência por essa técnica se dá pela menor possibilidade de rejeição imune, uma vez que ele está recebendo seu próprio tecido (KENESER *et al.*, 2006). Além disso, o material enxertado fornece à região lesionada células formadoras de osso e recruta células mesenquimais, que são induzidas a diferenciação em células osteogênicas graças à produção de fatores de crescimento osteoindutores (CHEN *et al.*, 2003). Embora apresente muitas vantagens, o emprego do enxerto autólogo ainda traz riscos ao paciente, tais como hipersensibilidade, dor excessiva no local em que o enxerto foi coletado e infecção, além da restrição na quantidade de tecido que pode ser retirado (MEIJER *et al.*, 2007). Devido a essa restrição, ao risco de sequelas, a possibilidade de reabsorção do osso transplantado, juntamente com o fato dos outros tipos de enxerto não serem tão seguros ao receptor, cada vez mais esforços vêm sendo concentrados na busca de novas terapias para a regeneração do tecido ósseo (BURGA *et al.*, 2000).

A combinação de biomateriais com técnicas de terapia celular vem sendo cada vez mais estudada. O uso de células adultas, tais como células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e osteoblastos primários, associadas a matrizes desenvolvidas a partir de biomateriais demonstrou grande potencial regenerativo em

modelos animais (Stevens, 2008). Ao utilizar um biomaterial na engenharia de tecido ósseo, é importante que ele permita rápido acesso e migração das células osteoprogenitoras para o tecido lesionado, recrutando bioativadores, assim como no enxerto autólogo (SHIN *et. al.*, 2003; GUNATILLAKE E ADHIKARI, 2003).

O substituto ósseo ideal deve ser o mais próximo possível do material utilizado em enxertos autólogos. O transplante de osteoblastos autólogos cultivados em arcabouços porosos é uma das terapias empregadas (ISHAUG *et al.*, 1997). Para que um arcabouço seja utilizado na regeneração de tecido ósseo, ele deve possuir as seguintes características:

- a) Biocompatibilidade;
- b) Boa condutividade para adesão e proliferação das células ósseas e deposição de sua matriz;
- c) Capacidade de incorporar fatores de indução para conduzir e favorecer o crescimento do tecido;
- d) Favorecer a vascularização do tecido, para que ocorra a oxigenação do mesmo;
- e) Possuir características mecânicas que possibilitem suportar carga no local de implante;
- f) Deve ter taxa de degradação controlada, previsível e reprodutível, e os produtos da degradação não devem ser tóxicos para as células;
- g) Deve ser de facilmente processado e possuir custo- benefício que lhe permita ser moldado em arcabouços tridimensionais que preencham o local lesionado (SCHELLER *et. al.*, 2009).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Materiais utilizados

Materiais	Fabricante
Poli (3-hidroxibuturato) – lote 150	PHB Industrial S/A
Clorofórmio P.A.	Vetec Química Fina Ltda.
Tri-etil Citrato	Sigma Aldrich
Sacarose – grau alimentício	Cia União
Micropérolas de Hidróxido de Sódio (NaOH) P.A.	Vetec Química Fina Ltda.
1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) P.A.	Sigma Aldrich
N-hidroxisuccinimida (NHS) – grau de pureza 98%	Sigma Aldrich
Fibronectina de Plasma Humano – grau de pureza $\geq 98\%$	Sigma Aldrich
Tampão MES – grau de pureza 99%	Sigma Aldrich
Meio de cultivo Dulbecco MEM (D-MEM)	Cultilab
Soro Fetal Bovino	Sigma Aldrich

3.2. Produção dos arcabouços

3.2.1. Solução de PHB

A solução de PHB foi preparada em balões volumétricos acoplados a um sistema de refluxo. O polímero, com tamanho de grão entre 250 e 500 μ m foi solubilizado em clorofórmio, a fim de obter uma solução final com concentração de 15% (p/v). O procedimento foi anteriormente desenvolvido por Mendonça (2008).

O preparo da solução consistiu em duas etapas. A primeira, conhecida como inchamento, consistiu na agitação magnética e constante do PHB em clorofórmio, por duas horas, a temperatura ambiente. Já a segunda etapa, solubilização, consiste no aquecimento a 65°C do sistema, ainda sob agitação magnética constante, por um período de duas horas. Após esse período, foi adicionado à solução o plastificante tri-etil citrato, na concentração 10% (v/v) e a solução foi agitada com um bastão de vidro, por cerca de 5 minutos.

3.2.3. Faixa granulométrica do agente porogênico

Neste trabalho, foi utilizada a sacarose como agente formador de poros. Para tal, os grãos foram peneirados utilizando um sistema de peneiras com abertura de 250 μ m, ou seja, foram selecionados os grãos com tamanho igual ou menor do que 250 μ m. Essa granulometria foi escolhida uma vez que estudos anteriores demonstram que o estímulo à osteogênese acontece em materiais com porosidade entre 150 μ m - 200 μ m (CHOI *et. al.*, 2010).

A sacarose, na proporção de 75% (p/p), foi adicionada à solução de PHB e, então, a mistura foi homogeneizada com bastão de vidro até a completa incorporação da sacarose à solução. Essa mistura foi vertida em moldes de vidro, os quais foram mantidos em ambiente refrigerado (20°C) até a completa evaporação do solvente.

3.2.4. Produção de poros pelo processo de lixiviação de sacarose

Após a evaporação do solvente, os arcabouços passaram pelo processo de lixiviação, que consiste na remoção do particulado do interior das amostras por meio da solubilização do agente porogênico em água destilada. As amostras foram imersas em beakers contendo água destilada. Esse conjunto foi mantido sob agitação magnética constante com a água sendo trocada a cada 12 horas, para evitar a saturação com sacarose.

A lixiviação foi conduzida em duas etapas. Na primeira, placas de PHB foram lixiviadas por 48 horas. As placas foram mantidas a temperatura ambiente até que estivessem secas. Posteriormente, foram cortadas em formato cilíndrico (cerca de 9,5 mm de diâmetro) com auxílio de um molde metálico e foram lixiviadas por mais 48 horas.

3.2.5. Hidrólise com solução de NaOH

A hidrólise das superfícies dos arcabouços poliméricos foi realizada seguindo a metodologia descrita por THIRÉ *et al.*, (2007). Esse processo visou a incorporação de grupamentos oxigenados (grupos carboxílicos e hidroxilas) na superfície dos arcabouços por meio da quebra de ligações ésteres das cadeias do polímero.

Os arcabouços de PHB foram incubados em solução de NaOH 1 M. O conjunto foi aquecido a 65°C por 45 minutos. Após o aquecimento, os arcabouços foram imersos em água destilada à temperatura ambiente, sob agitação constante. Essa água foi trocada até que o pH da água residual estivesse próximo a 7,0.

3.3. Caracterização físico-química dos arcabouços

3.3.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi conduzida a fim de avaliar a saída do agente porogênico do interior das amostras que passaram pelo processo de lixiviação.

O estudo de degradação térmica foi realizado em analisador termogravimétrico Perkin-Elmer (modelo Pyris 1 TGA), disponível no Laboratório do Departamento de Engenharia Química (EQ/UFRJ). Aproximadamente 4 mg de cada amostra foram aquecidos a velocidade de 10 °C/min., sob atmosfera de nitrogênio, na temperatura ambiente até 400 °C. Foram obtidas curvas de TGA e de sua derivada, DTG.

3.3.2. Caracterização morfológica dos arcabouços por Microtomografia

A microtomografia computadorizada é uma técnica não destrutiva que visa reconstruir e modelar a parte interna de amostras, na escala micrométrica. Por meio desta técnica é possível determinar a geometria tridimensional e propriedades do material a ser analisado.

Essa técnica se baseia na interação da radiação com a matéria. Cada material absorve diferentes quantidades de radiações, que acabam por ter sua intensidade diminuída. Os principais tipos de interação da radiação com a matéria são efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares. Quanto mais espesso for o material analisado, menor será a energia de radiação liberada no meio após atravessar a amostra. Quanto maior for a energia dos fótons de radiação incidentes, maior será a capacidade de penetração na amostra, aumentando, também, a possibilidade de ocorrerem interações devido a maior distância percorrida pela radiação (HANCOCK E MULLARNEY, 2005).

As imagens de microtomografia são obtidas a partir de projeções de raios X sobre as amostras, coletados por um detector que fica posicionado em oposição a fonte de raios X. Ao obter-se o conjunto de projeções do sistema, as imagens são reconstruídas através de equações matemáticas para obtenção de fatias transversais da amostra. Após ser reconstruída, cada fatia transversal da amostra é exibida em forma de matriz digital $N \times M$ pixels, onde N representa o número de pixels presentes na vertical e M os da horizontal. As fatias são calculadas a certa distância uma das outras, que no caso desse microtomógrafo é exatamente igual ao tamanho do pixel. Pixel é a representação básica de um elemento bidimensional de uma imagem digital. Para cada valor do pixel designa-se um valor de cinza que é proporcional aos coeficientes de

absorção do detector. Ou seja, a região mais densa aparece mais escura e a menos densa, mais clara. Como a maioria dos monitores apresenta 256 níveis de cinza com um byte, a escala é montada com 0 para o preto e 255 para o branco e os valores que são intermediários a estes equivalem aos níveis de cinza propriamente dito.

Neste trabalho, as análises de microtomografia dos arcabouços de PHB antes e depois da hidrólise foram obtidas a partir do sistema radiográfico de raio-X Microfocus Feinfocus, modelo FXS 160.50, do Laboratório de Instrumentação Nuclear (PEQ/COPPE/UFRJ).

3.3.3. Análise morfológica dos arcabouços por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de informações químicas e estruturais, na faixa micrométrica ou submicrométrica, de diversas amostras. Nela, um feixe fino de elétrons incide sobre a superfície do material, produzindo uma série de sinais que são captados por detectores e são ampliados e processados em um sistema analisador específico. A imagem de MEV é formada ponto a ponto.

Os sinais, produzidos pela emissão do feixe de elétrons, podem ser secundários, retroespalhados, absorvidos, difratados, entre outros. Quando produzidos por elétrons secundários, os sinais mostram o relevo da superfície da amostra, graças ao contraste entre picos (brilhantes) e vales (escuros). Já os sinais retroespalhados mostram a heterogeneidade da composição química da amostra de acordo com a diferença do número atômico dos elementos presentes. Os elementos de maior número atômico serão

mais brilhantes. Devido a esses contrastes somados a profundidade do foco alcançado pelo MEV, as imagens aparentam estar em planos tridimensionais (GOLDSTEIN *et al.*, 2003).

O equipamento utilizado nesse trabalho para obtenção das imagens foi o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM, modelo 6460 LV, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (PEMM/COPPE/UFRJ). Todas as amostras foram, previamente, recobertas com ouro e observadas a 15 kV. Foram feitas imagens da superfície e da seção transversal do material.

3.3.4. Determinação da porosidade aparente dos arcabouços

Para medir a densidade dos arcabouços, foi realizada a imersão destes em etanol, seguindo o princípio de Arquimedes, assumindo que todo corpo embebido em um fluido sofre, por parte do fluido, uma força vertical para cima, com intensidade igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo. Quando um corpo se encontra imerso em um líquido em repouso, duas forças estão atuando sobre ele: a força peso e a força de impulsão (CARVALHO, 1997).

Para determinar a medida de densidade, foi utilizada balança hidrostática do Laboratório de Polímeros (PEMM/COPPE/UFRJ), para a obtenção da massa real e da massa aparente dos suportes porosos de PHB. Estes valores foram aplicados à Equação 1, adotando a densidade do etanol como 0,79g/cm³.

$$Densidade = \frac{W_{seco} \times \rho_{etanol}}{(W_{seco} - W_{molhado})} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde W_{seco} é a massa referente ao arcabouço seco, $W_{molhado}$ é a massa referente ao arcabouço imerso em etanol e ρ_{etanol} é a densidade do etanol a temperatura de execução do experimento.

A partir das dimensões das amostras, foi possível medir o volume real dos arcabouços porosos (V_{real}) através da Equação 2:

$$V_{real} = \frac{\pi d^2}{4} \quad (\text{Equação 2})$$

A porosidade de um arcabouço é dada pela relação entre seu volume real e o volume de vazios (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Para medir o volume dos poros (V_{poros}), utilizou-se a equação 3:

$$V_{poros} = V_{real} \times \frac{W_{seco}}{\text{densidade}} \quad (\text{Equação 3})$$

A porosidade aparente foi determinada de acordo com a equação 4:

$$\text{Porosidade} = \left(\frac{V_{poros}}{V} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

3.4. Avaliação das propriedades mecânicas dos arcabouços pós-hidrólise

Avaliar as propriedades mecânicas do arcabouços poroso é de suma importância para sua utilização na engenharia tecidual . É necessário verificar se o material terá propriedades mecânicas semelhantes àquelas apresentadas pelo tecido ósseo. Nesse trabalho, arcabouços PHB (com diâmetro médio de 9,5 mm e altura média de 4,2 mm) foram submetidos a ensaio de compressão. Cada corpo de prova foi devidamente

posicionado em uma máquina universal de ensaios Instron 5567, no Laboratório de Polímeros (PEMM/COPPE/UFRJ) com uma célula de carga de 10KN e velocidade do travessão igual 1,3mm/min. Os dados de deformação da amostra em função da carga aplicada foram coletados e tratados para a obtenção do módulo de compressão.

3.5. Ativação da superfície

A proteína FN, ao ser incorporada à superfície dos arcabouços de PHB, irá proporcionar a interação célula-biomaterial. Estudo realizado por Meiga (2011) demonstrou que a hidrólise da superfície do material leva a um aumento na rugosidade da superfície, acarretando o efeito de superhidrofilicidade e a imobilização mais expressiva de FN.

3.5.1. Incorporação do agente de acoplamento

O agente de acoplamento objetiva criar sítios na superfície do arcabouço que permitam a imobilização covalente da fibronectina. Para tal, foi feita a solubilização da 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) junto ao N-hidroxisuccinimida (NHS) em tampão MES pH 4,75. A 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida é uma carbodiimida solúvel em meio aquoso, amplamente utilizada para mediar modificações em grupamentos carboxílicos, apresentando sua maior reatividade em pH 4,75 (LUNDBLAD, 2004). A incorporação do agente de acoplamento foi feita pela incubação dos arcabouços porosos modificados com solução de NaOH em tampão MES

0,1 M, ajustada com NaOH 1 M, afim de obter o pH ideal para a reação, contendo a carbodiimida EDC e o NHS solubilizados. A reação é mantida por 4h à temperatura ambiente, seguida de lavagem com água destilada corrente (MEIGA, 2010).

3.5.2. Imobilização de Fibronectina

A solução estoque de FN humana foi diluída até a concentração final de 10 µg/ml, em pH 4,5. O valor do pH foi estabelecido devido a estudos anteriores (SILVA e MENEZES, 2004) que mostraram que a proteína, nesse pH, expõe os sítios de ligação com integrinas, induzindo maior interação entre células ósseas (nesse caso, osteoblastos) e a fibronectina.

Os arcabouços (ativados ou não com o agente de acoplamento) foram incubados na solução de fibronectina, por 4 horas. Após esse período, os arcabouços foram lavados em água destilada corrente para que as proteínas que não estivessem fortemente ligadas à superfície fossem removidas. Dessa forma, foram obtidos os arcabouços utilizados para esse trabalho: PHB-FN (arcabouço com Fn adsorvida fisicamente) e PHB-EDC-FN (arcabouço com Fn ligada covalentemente), além do controle PHB pós hidrólise.

3.6. Caracterização dos arcabouços de PHB modificados

3.6.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho permite estudar a interação da radiação eletromagnética com a matéria, através das frequências vibracionais da energia de átomos ou moléculas. É baseada no fato de cada ligação química possuir uma frequência de vibração específica, que corresponde a níveis de energia na molécula. Graças a isso, essa técnica mapeia as diferentes ligações químicas existentes em uma molécula, ajudando a identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Essas frequências de vibração são dependentes da forma da energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e, eventualmente, do acoplamento vibrônico.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma variante da espectroscopia convencional, na qual é feita uma análise mais rápida dos espectros de infravermelho, utilizando um interferômetro. Nessa técnica, um raio de luz infravermelho passa por uma amostra sólida, produzindo um sinal que é, então, medido pelo interferômetro. Cada sinal recebido é filtrado, para que seja produzido um valor analítico. O resultado final é obtido na forma de gráfico comprimento de onda x transmitância em %.

O FTIR, bem como a espectroscopia de infravermelho convencional, nos permite avaliar os grupamentos químicos de uma amostra, em suas camadas mais superficiais. O quão profunda será a análise dependerá do índice de refração do cristal, da amostra e do ângulo de radiação incidente.

As análises de FTIR foram feitas nos arcabouços com fibronectina adsorvida e ligada covalentemente a superfície a fim de avaliar alterações decorrentes da modificação com proteína e, também, estimar a conformação assumida pela proteína através dos grupamentos expostos. As amostras foram analisadas em espectrômetro

Perkin-Elmer, modelo 1720X - Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LMCM) do PEMM/COPPE/UFRJ). A análise foram conduzidas sob as seguintes condições operacionais:

- resolução do equipamento: 4 cm^{-1} ;
- número de varreduras: 20;
- faixa de número de onda: $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$.

3.6.2 Estimativa de cargas sobre os arcabouços por cristal violeta

As cargas dos arcabouços foram medidas, de forma indireta, pela adsorção do corante cristal violeta. Foi utilizada solução 0,5% de cristal violeta em tampão PBS pH 7,2 para a coloração dos arcabouços. Utilizou-se quantidade de solução suficiente para cobrir completamente os arcabouços. Após 5 minutos de imersão, o excesso de corante foi retirado, sobrando apenas os arcabouços corados. A diluição do corante adsorvido nos arcabouços foi realizada por banho de imersão em metanol e a absorbância da solução final lida a 595nm em Leitor de Microplacas Synergy 2 BioTek, pertencente à Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital Antônio Pedro/UFF.

3.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram obtidas pelo *software* Minitab 16. Foi utilizado o teste ANOVA e foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$

3.8. Estudo da interação arcabouço-osteoblastos

Para entender o comportamento de células ósseas aderidas na matriz polimérica, *in vitro*, foi feita cultura estática da linhagem de osteoblastos murino MC3T3, nos arcabouços. Foram avaliadas a adesão e proliferação celular no material, o comportamento fisiológico dessas células.

3.8.1. Cultura de células ósseas

A cultura de células nos arcabouços porosos de PHB foi realizada com osteoblastos de camundongo - linhagem MC3T3. Antes da incubação das células, o ar do interior das amostras foi retirado a vácuo, com o auxílio de uma seringa estéril e, então, estas foram imersas em meio de cultura por 24h, visando a estabilização do material. A densidade celular depositada sobre as amostras foi de $1,5 \times 10^5$ células. As análises foram conduzidas com tempo mínimo de cultivo celular de 2 dias e tempo máximo de 21 dias, em quadruplicata. Durante o cultivo, as amostras foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Ao longo da cultura, foi realizada a troca do meio de cultivo a cada 2 dias, evitando que os nutrientes necessários para a sobrevivência celular se esgotassem.

3.8.2. Análise de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade dos arcabouços foi feita utilizando o teste Vermelho Neutro. Esse ensaio é baseado na capacidade das células viáveis incorporarem e agirem com o vermelho neutro, que penetra a membrana celular e se acumula nos lisossomos. Ou seja, o teste avalia a sobrevivência/viabilidade das células em cultura.

Para a produção dos extratos, os materiais foram incubados em meio de cultura sem soro por 24 horas, em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Os extratos foram recolhidos e incubados em cultura de MC3T3, previamente estabelecida em placa de 96 poços, por mais 24 horas, em estufa a 37 °C (5% CO₂).

O teste foi conduzido seguindo o protocolo indicado pelo fabricante do conjunto In Cytotox – XTT – NR – CVDE, da empresa XENOMETRIX. Após o período de incubação, as células foram fixadas, o corante presente no seu citoplasma foi liberado por ação da solução de solubilização para o sobrenadante e a absorbância foi lida a 540 nm, no Leitor de Microplacas Synergy 2 BioTek.

3.8.3. Dosagem de proteínas totais, fosfatase alcalina e íons cálcio

Visando estimar, qualitativamente, a quantidade de células ativas sobre o material, foi feita a dosagem de proteínas no sobrenadante pelo método colorimétrico de Bradford, que baseia-se na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (ZAIA *et. al.*, 1998).

A fosfatase alcalina é uma enzima localizada na superfície celular, onde se encontra na forma de um tetrâmero. Quando liberada no ambiente circundante, sofre

ação de enzimas conhecidas como fosfolipases C e D e passa a se apresentar na forma de dímeros. A isoforma óssea da fosfatase alcalina é uma glicoproteína tetramérica que se encontra na superfície dos osteoblastos (VIEIRA, 1999). A função da fosfatase alcalina ainda não foi completamente desvendada, porém, o seu papel como marcador de atividade osteogênica vem sendo cada vez mais reforçado (WHYTE, 1994; GOLUB e BOESZE-BATTAGLIA, 2007). Ao medir a quantidade de fosfatase alcalina presente no sobrenadante de culturas de osteoblastos, é possível avaliar o metabolismo das células ósseas e, principalmente, verificar se elas estão ativas.

Outro marcador de atividade osteoblástica é o fosfato de cálcio, que tem participação direta na mineralização da matriz óssea. Os osteoblastos concentram grande quantidade dessa molécula quando em atividade.

Para as dosagens, foram utilizados os sobrenadantes recolhidos de cultura celular, nos tempos 2 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias.

Para a dosagem de proteínas, foi utilizado utilizando o reagente “Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay”, Thermo Scientific. Como padrão de proteínas, foi utilizado BSA (bovine serum albumin), também da Thermo Scientific, na concentração 1 mg/ml. Como branco, foi utilizado meio de cultura D-MEM. Para a leitura, 10 µL de cada amostra, incluindo os controles, foram adicionados em poços de placa de 96 poços. Foram adicionados 200 µL do reagente de Bradford nos poços contendo os controles e os sobrenadantes da cultura celular. A placa foi agitada por 30 segundos e, em seguida, foi deixada incubando por cerca de 10 minutos. Após esse período, a leitura foi feita em leitor de microplacas Synergy 2 Bio Tek, na Unidade de Pesquisa Clínica (HUAP/UFF) utilizando o comprimento de onda 595 nm, conforme instruções do fabricante. A

dosagem de proteínas totais permitiu a normalização da dosagem da atividade da enzima fosfatase alcalina.

Para a dosagem da fosfatase alcalina, foi utilizado o conjunto Fosfatase Alcalina Liquiform (Labtest). Para dosar o íon cálcio foi utilizado o conjunto Cálcio Liquiform (Labtest). Os sobrenadantes foram adicionados em placas de 96 poços e, em seguida, foram seguidos os passos indicados pelo fabricante dos conjuntos de testes. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Synergy 2 BioTek, na Unidade de Pesquisa Clínica (HUAP/UFF), no comprimento de onda 405 nm.

3.8.4. Morfologia Celular e Micro-análise elementar da superfície dos arcabouços

Para avaliar a morfologia das células aderidas ao material ao final da cultura de 21 dias, foi realizada microscopia eletrônica de varredura. Após cultura, as amostras foram fixadas com solução Karnovsky – 4% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído em tampão Cacodilato 0,1M – pós-fixadas com tetróxido de ósmio e passaram por processo de desidratação com imersão em álcool, com diferentes concentrações (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Após esse processo, foi feito o ponto crítico das amostras (Laboratório de Cultura de Células/ Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas) seguido da metalização com ouro, realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica (PEMM/COPPE/UFRJ). As amostras para a microanálise não passaram pela pós-fixação e nem pelo processo de metalização com ouro.

O equipamento utilizado para obtenção das imagens foi o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM, modelo 6460 LV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica (PEMM/COPPE/UFRJ). Todas as amostras foram, previamente, recobertas com ouro e observadas a 15 kV. Foram feitas imagens da superfície do material, bem como imagens da seção transversal.

As imagens obtidas foram fotografadas e, então, seguiu-se a avaliação da morfologia celular em cada grupo de amostras. Observou-se a adesão, espreadimento, presença de prolongamento membranar/citoplasmático e possível deposição de matriz extracelular. Ainda no microscópio JEOL, modelo JSM 6460 LV, com sistema de energia dispersiva em espectroscopia de raios-X (EDS) acoplado, foi conduzida a análise elementar da superfície dos arcabouços após 21 dias de cultura.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Produção e caracterização físico-química dos arcabouços

Os arcabouços porosos de PHB foram produzidos pela técnica de lixiviação de particulado, utilizando sacarose como agente porogênico. A concentração da solução utilizada foi previamente estabelecida em 15% (p/v). A Figura 4.1 mostra a imagem de um arcabouço de PHB confeccionado neste trabalho.

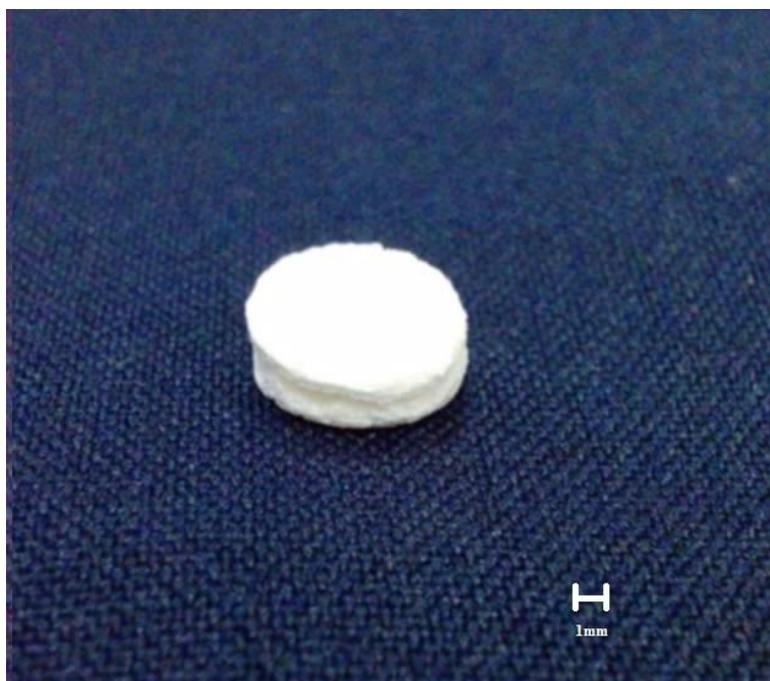


Figura 4.1. Arcabouço de PHB produzido pela técnica de lixiviação de particulado.

Os arcabouços produzidos apresentaram um diâmetro médio de $9,5 \pm 0,15$ mm e altura média de $4,2 \pm 0,3$ mm.

Ao utilizar a sacarose como agente porogênico, foi possível produzir arcabouços mais altos em relação aos arcabouços produzidos com cloreto de sódio (NaCl), desenvolvidos por Meiga (2010). Essa diferença na altura é fundamental para que o arcabouço venha a ser utilizado em cultura dinâmica, uma vez que os biorreatores necessitam que o material testado tenha um tamanho que permita sua fixação em suportes.

4.1.1. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada com a finalidade de avaliar a saída da sacarose do interior dos arcabouços. Foram analisados arcabouços de PHB antes do processo de lixiviação e arcabouços lixiviados por 96 h (Figura 4.2).

A curva de degradação do arcabouço antes do processo de lixiviação apresentou três picos e resíduo superior a 10%. O primeiro pico ocorre por volta de 180 °C e pode ser relacionado à presença água de cristalização. Os outros dois picos ocorrem a $242,16$ °C e a $302,5$ °C (Figura 4.2a).

A degradação térmica do PHB ocorre em uma única etapa e está associada a formação de um composto intermediário, contendo um anel de seis átomos de carbono. A literatura cita a temperatura de degradação do PHB entre 282 °C e 303 °C (Dong, Yu, & Cheung, 2001). Sendo assim, o terceiro pico apresentado na curva de DTG (Figura 4.2a), pode ser relacionado ao PHB.

Já a curva referente a amostra lixiviada apresentou apenas um pico de degradação, ocorrendo em torno de 266°C com resíduo de 0,39%, comprovando a saída da sacarose e a eficiência do processo de lixiviação (Figura 4.2b). Observa-se uma redução significativa na temperatura de degradação do polímero no arcabouço lixiviado em relação ao arcabouço anterior a lixiviação. Uma vez que a sacarose foi retirada na lixiviação, criou-se uma estrutura repleta de espaços vazios, o que pode ter contribuído para a entrada de calor na amostra e, conseqüentemente, foi necessário menos energia para a decomposição do PHB.

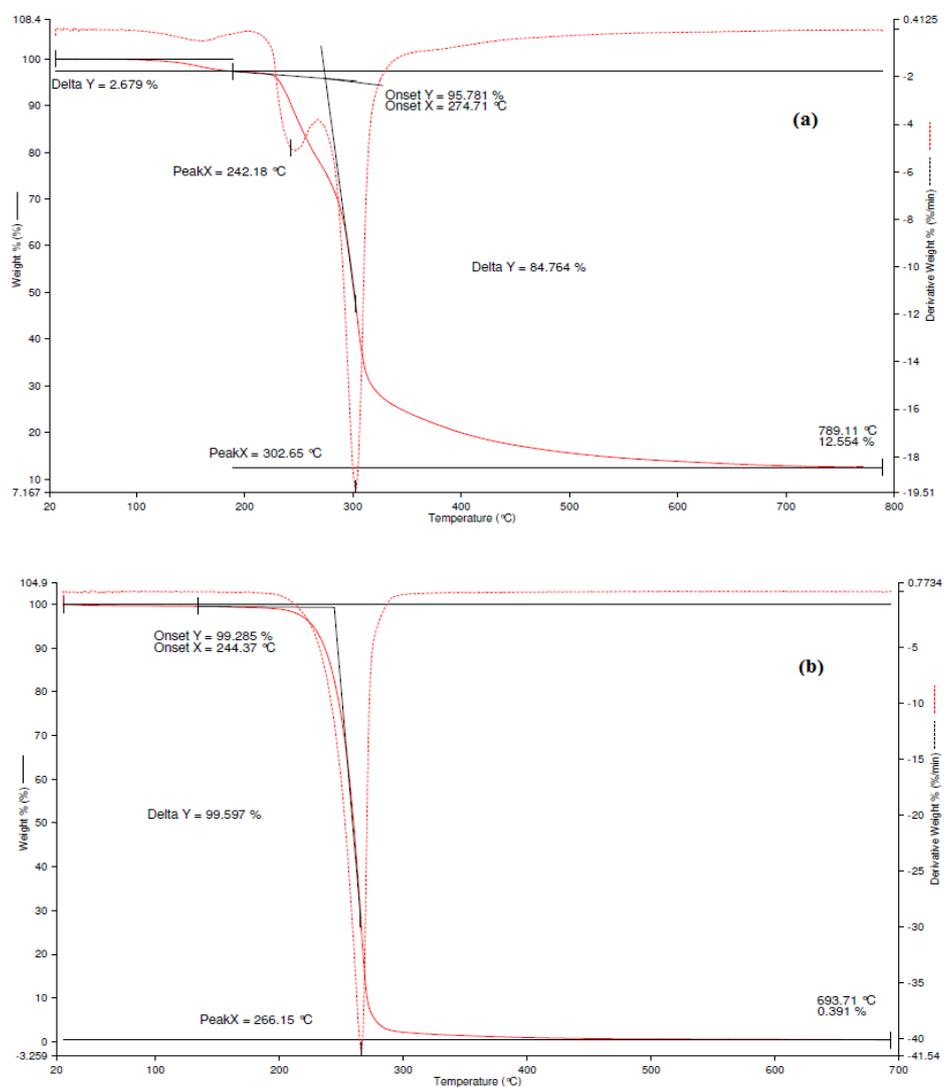


Figura 4.2. Análise termogravimétrica de (a) arcabouço antes do processo de lixiviação e de (b) arcabouço lixiviado.

4.1.2. Análise morfológica dos arcaçouços

As análises de microtomografia foram conduzidas a fim de avaliar a morfologia, obter a porosidade, bem como a distribuição média dos poros nas amostras não hidrolisada e hidrolisada.

Na Figura 4.3, podem ser observadas a estrutura da matriz polimérica e da fração porosa de arcaçouços de PHB antes da hidrólise.

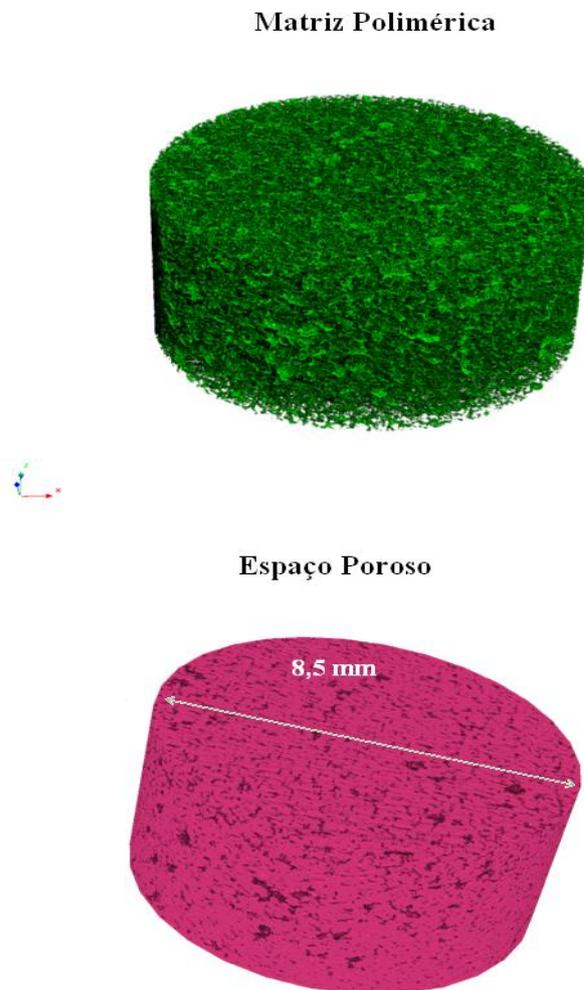


Figura 4.3. Imagens de microtomografia de arcaçouços de PHB antes da hidrólise

Já na Figura 4.4, podem ser observadas a estrutura da matriz polimérica e a estrutura da fração porosa de arcabouços de PHB após hidrólise.

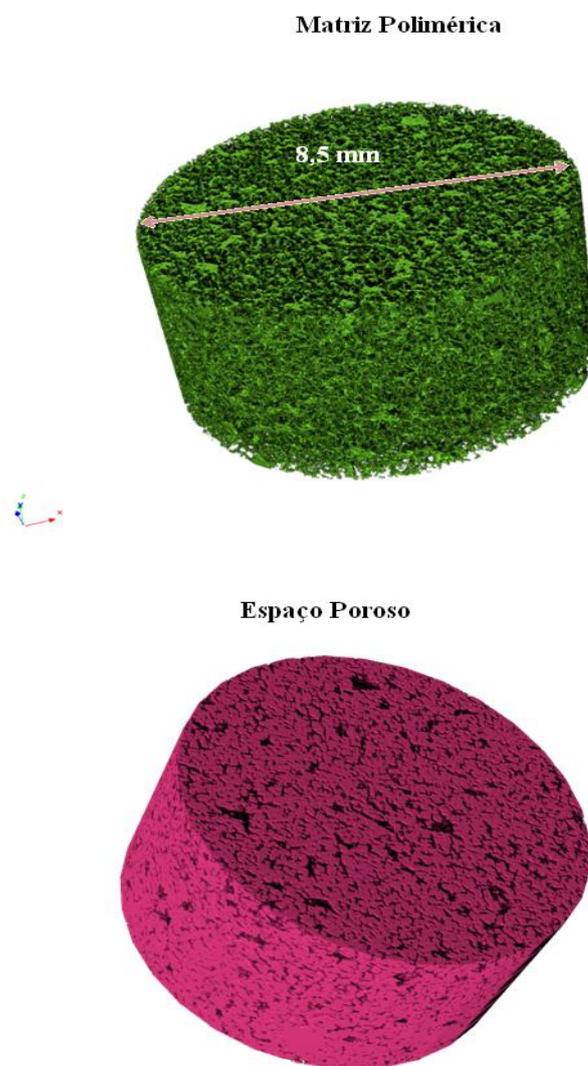


Figura 4.4. Imagens de microtomografia de arcabouços de PHB hidrolisados

Ao verificar a distribuição do tamanho dos poros do arcabouço de PHB antes da hidrólise, foi possível observar que estes se encontram em uma faixa de até 110 μm , com maior incidência de poros até 60 μm (Figura 4.5).

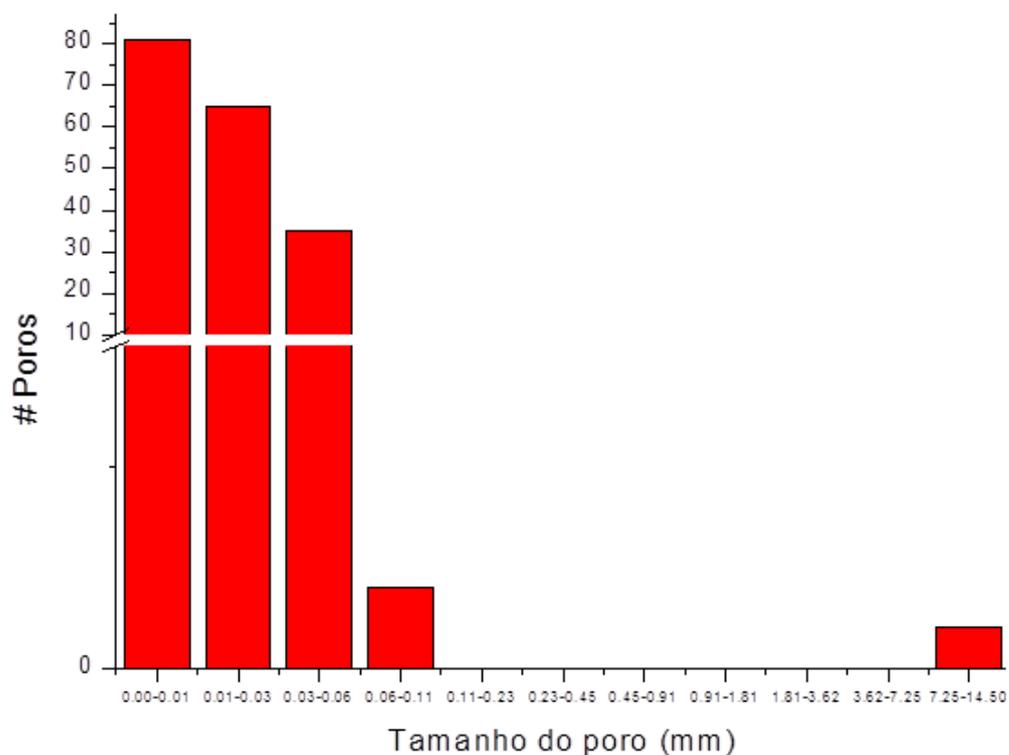


Figura 4.5. Gráfico da distribuição de poros em arcabouço de PHB não hidrolisados

Já no arcabouço de PHB hidrolisado (Figura 4.6), a incidência de poros na faixa até 10 μm foi superior àquela apresentada pelo arcabouço antes da hidrólise. Nesse material, também foi possível verificar que a distribuição de poros ocorre em uma faixa de até 110 μm , com a presença de alguns macroporos maiores que 500 μm .

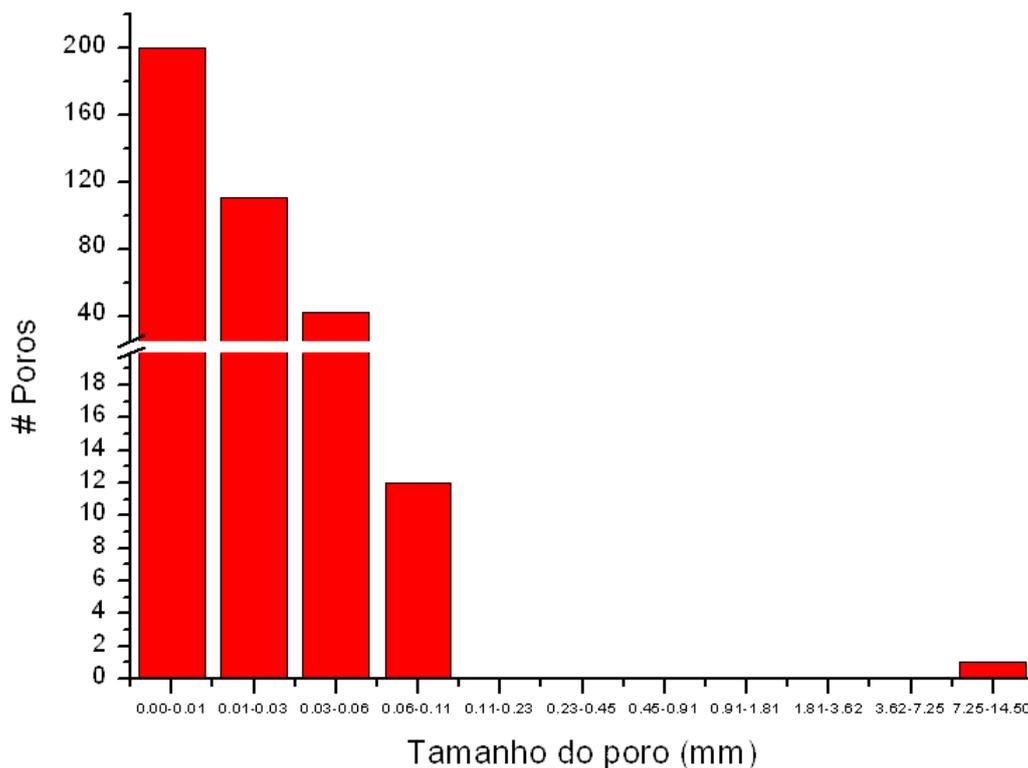


Figura 4.6. Gráfico da distribuição de poros em arcabouço de PHB não hidrolisados

Ao realizar uma comparação entre a distribuição média de poros nos arcabouços antes e após hidrólise, foi possível observar que o último apresenta maior contagem de poros em ambas as faixas de tamanho. Além disso, a representação tridimensional de ambos os grupos permite observar que a superfície hidrolisada possui mais reentrâncias do que a superfície do arcabouço não hidrolisado.

A arquitetura dos arcabouços desempenha um papel importante na formação do tecido ósseo. Os microporos (poros $<20\ \mu\text{m}$) tendem a aumentar o crescimento ósseo nos arcabouços, uma vez que há aumento na área superficial e, conseqüentemente, há maior área para adsorção de proteínas. Além disso, há aumento na solubilidade iônica no microambiente e mais pontos de fixação para os osteoblastos (WOODARD *et.al.*, 2007)

Os estudos de Karageorgiou e Kaplan (2005) contém um conjunto de informações sobre o efeito da porosidade e do tamanho dos poros em arcabouços para

cultura *in vitro* e *in vivo*. Os macroporos (poros >100 μm) favorecem diretamente a osteogênese em organismos vivos, uma vez que facilitam a vascularização do tecido e, conseqüentemente, permite maior aporte de nutrientes e oxigenação para as células.

Neste trabalho, a hidrólise dos arcabouços teve por objetivo incorporar grupamentos carboxílicos à cadeia do PHB pela quebra de ligações éster. A incorporação desses grupamentos visa criar pontos ativos na cadeia do polímero, que são passíveis de imobilização com Fn. A hidrólise não apenas altera a carga superficial por incorporação de grupamentos oxigenados, como também altera a topografia do material, pela quebra de cadeias.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível avaliar a morfologia da superfície dos arcabouços de PHB (hidrolisados) produzidos em moldes de vidro (Figura 4.9). Para obter superfícies de fratura, os arcabouços foram imersos em nitrogênio líquido e, em seguida, foram fraturados com a ajuda de lâminas de bisturi.

Foram analisadas quatro superfícies. São elas: superfície de fratura vertical, superfície de secagem em contato com o ar, superfície de secagem em contato com o vidro e superfície lateral .

A superfície de secagem em contato com o molde de vidro mostrou-se completamente porosa (Figura 4.7a), fato que pode ser atribuído a grande presença de grãos de sacarose nessa região. A superfície em contato com o ar também apresentou boa quantidade de poros, devido a boa dispersão do agente porogênico na solução, porém, visualmente menor do que aquela apresentada pela outra superfície (Figura 4.7b). Essa diferença na porosidade pode ter ocorrido devido a decantação das partículas de sacarose, durante a evaporação do solvente.

A análise das micrografias de ambas as superfícies permitiu observar a presença de poros menores no interior de poros maiores (Figura 4.7c e d), fato que pode ser indicativo de interconexão entre os poros.

A interconexão é uma característica fundamental para o sucesso do estabelecimento de cultura celular sobre o material, uma vez que essa interconexão permite o crescimento e migração celular por toda a superfície do material, além de possibilitar o fluxo de nutrientes e a troca de gases entre o meio e as células (MURPHY *et. al.* 2010).

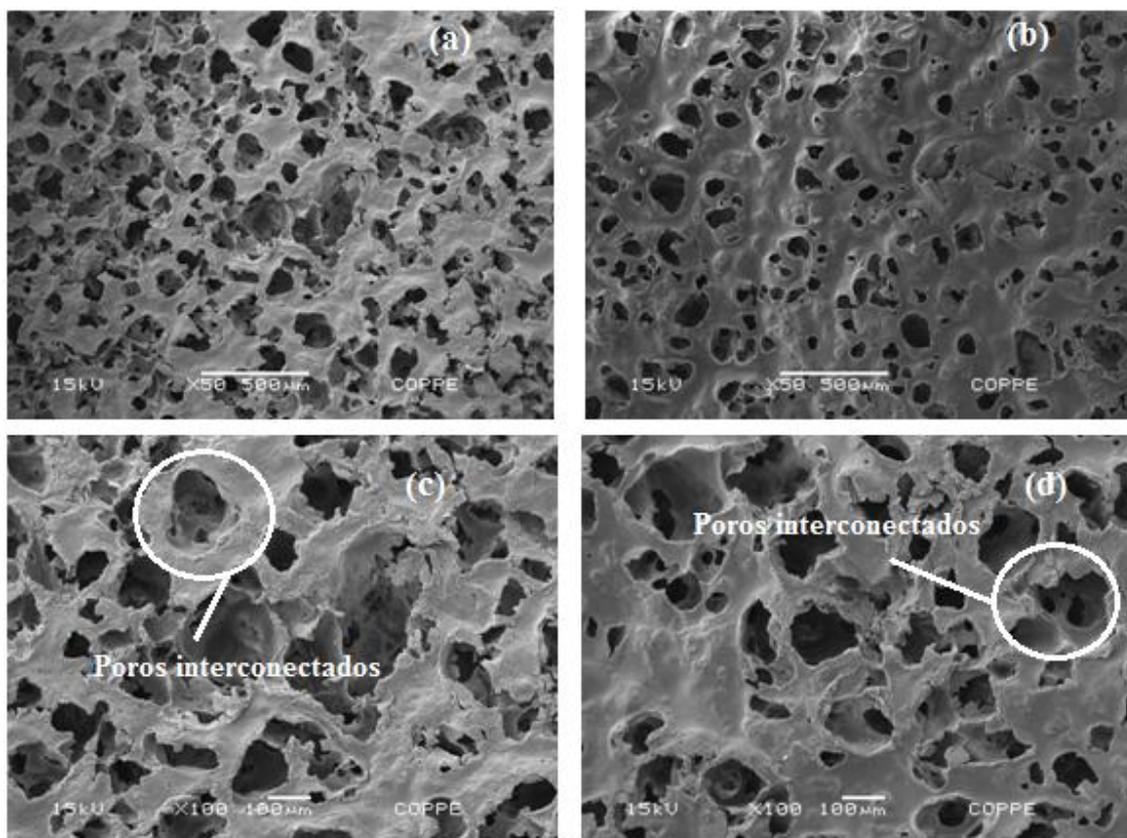


Figura 4.7. Micrografias de MEV mostrando a alta porosidade da superfície de arcabouços de PHB em contato com moldes de vidro (a), em relação a superfície em contato com o ar (b).

Arcabouços anteriormente produzidos por Meiga (2010), nas quais era utilizado o cloreto de sódio (NaCl) como agente porogênico, apresentavam, sobre a região porosa, formação de capa densa em decorrência da grande decantação do NaCl no fundo dos moldes de vidro. Ao analisar as imagens da superfície formada em contato com o ar, não houve formação de capa densa de PHB, possivelmente pela boa dispersão do agente porogênico na solução e baixa taxa de decantação da sacarose no momento da secagem da solução. A ausência dessa capa, possivelmente, permitirá uma maior penetração de células no interior da amostra no momento da cultura. Além disso, o aumento na porosidade superficial poderá facilitar a entrada de nutrientes e oxigênio nas regiões mais profundas do arcabouço, aumentando, assim, a área onde células podem sobreviver e se estabelecer.

Por meio das micrografias da seção transversal (Figura 4.8a) e da lateral externa dos arcabouços (Figura 4.8b) foi possível avaliar que a saída do agente porogênico levou a formação de uma rede irregular de poros. Também foi possível visualizar que esses poros estão dispostos de maneira homogênea por toda seção transversal, fato atribuído a boa dispersão do agente porogênico na solução polimérica.

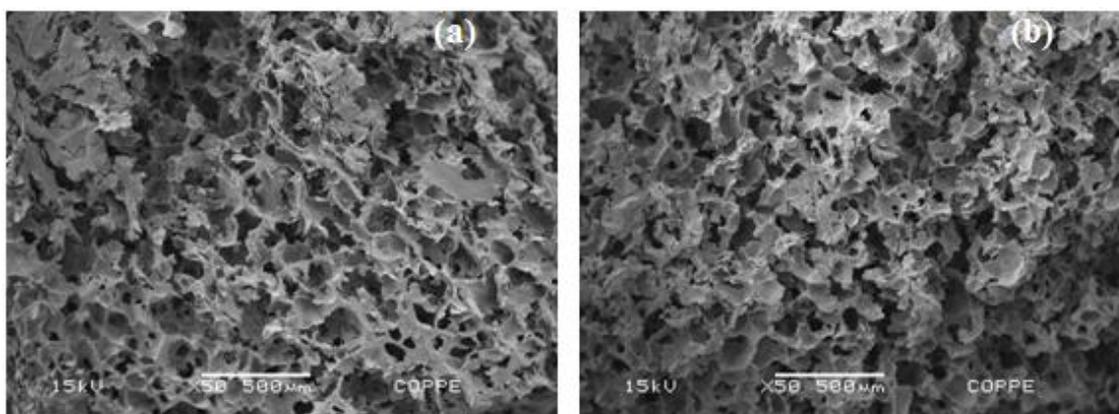


Figura 4.8. Micrografias da seção transversal (a) e da seção lateral (b) dos arcabouços.

Os poros são de suma importância na osteogênese, uma vez que através deles há um fluxo de células que dão início a formação do tecido e também dos nutrientes necessários a sobrevivência destas (BOSE *et. al.*2012).

4.1.2.1. Determinação da porosidade dos arcabouços

A densidade dos arcabouços foi determinada utilizando a equação 1. As medidas utilizadas na determinação e o valor final da densidade estão listados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Variáveis para a determinação da densidade dos arcabouços de PHB

Medida	Valores
Massa do arcabouço seco (g)	0,065 ± 0,014
Massa aparente do arcabouço molhado (g)	-0,00723 ± 0,007
Densidade do álcool (g.cm ⁻³)	0,789
Densidade (g.cm⁻³)	0,079 ± 0,0006

A porosidade é definida como a quantidade de espaços vazios presente em um material. As medidas utilizadas na determinação e o valor final da porosidade aparente estão listados na tabela 4.2.

Tabela 4. 2. Variáveis para a determinação da densidade dos arcabouços de PHB

Medida	Valores
Massa do arcabouço seco (g)	$0,065 \pm 0,014$
Volume de poros - V_{poros} (cm ³)	$3,40 \pm 0,21$
Volume real - V (cm ³)	$3,53 \pm 0,23$
Porosidade (%)	$96,57 \pm 0,33$

Hayati *et al.*(2011) produziram arcabouços porosos a partir do compósito PHB/nano-hidroxiapatita, pela técnica de lixiviação de particulado, utilizando NaCl como agente formador de poros, e obtiveram porosidade em torno de 77%. Em outro trabalho, publicado por Hajiali *et al.*(2010), foram produzidos arcabouços utilizando concentrações 70 e 80% de NaCl na solução, cuja porosidade girou em torno de 59 e 70%, respectivamente. Já os autores Misra *et al.*(2010) produziram arcabouços de um compósito a base de PHB, utilizando, como molde, cubos de sacarose, que foram, posteriormente, lixiviados, gerando uma espécie de espuma porosa, cuja porosidade ficou entre 82 e 87%.

O valor de porosidade encontrado para os arcabouços produzidos nesse trabalho reforça que a técnica utilizada está de acordo com os padrões encontrados na literatura e, além disso, confirma que a sacarose foi extremamente eficiente na produção da estrutura porosa.

Em um arcabouço com 4,2 mm de altura e 8,5 mm de diâmetro (página 44, Figura 4.1), a porosidade indicada na microtomografia foi de 84,8%. Esse resultado confirma o alto grau de porosidade encontrado a partir das medidas utilizando a técnica de Arquimedes (Tabela 4.1). A diferença entre os resultados obtidos pelas duas análises

pode ser atribuído ao fato da sensibilidade da microtomografia estar acima de $7\mu\text{m}$, ou seja, os poros menores presentes na amostra não foram contabilizados, enquanto que, na determinação da porosidade pelo princípio de Arquimedes, todos os poros são considerados.

Essa alta porosidade apresentada pelos arcabouços pode ser atribuída a grande quantidade de sacarose presente na solução polimérica (75% em relação a massa de polímero adicionada). Embora altos valores de porosidade ajudem na osteogênese, esta deve ser limitada de acordo com a especificação do produto a ser obtido, uma vez que o alto grau de porosidade com os poros maiores tendem a reduzir a resistência mecânica do arcabouço, que é uma característica importante para a regeneração do tecido.

4.1.3. Avaliação das propriedades mecânicas dos arcabouços pós-hidrólise

Os arcabouços utilizados no ensaio de compressão foram previamente hidrolisados com solução de NaOH 0,1M.

A Figura 4.9 apresenta a curva típica da tensão x deformação de um arcabouço de PHB processado nas condições descritas no item 3.2.

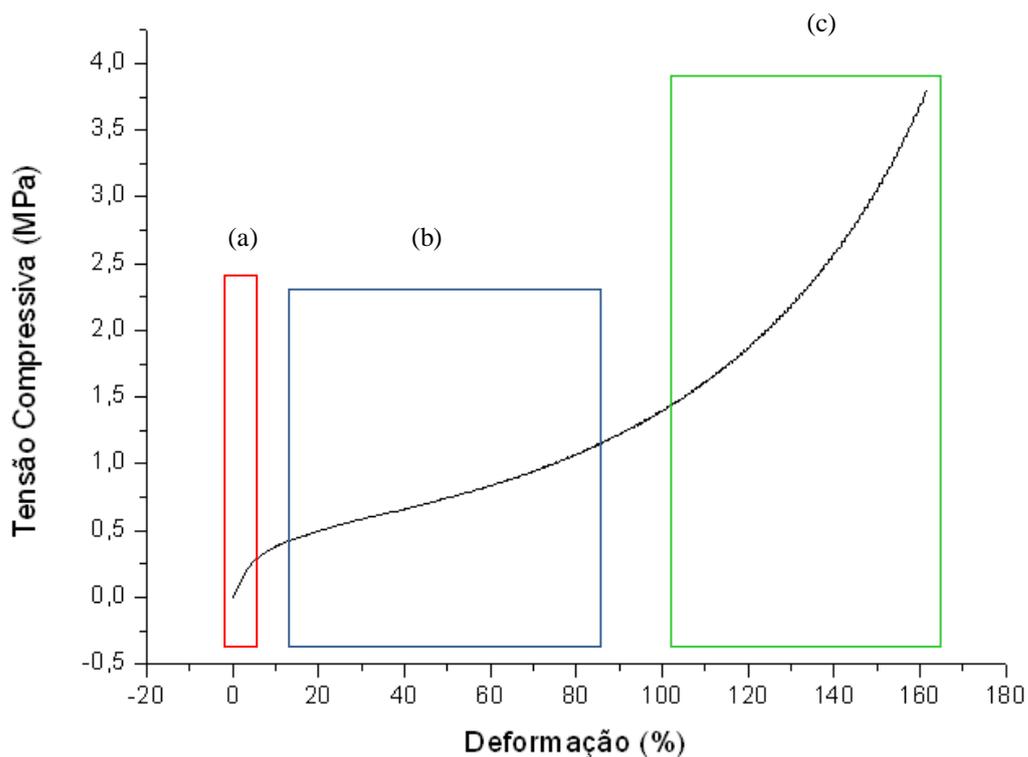


Figura 4.9. Curva tensão compressiva x deformação de um arcabouço PHB

Tabela 4.3. Propriedade mecânica de compressão de arcabouços PHB

Deformação até a 2ª. Região (%)	Tensão Compressiva (MPa)	Módulo de Compressão (MPa)
80	$1,45 \pm 0,34$	$0,018 \pm 0,0045$

Na curva tensão compressiva x deformação foi possível observar a presença de três regiões que são, comumente, encontradas em ensaios de estruturas porosas. A primeira região é conhecida como elasticidade linear (Figura 4.9 a), sendo controlada pela estrutura da “parede” dos poros e cuja inclinação da curva fornece o módulo de compressão. No caso dos arcabouços analisados nesse trabalho, essa região ocorre para valores baixos de tensão. A segunda região é caracterizada pelo platô e está associada ao colapso dos poros (Figura 4.9 b). Quando a maior parte dos poros estão colapsados,

tem início a terceira região, conhecida como densificação (Figura 4.9 c). Essa última região é caracterizada pela elevação acentuada na tensão (SULTANA E WANG, 2008).

O módulo compressivo encontrado para os arcabouços de PHB hidrolisados foi determinado em torno de 0,018 MPa (Tabela 4.3). A rigidez de um osso cortical situa-se na região entre 7 - 30 GPa, enquanto que o de um osso esponjoso fica entre 0,5 - 0,005 GPa (HUTMACHER *et al.*, 2007). Uma vez que os arcabouços PHB apresentaram módulo muito inferior àquele atribuído ao tecido ósseo, as células aderidas ao material, possivelmente, começarão a pesar sobre ele, levando a um colapso da estrutura antes mesmo do estabelecimento do tecido. Devido a essa característica mecânica, este material seria mais adequado para uso como matriz de células de tecidos moles, tais como cartilagem, epitélio, entre outros.

4.2. Caracterização dos arcabouços de PHB modificados

4.2.1. Composição química

A análise dos arcabouços por FTIR teve por objetivo verificar alterações decorrentes da funcionalização com Fn, na tentativa de confirmar a eficiência dos métodos de imobilização utilizados. Foram analisados os espectros de FTIR dos arcabouços antes da imobilização (PHB), imobilizados com Fn por adsorção física (PHB-FN) e por ligação covalente (PHB-EDC-FN).

O espectro do PHB apresentou bandas intensas de 1275 a 1720 cm^{-1} , características do estiramento das ligações C=O do grupo carbonila; de 1453 a 1380 cm^{-1} , referentes à deformação assimétrica da ligação C-H dos grupos etileno e metileno,

CH₂ e CH₃, respectivamente; na faixa de 978 a 1300 cm⁻¹, relacionadas ao estiramento da ligação C–O do grupo éster (Figura 4.10) (BARBOSA, 2008).

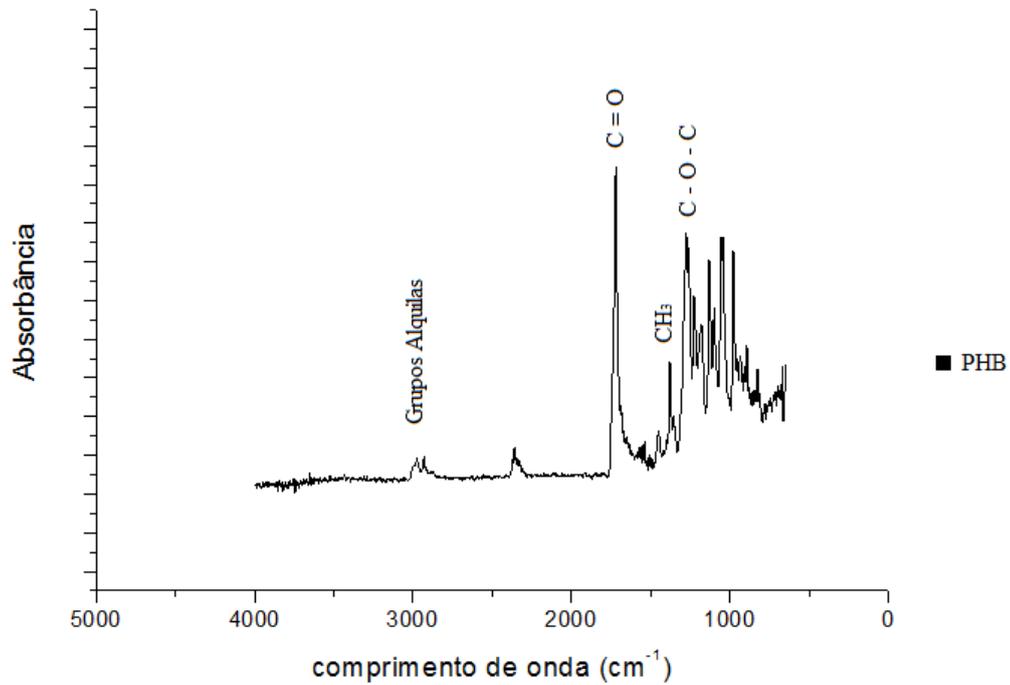


Figura 4.10. Espectro de FTIR do PHB hidrolisado.

A Figura 4.11 apresenta os espectros de FTIR dos arcabouços imobilizados com
Fn.

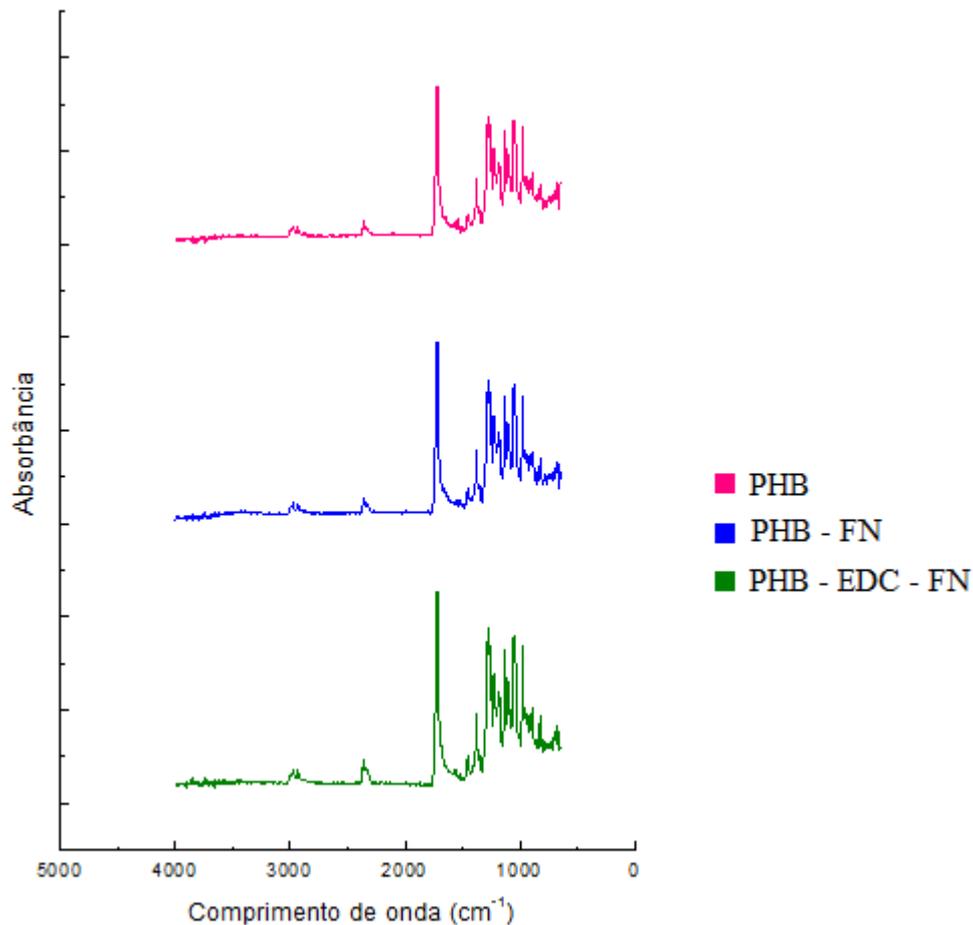


Figura 4.11. Representação dos espectros de arcabouços de PHB modificados com Fn

Segundo Baujard-Lamotte *et al.* (2008) a região de 1500 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} abriga bandas características da Fn, tais como: amida II correspondente às ligações NH de peptídeos (de 1500 a 1550 cm^{-1}), COO^- relativas ao grupos carboxílicos dos peptídeos Asp e Glu (de 1550 a 1500 cm^{-1}). O espectro da proteína Fn também é caracterizado por uma banda centrada a 1641 cm^{-1} , que está relacionado à estrutura secundária folha β (BARBUCCI *et al.*, 2005). Logo, seria esperado encontrar alterações do espectro dos arcabouços modificados com proteínas nessas regiões.

No entanto, não houve qualquer alteração no padrão das bandas nos espectros referentes aos arcabouços modificados em relação ao PHB. (Figura 4.12). Esse fato pode ser atribuído à sensibilidade do aparelho, que não foi capaz de detectar pequenas alterações na composição em função da baixa concentração da solução proteica utilizada na funcionalização das amostras (10 μ g/ml).

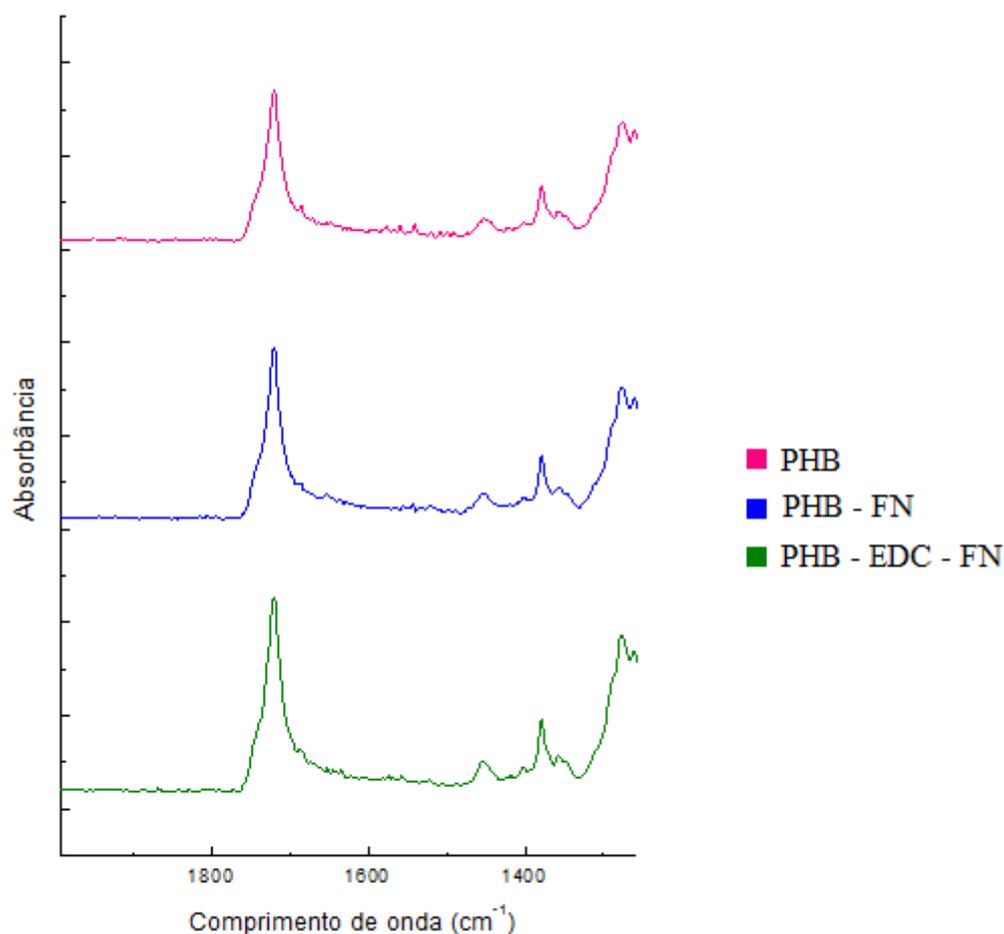
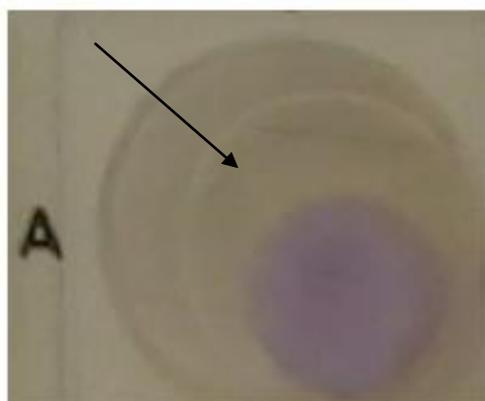


Figura 4.12. Detalhamento dos espectros de FTIR dos arcabouços de PHB, PHB-EDC-FN e PHB-FN.

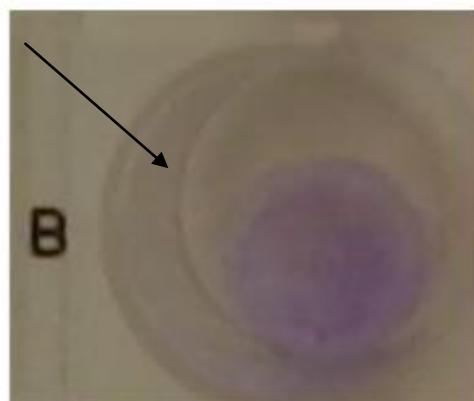
4.2.2. Estimativa de carga superficial dos arcabouços por cristal violeta

A estimativa de cargas negativas dos arcabouços foi feita pelo método Rappaport (1960), que utiliza o corante cristal violeta, um sal de amônio quaternário, carregado positivamente, conhecido por se ligar a proteínas e superfícies de carga negativa.

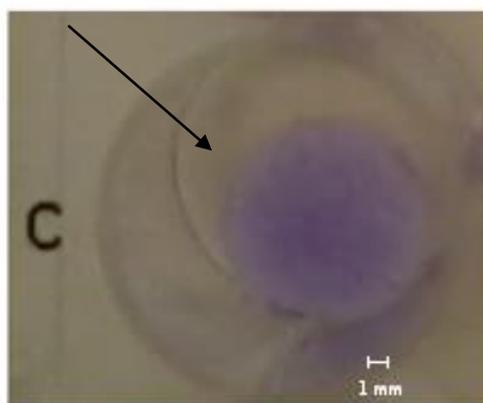
Uma vez que o cristal violeta também é um forte corante para o PHB, foram avaliadas a absorbâncias das soluções de eluição do corante em metanol (dado quantitativo) e o quanto de corante restou fixado em cada arcabouço (dado qualitativo complementar). Os resultados são mostrados na Figura 4.13.



PHB - $31,7\% \pm 2,17$



PHB-FN - $32,2\% \pm 1,42$



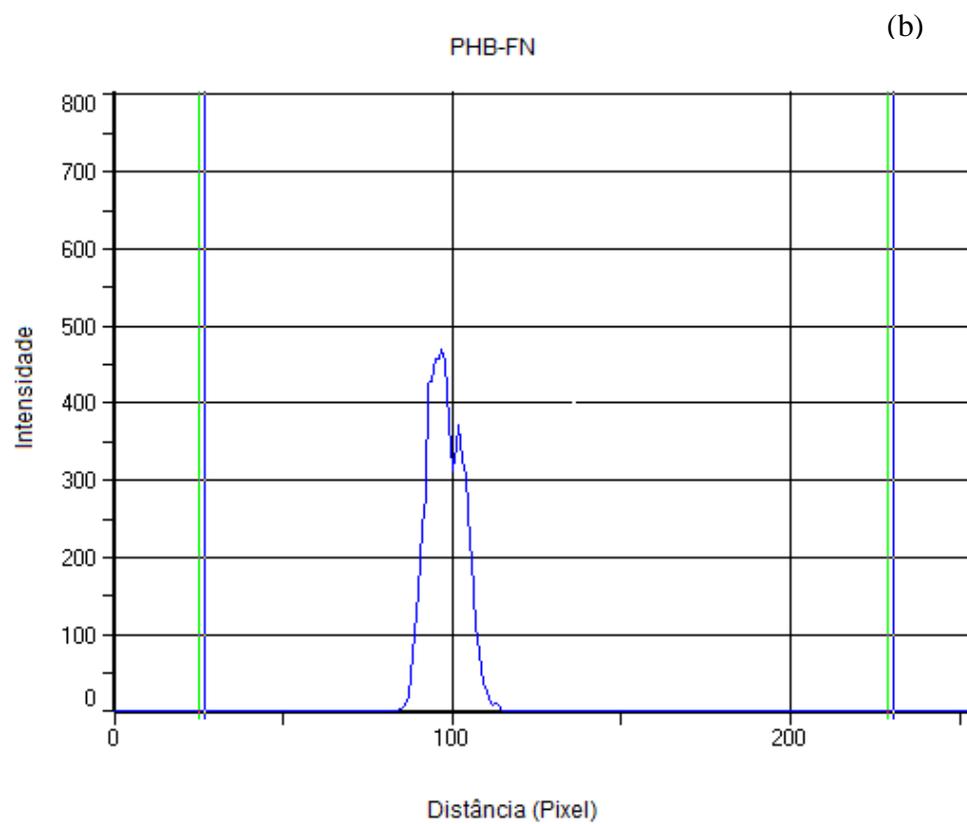
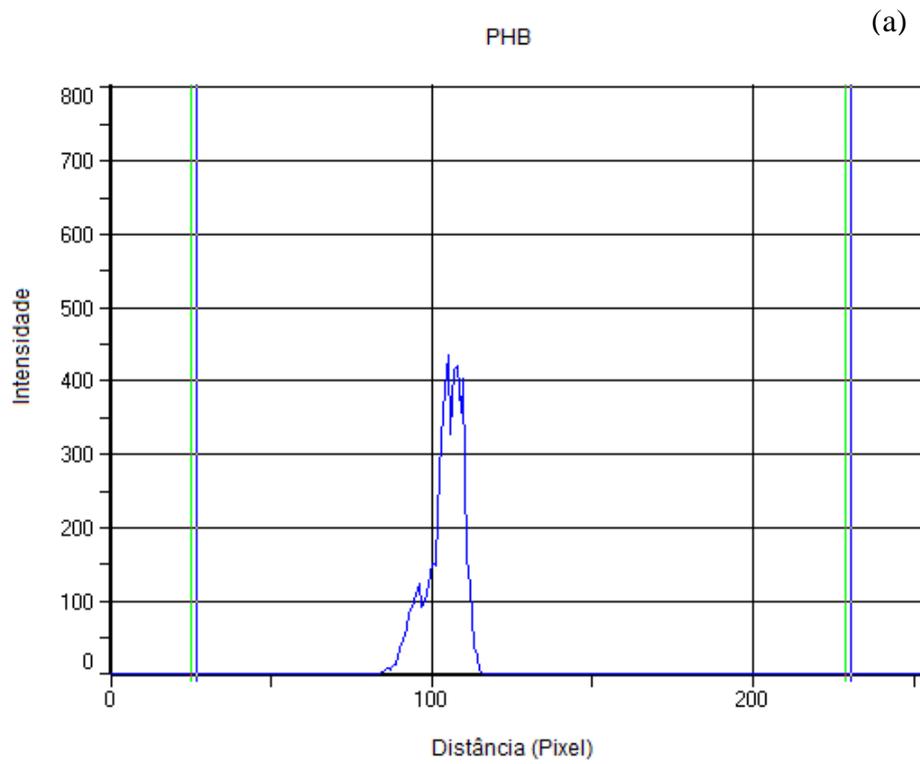
PHB-EDC-FN - $42\% \pm 0,84$

Figura 4.13. Arcabouços corados por cristal violeta, após eluição por metanol e seus respectivos valores de absorbância (porcentagem de absorção de luz).

O cristal violeta cora os arcabouços em tons de azul e, uma vez que as cargas negativas da superfície estão em alta concentração, a eluição com o metanol não consegue retirar todo o corante, deixando-o em diferentes tonalidades de azul. A imagem referente ao arcabouço PHB ficou levemente corada de azul, indicando uma superfície levemente negativa. As cargas negativas da superfície podem ser atribuídas

aos grupamentos hidroxílico e carboxílico formados em decorrência da hidrólise (THIRÉ *et. al.*, 2006). Já o arcabouço PHB-FN apresentou regiões com um azul mais intenso. Estas regiões possivelmente estão relacionadas a aglomerados de Fn formados na superfície do PHB. Pode-se também sugerir que estes aglomerados tenham sido formados próximos aos poros, cujas paredes podem ter funcionado como sítios de ancoramento físico. Porém, não houve diferença significativa entre a porcentagem de absorção de luz entre os dois grupos ($p > 0,05$), indicando a similaridade entre a carga superficial. Em relação à imagem do arcabouço PHB-EDC-FN, pode ser observado que há presença de um azul mais intenso que os demais, fato que é comprovado pela porcentagem de absorção de luz mais elevada do que as encontradas para os outros dois grupos. Ou seja, houve um aumento da carga negativa na superfície desse grupo de amostras, que pode ser atribuído, possivelmente, à presença de moléculas de Fn imobilizadas covalentemente. Este resultado está de acordo com o esperado, visto que a utilização do agente de acoplamento permitiu a criação de mais sítios ativos para a ligação da proteína. Observa-se também que a coloração é homogênea por toda a superfície, sendo o indicativo da formação de uma camada (ou filme) de moléculas de Fn imobilizadas.

O *software* Image Pro Plus 6 foi utilizado nas imagens da Figura 4.13, com a finalidade de obter a intensidade da cor azul presente nos arcabouços corados com o cristal violeta (Figura 4.14)



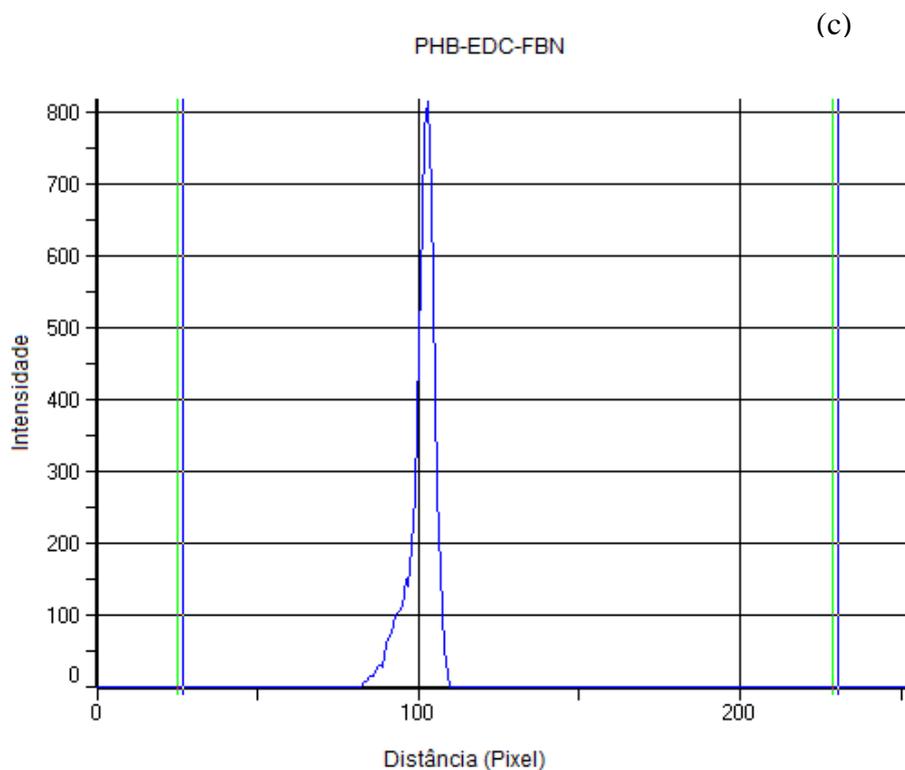


Figura 4.14. Intensidade da cor azul dos arcabouços de PHB (a), PHB-FN (b) e PHB-EDC-FN (c).

De acordo com os gráficos, foi possível observar que os arcabouços PHB e PHB-FN apresentaram intensidade da cor azul similares. Porém, o segundo arcabouço apresentou um azul mais intenso do que o primeiro. Essa diferença, possivelmente, se deu, pela Fn adsorvida fisicamente ao material, que visualmente forma pequenos pontos mais escuros em relação ao arcabouço sem modificação. Já no arcabouço PHB-EDC-FN a cor azul estava muito mais intensa do que nos outros arcabouços, diferença que corrobora a maior porcentagem da absorção de luz encontrada para esse grupo de amostras e a maior imobilização de proteínas no método via ligação covalente.

A partir das análises realizadas, é possível confirmar a formação de superfícies mais negativas após a imobilização covalente da fibronectina sobre arcabouços hidrolisados.

4.3. Cultura de células ósseas

4.3.1. Citotoxicidade

A análise da citotoxicidade foi conduzida utilizando extratos feitos a partir dos arcabouços PHB, PHB-FN e PHB-EDC-FN. Nesse teste, foram utilizados como controle positivo/tóxico fragmentos de látex (altamente tóxico para as células, matando todas aquelas que entram em contato com o extrato) e como controle negativo/não-tóxico pérolas de poliestireno (não alteram a morfologia e o crescimento celular). Foram utilizados, ainda, o controle celular (célula em contato com meio e 10% de soro fetal bovino) e o controle branco (apenas o reagente do teste), sendo esse último necessário para desconto do valor de “background” do reagente do restante dos valores encontrados no teste.

A incorporação do corante vermelho neutro é usualmente empregada em análise de citotoxicidade, uma vez que apenas células viáveis são capazes de acumular o corante em seus lisossomos. Esse teste avalia a sobrevivência/viabilidade de uma célula em cultura.

Ao final de 24h de exposição aos extratos, as células foram mortas e fixadas para a eluição do corante e leitura da intensidade da coloração das soluções, em espectrofotômetro. A Figura 4.15 exhibe os dados referentes as amostras e aos controles do experimento.

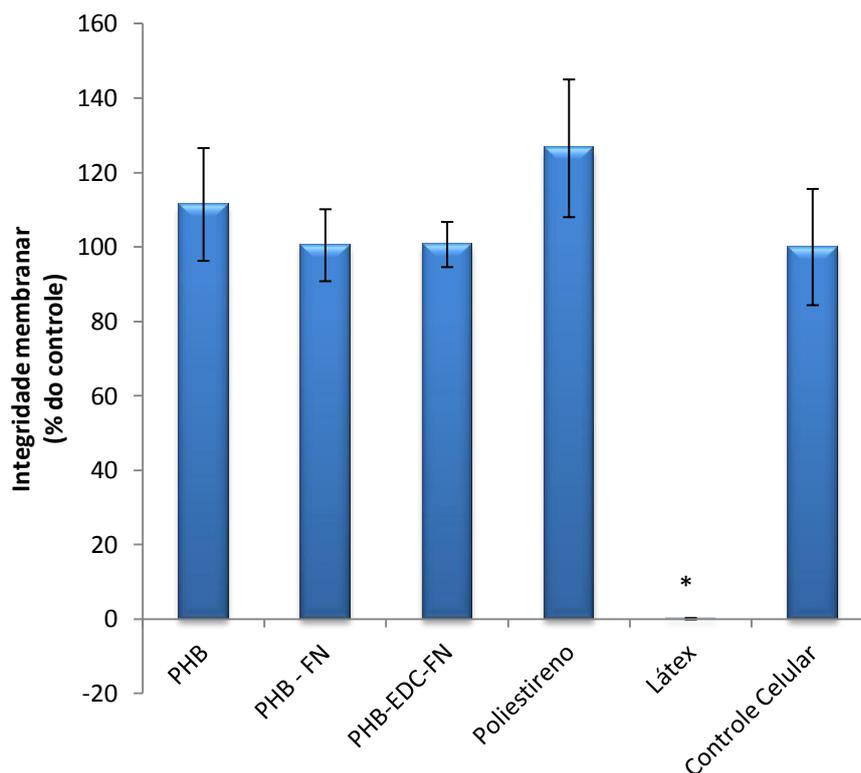


Figura 4.15. Gráfico da análise de citotoxicidade por incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos das células MC3T3. Estão representados os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas respectivas barras de erro (* $p < 0,05$).

Com base nos valores de porcentagem referentes às amostras e assumindo o controle celular como células 100% viáveis, nenhum dos arcabouços analisados se mostrou tóxico para as células. Isso pode ser afirmado considerando-se que um material é considerado citotóxico quando as células expostas a ele têm porcentagem inferior a 75% em relação ao controle celular. Não houve diferença significativa entre os grupos e os controles celular e negativo.

Esse resultado é o primeiro indício de que todos os grupos podem ser usados para cultivo celular por não causarem danos às células. É importante avaliar se os arcabouços permitem a adesão celular, o espriamento e a proliferação destas. Além

disso, o arcabouço deve ser capaz de sustentar células e componentes secretados até que a matriz esteja consolidada e o conjunto célula + matriz esteja estruturado.

4.3.2. Dosagem de proteína totais, fosfatase alcalina e íons cálcio

A dosagem de proteínas presentes no sobrenadante foi feita utilizando o método colorimétrico de Bradford e teve por objetivo analisar, qualitativamente, a atividade das células em cultura.

Com 2 dias de cultura, os sobrenadantes referentes aos arcabouços, bem como os sobrenadantes do controle celular não mostraram níveis elevados de proteína. Panorama que foi se alterando ao longo dos dias de cultura. Com 7 dias houve um aumento expressivo na quantidade de proteínas secretadas em todos os grupos. O pico da secreção de proteínas aconteceu no décimo quarto dia de cultura e no vigésimo primeiro houve uma queda na produção de proteínas pelas células (Figura 4.16).

Em nenhum dos tempos experimentais foi possível observar diferença significativa entre os grupos de arcabouços, comportamento que não era esperado, considerando-se os diferentes tratamentos realizados na superfície dos diferentes grupos de amostras.

A proteína FN atua nos primeiros momentos da adesão, mediando a interação célula-material. Consequentemente, com 2 dias de cultura, o primeiro tempo utilizado para análises, já não foi possível avaliar o efeito da proteína sobre os osteoblastos, uma vez que as células começam a secretar os fatores necessários para que estas venham a se estabelecer naquela matriz.

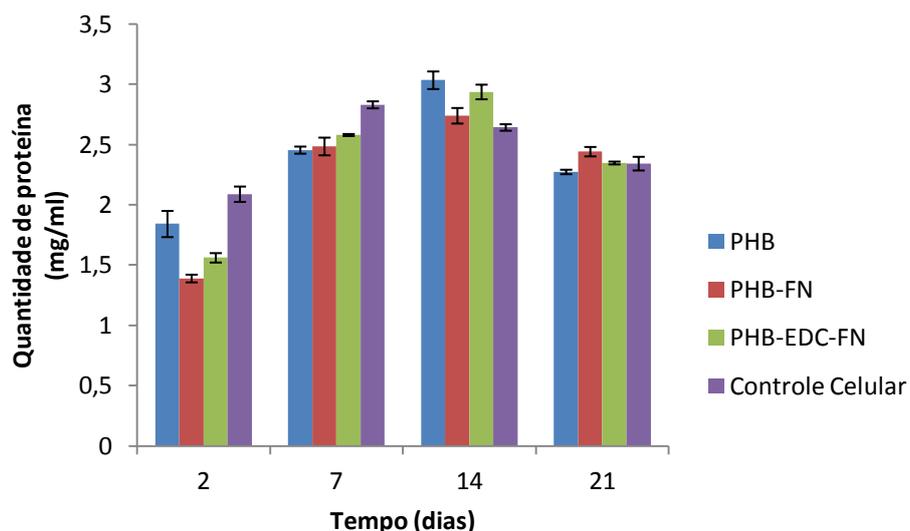


Figura 4.16. Dosagem de proteínas totais, produzidas pelas células MC3T3, ao longo de 21 dias de cultura. Constam os valores encontrados para cada tempo/amostra e tempo/controle, e as suas respectivas barras de erro.

A dosagem da fosfatase alcalina foi feita em sobrenadantes de cultura de MC3T3, que foi previamente estabelecida sobre os três tipos diferentes de arcabouço utilizados nesse trabalho. Os sobrenadantes foram recolhidos nos tempos de 2 dias, 7, 14 e 21 dias (Figura 4.17). Trabalhos relacionados à engenharia de tecido ósseo reportam esses tempos como ótimos para analisar a atividade osteoblástica (MIKAMI *et. al.*, 2010).

Dosar a atividade da fosfatase presente no sobrenadante permite avaliar um produto excretado pelas células, ao contrário da dosagem da atividade enzimática em lisados celulares, que permite avaliar a atividade da enzima intracelular.

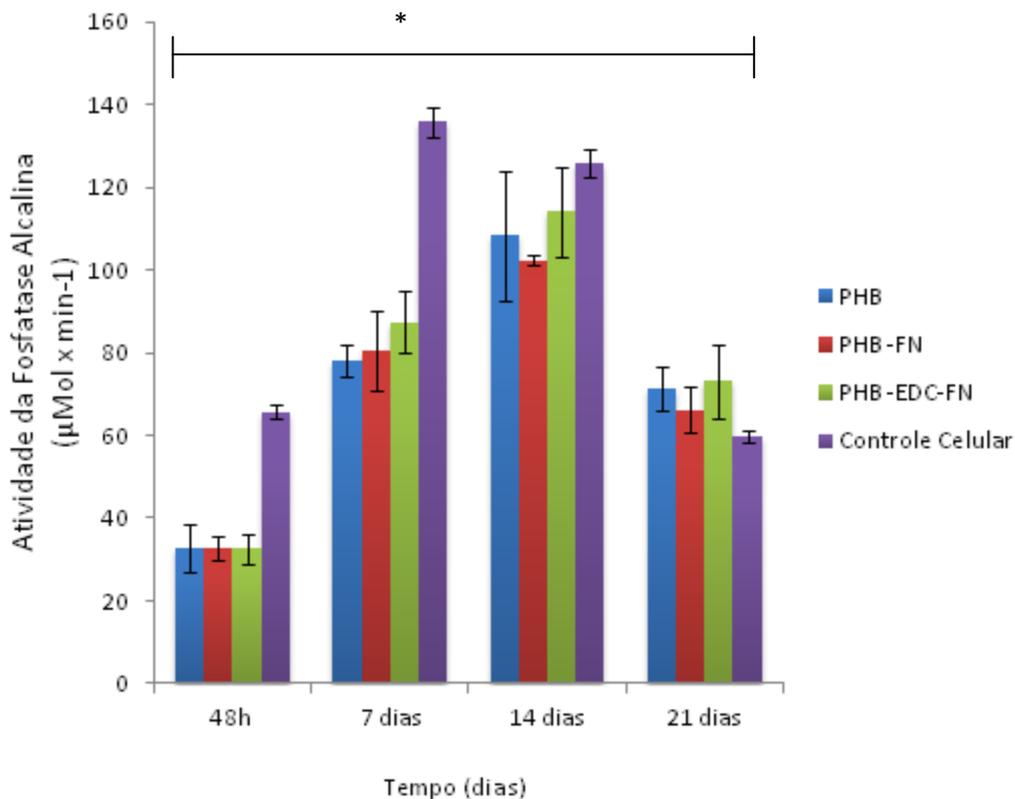


Figura 4.17. Atividade da enzima fosfatase alcalina, produzida pelas células MC3T3, ao longo de 21 dias de cultura. Constam os valores encontrados para cada tempo/amostra e tempo/controle, e as suas respectivas barras de erro (* $p < 0,05$).

Após 2 dias, as células em contato com o material produziram uma quantidade inferior de fosfatase alcalina quando comparadas as células do controle celular. Esse fato pode ser explicado pelo tipo de cultura realizado, ou seja, células cultivadas em matriz 2D (controle) se comportam de maneira diferente em relação aquelas cultivadas em matriz 3D. Outro fator importante é que ao colocar a suspensão celular em contato com o material, algumas células podem atingir regiões muito profundas do arcabouço, que não possuem boa transferência de nutrientes e oxigênio. A morte dessas células leva a uma redução na contagem total, que acaba afetando a dosagem da enzima.

A análise dos sobrenadantes referentes ao sétimo dia de cultivo mostrou que houve um aumento significativo na expressão de fosfatase alcalina. Não houve diferença significativa entre os arcabouços. Nesse tempo experimental, foi possível observar a máxima atividade da fosfatase alcalina no controle celular. A atividade da enzima, nesse tempo, também foi mais baixa do que aquela encontrada no controle.

No décimo quarto dia de cultura, ocorreu um aumento na atividade da fosfatase alcalina nos sobrenadantes referentes a cultura celular estabelecida nos arcabouços. Neste tempo experimental, aconteceu o pico da atividade da fosfatase. O mesmo não ocorreu nos sobrenadantes do controle celular, que apresentaram pequena redução na atividade dessa enzima.

No vigésimo primeiro dia de cultivo, todos os grupos de amostra, incluindo controle, apresentaram queda significativa na atividade da fosfatase alcalina. Porém, a atividade enzimática nos sobrenadantes referentes as amostras foi superior do que aquela encontrada para o controle celular. Uma das hipóteses para esse fato é que quando cultivadas em suportes tridimensionais, as células encontram melhores condições de se estabelecerem a longo prazo, o que não acontece em matrizes bidimensionais.

A normalização da atividade da enzima fosfatase alcalina foi feita utilizando os valores obtidos na dosagem de proteínas totais por Bradford (Figura 4.18).

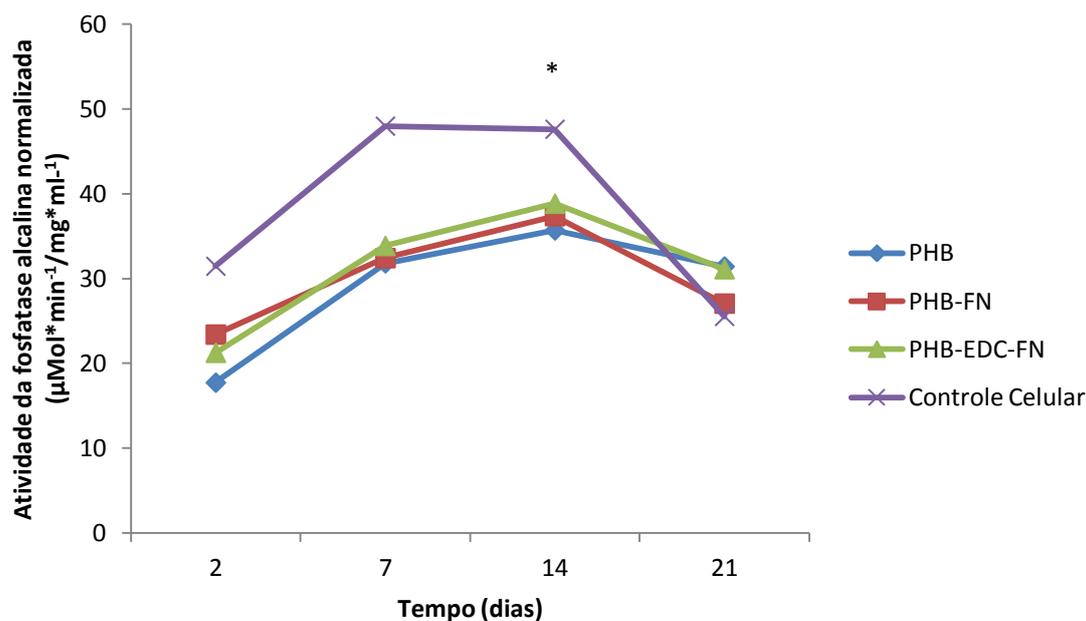


Figura 4.18. Atividade da enzima fosfatase alcalina, produzida pelas células MC3T3, ao longo de 21 dias de cultura, normalizada pelo padrão de proteínas totais produzidas pelas células, nos respectivos tempos (* $p < 0,05$).

Jing *et. al.* (2007) dosaram a atividade da enzima em lisados de células MC3T3 que foram previamente cultivadas sobre arcabouços do copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxi hexanoato) e observam que a atividade da enzima tende a aumentar com 28 dias de cultivo. O tempo em que ocorre esse aumento na expressão tende a variar de acordo com o estágio de diferenciação em que a célula se encontra. Ainda de acordo com os autores, a atividade enzimática significativa indica que as células estão se diferenciando em osteoblastos.

No caso dos arcabouços PHB, PHB-FN e PHB-EDC-FN, o aumento na atividade enzimática ocorre por volta do décimo quarto dia, tempo em que, possivelmente, as células estão se diferenciando em osteoblastos e iniciando os processos de ossificação.

Meiga *et al.* (2011) discutiu a importância da fibronectina nos primeiros momentos da adesão celular (24h) sobre arcabouços de PHB produzidos pela técnica da evaporação de solvente e lixiviação de NaCl e funcionalizados. Neste trabalho, a ligação da fibronectina ao material acontecia em uma capa densa e pouco porosa formada na superfície de cada arcabouço. Nesse caso, observou-se diferença significativa na adesão e espraiamento celular nos arcabouços de PHB em função da técnica de imobilização utilizada. Melhores resultados foram obtidos para PHB-EDC-FN. Os autores atribuíram esta diferença de comportamento a maior estabilidade da ligação covalente e possivelmente à exposição dos grupamentos RGD da Fn promovidos por este tipo de ligação.

No presente trabalho, ao contrário do que foi observado por Meiga *et al* (2011), não houve diferença significativa na atividade enzimática e na expressão de proteínas totais pelas células cultivadas nos diferentes grupos de arcabouços. Uma hipótese que poderia explicar este comportamento é que a presença de poros no material (principalmente, na superfície, aumentando a sua rugosidade) pode ter sido mais significativa para a adesão e proliferação celular do que a ativação da superfície.

Não foi possível fazer a quantificação de íons cálcio nos sobrenadante da cultura celular, uma vez que os níveis detectados no teste foram inconclusivos. Esse fato pode ser atribuído à presença de cálcio no meio de cultura utilizado nas células. É possível que a deposição do cálcio no material, deixando o meio de cultura com menos íons livres, tenha sido compensada pela produção de cálcio pelas células. Logo, não foi possível afirmar que o cálcio dosado foi, de fato, produzido pelas células.

4.3.4. Morfologia celular

Na Figura 4.19, são apresentadas micrografias da superfície lateral de um arcabouço PHB, após 48 horas de cultura (Figura 4.19 (a) e 4.19 (b), respectivamente). A partir das imagens, foi possível verificar que as células depositadas sobre esse material, no segundo dia de cultura, estão em processo de espraiamento, ou seja, algumas já estão estendidas sobre a superfície do material e outras já estão começando a se estender em direção as paredes dos poros.

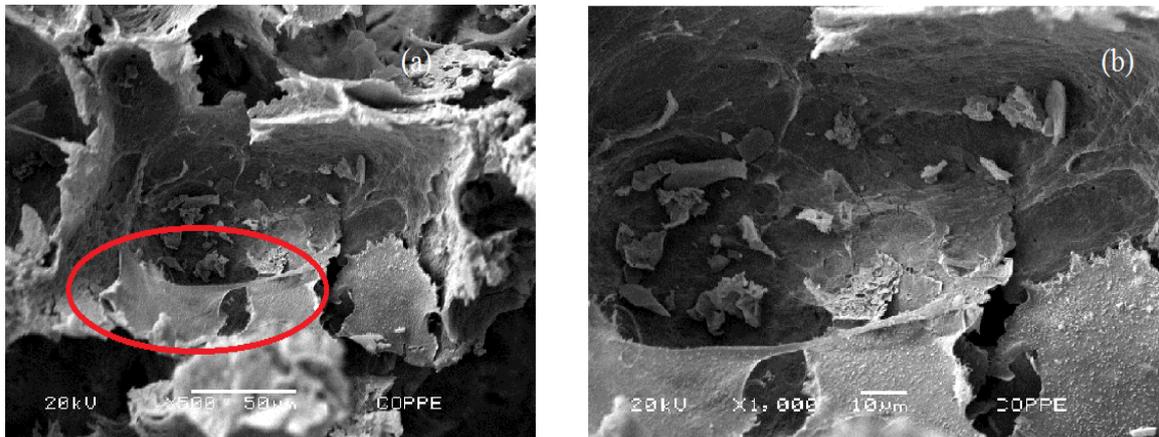


Figura 4.19. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB, com 2 dias de cultura

Na Figura 4.20, são apresentadas imagens da superfície lateral de arcabouço PHB-FN, com 48 horas de cultura. Também foram encontradas algumas células aderidas a superfície, mas que ainda não estão completamente estendidas sobre ela e outras já espraiadas no material.

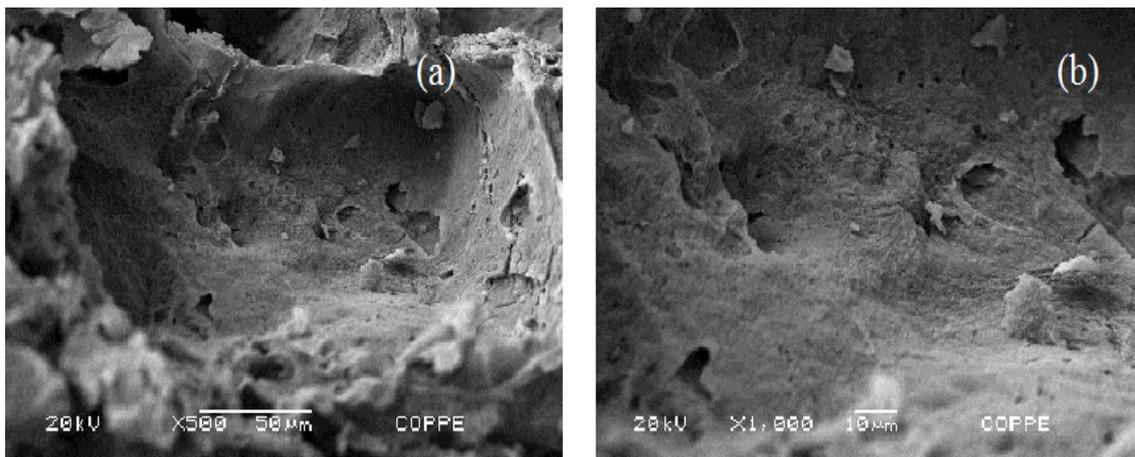


Figura 4.20. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-FN, com 2 dias de cultura

Na Figura 4.21, são mostradas micrografias da superfície lateral de arcabouço PHB-EDC-FN, com 48 horas de cultura. Nessa superfície foram encontradas células aderidas e uma grande quantidade de células espalhadas sobre a amostra. Podemos observar, também, que há conexão entre as células e que estas já estão começando a recobrir a superfície do material.

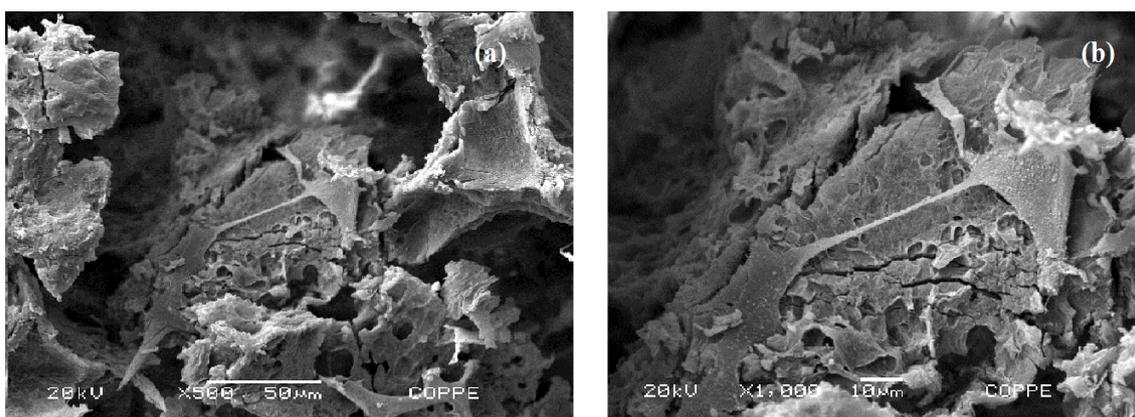


Figura 4.21. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-EDC-FN, com 2 dias de cultura. (b) Detalhamento da área analisada em (a).

As células aderidas sobre a superfície dos arcabouços PHB e PHB-FN apresentam morfologia semelhante. Já estão aderidas ao arcabouço, porém ainda não estão completamente estendidas, apresentando um formato semelhante aquele apresentado por elas pouco depois da adesão em suporte 2D (placa controle). Uma vez que o PHB não é um material bioativo, as células conseguem aderir ao material, mas precisam começar a secretar as substâncias necessárias para que se estabeleçam naquele ambiente. Logo, no arcabouço sem funcionalização, o estiramento das células tende a demorar mais para acontecer.

O mesmo fato acontece no material PHB-FN, embora ele tenha sido funcionalizado com fibronectina, proteína fundamental no processo de adesão e espraiamento das células, como etapa pré cultura, os arcabouços são embebidos em meio de cultura por 24 horas, antes de receberem as células. Levando em consideração que nesse material a proteína está adsorvida a superfície, um tipo de ligação fraca, pode ter havido a liberação da proteína para o meio de cultura, acabando com a capa proteica que havia sido formada sobre a superfície da amostra.

A morfologia das células encontradas no arcabouço PHB-EDC-FN foi diferente de ambos os grupos anteriores. Pode-se supor que a proteína, por estar ligada covalentemente à superfície do material, não se desligou do arcabouço durante o processo de pré-cultura (imersão do material em meio de cultura sem soro e sem células). Portanto, ao serem depositadas sobre o arcabouço, as células encontraram um eficiente mediador de adesão e, conseqüentemente, interagiram mais rapidamente com o ambiente, se espraiando.

Apesar das células estarem mais espalhadas no arcabouço PHB-EDC-FN, as imagens tornaram evidente que os três grupos de arcabouços foram efetivos em promover a adesão celular.

Com 21 dias de cultura, ambos os grupos foram analisados quanto a morfologia das células aderidas em sua superfície. Na Figura 4.22, pode ser observada a superfície lateral do arcabouço PHB. As imagens evidenciam células espalhadas recobrendo a superfície da amostra, prolongamentos de membrana e conexão entre as células. Há, também, possível emissão de fibrilas de colágeno.

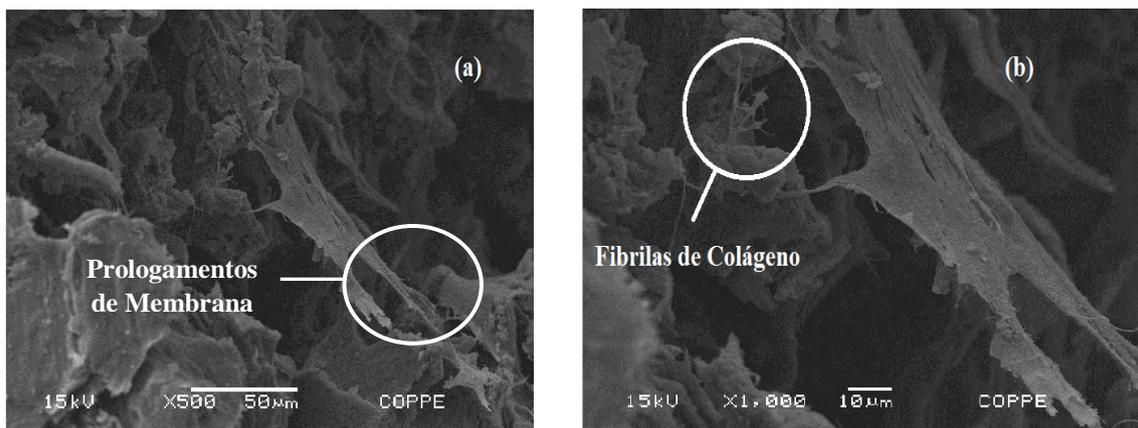


Figura 4.22. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB, com 21 dias de cultura.

As células aderidas ao arcabouço PHB-FN apresentaram morfologia semelhante àquelas aderidas ao arcabouço anterior, como mostra a Figura 4.223. Foi possível observar a presença de muitas células aderidas à superfície do material e que, além dos prolongamentos de membrana, as células estão secretando fibrilas que se emaranham como teias ao longo da superfície.

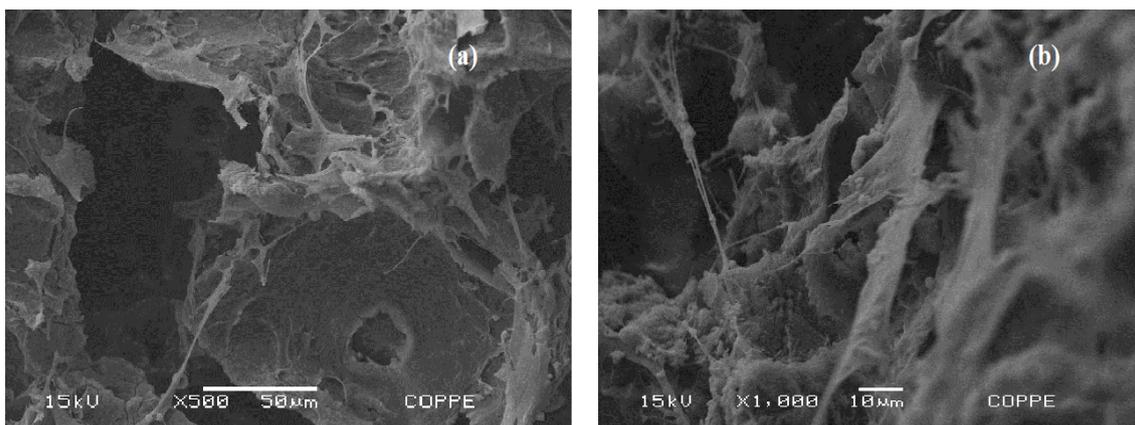


Figura 4.23. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-FN, com 21 dias de cultura.

As imagens referentes ao arcabouço PHB-EDC-FN também evidenciam células espalhadas recobrando a superfície do material. A morfologia das células é semelhante àquela observada para os outros dois materiais com o mesmo tempo de cultivo (Figura 4.24).

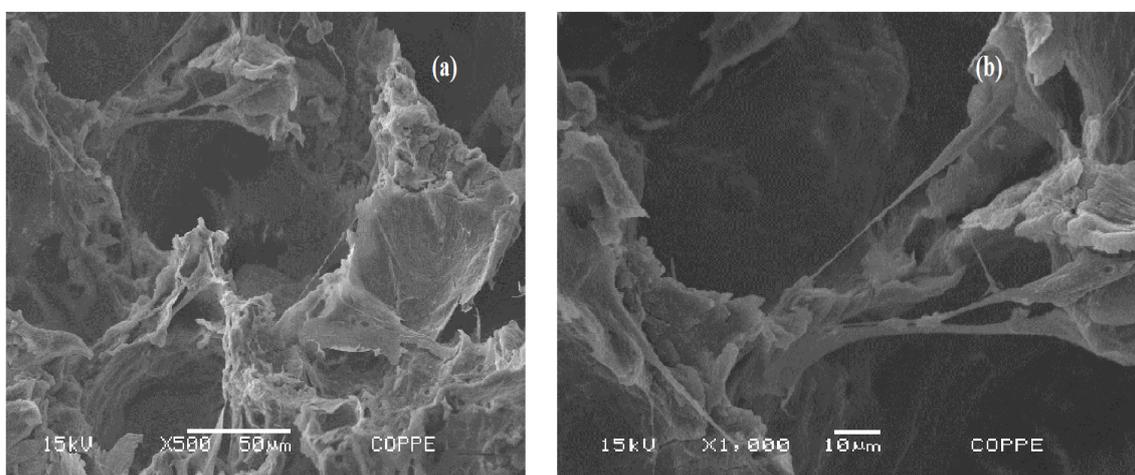


Figura 4.24. Micrografias de MEV feitas em Arcabouço PHB-FN, com 21 dias de cultura

Com 21 dias de cultura, não foram verificadas diferenças significativas na morfologia das células aderidas as diferentes amostras. Uma razão para explicar este

comportamento poderia ser o fato de que, conforme as células vão aderindo à superfície e reconhecendo aquele ambiente, vão começando a secretar fatores que tornarão possível o reconhecimento daquele local como favorável ao seu estabelecimento. Ou seja, após um determinado tempo de cultura, as células podem começar a produzir os fatores necessários à sua sobrevivência, não necessitando mais da proteína fibronectina imobilizada, sendo esta importante apenas nos primeiros momentos da adesão.

Outra observação feita nesse tempo de cultivo, foi o fato das células já estarem secretando componentes de matriz extracelular. Esta é uma observação bastante encorajadora, uma vez que a secreção de elementos da matriz é uma premissa de que naquele material pode haver ossificação. Chou et al. (2005) apresentam imagens de micrografias de MEV de arcabouços de PLGA, com células MC3T3 cultivadas também por 21 dias, onde há intensa deposição de elementos de matriz sobre a superfície do material. Os autores afirmam que o material foi capaz de promover adesão, espreadimento e proliferação de células.

De acordo com Depan *et al.* (2011), os prolongamentos de membrana contém filamentos de actina que vão permitir que as células penetrem na superfície e se movimentem ao longo do substrato. Quando osteoblastos estão confinados em regiões de poros, tendem a lançar essas projeções, de forma que alcancem as paredes da região (Figura 4.24). Osteoblastos, *in vivo*, apresentam morfologia cuboide ao invés de achatada (Figura 4.22), portanto, o fato de estarem sobre uma matriz tridimensional e assumirem conformação cuboide sobre esta, tende a facilitar a formação do tecido ósseo.

Os resultados de EDS foram inconclusivos quanto à presença de cálcio nas amostras. Foram analisadas duas superfícies de cada grupo de arcabouço: fratura

vertical e superfície de cultura. O cálcio estava presente em algumas das superfícies, mas não em outras. Porém, o meio de cultura utilizado para a cultura celular já é enriquecido com o cálcio, logo, resíduos de cálcio deveriam estar presentes em todas as superfícies do arcabouço.

É válido ressaltar que, ao contrário do que foi previsto no item 4.2, tendo em vista o baixo módulo de compressão dos arcabouços de PHB, após 21 dias de cultura, não foram observadas modificações significativas na morfologia dos arcabouços (Figura 4.25). Ou seja, apesar do peso das células e dos produtos celulares, o colapso da estrutura porosa não aconteceu.

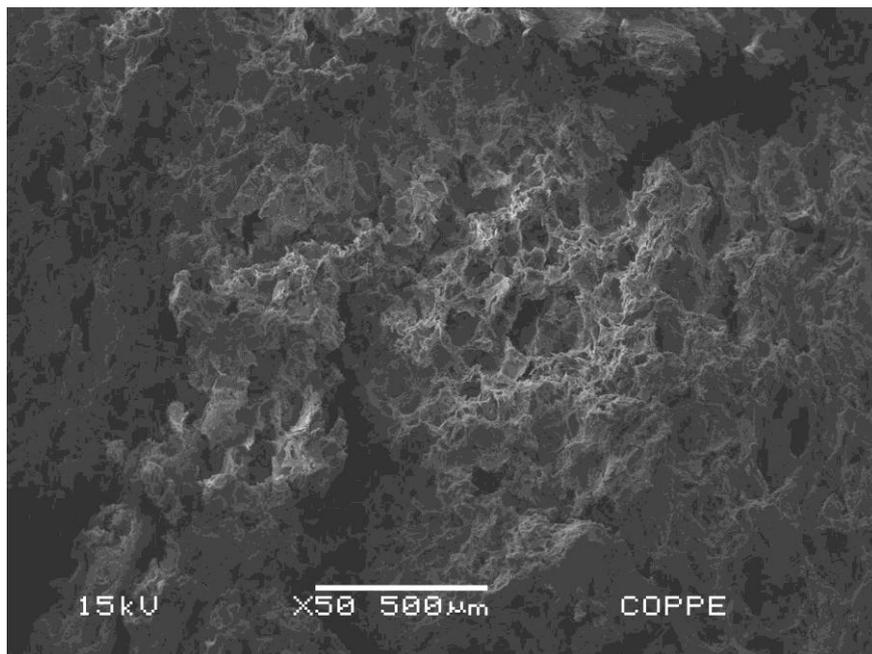


Figura 4.24. Micrografia de MEV da lateral externa de um arcabouço de PHB após 21 dias de cultura

Capítulo 5

CONCLUSÕES

5.1. Conclusões

- Foi possível produzir arcabouços porosos de PHB pela técnica de lixiviação de particulado utilizando sacarose como agente porogênico, empregando um período de 96 horas para lixiviação, sob agitação magnética constante;
- A porosidade dos arcabouços produzidos, bem como sua distribuição de poros, estão dentro das faixas apontadas como boas para o estabelecimento de tecido ósseo;
- Apesar do baixo módulo de compressão apresentado pelo arcabouço, após 21 de cultura não foi observada fragilização da estrutura porosa;
- Não foi possível detectar a presença de Fn na superfície dos arcabouços modificados. Porém, através da estimativa de carga superficial, foi possível observar diferença entre o PHB e o PHB-EDC-FN, que pode ser atribuída à imobilização da Fn na superfície;
- Todos os grupos de arcabouços foram considerados não citotóxicos;
- A dosagem de proteínas totais pelo método colorimétrico de Bradford indicou que as células estavam mais ativas entre o 7° e o 14° dia;
- A dosagem da atividade da enzima fosfatase alcalina mostrou maior atividade por volta do 14° dia, sugerindo que as células da linhagem, possivelmente, estavam se diferenciando em osteoblastos.

- Com 2 dias de cultura, apenas as células cultivadas sobre o arcabouço PHB-EDC-FN estavam espalhadas sobre a superfície, indicando que a estabilidade da ligação covalente foi fundamental nos primeiros momentos da cultura;
- A morfologia das células cultivadas por 21 dias nos diferentes grupos foi semelhante, indicando que a Fn é essencial apenas nos primeiros momentos da cultura;
- Os resultados sugerem que a imobilização de Fn sobre arcabouços de PHB e o método utilizado para a sua imobilização não afetam a atividade celular tardia e sua morfologia neste período.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

- Novos trabalhos devem ser conduzidos, com a finalidade de melhorar as propriedades mecânicas dos arcabouços confeccionados neste trabalho, visando sua aplicação na engenharia de tecido ósseo.
- Determinar o módulo de compressão dos arcabouços pós-cultura, visando determinar se a estrutura do material suportará a deposição de elementos da matriz extracelular e a sua calcificação;
- Avaliar a degradação *in vitro* dos arcabouços produzidos neste trabalho a fim de acompanhar possíveis mudanças estruturais ao longo do período de cultura;
- Realizar a análise qualitativa da densidade celular em cada grupo de amostras, através do método colorimétrico XTT, visando estabelecer relação entre a quantidade de células e atividade osteoblástica;
- Analisar a organização do citoesqueleto das células aderidas ao material através de microscopia confocal de varredura;

- Avaliar o comportamento de macrófagos quando cultivados em contato com os diferentes grupos de arcabouços, utilizando o teste de detecção de múltiplas citocinas Luminex;
- Avaliar a expressão de RANKL e OPG das células MC3T3 cultivadas sobre os diferentes grupos de amostras, utilizando o teste de detecção de múltiplas citocinas Luminex;

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

ALBERTS, B. et al. “Citoesqueleto”. In: RENARD, G.; CHIES, J. M. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Cap 16. Porto Alegre, Brasil, Artmed, 2010.

ALBERTS, B. et al. “Junções celulares, Adesão celular e Matriz extraceclular”. In: RENARD, G.; CHIES, J. M. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Cap 19. Porto Alegre, Brasil, Artmed, 2010

ALSBERG, E. et al. “Cell-interactive Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering”. *Journal of Dental Research* v. 80, n. 11 (Nov), pp. 2025-2029, 2001.

ARKIN, A. H.; HAZER, B. “Chemical modification of chlorinated microbial polyester”. *Biomacromolecules*, v. 3, n. 6 (Dez), pp. 1327-1335, 2002.

ATALA, A. “Engineering tissues, organs and cells”. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 1, n. 2 (Maio), p. 83-96, 2007.

BADYLAK, S. F.; NEREM, R. M. “Progress in tissue engineering and regenerative medicine”. *PNAS*, v. 107, n. 8 (Fev), pp. 3285–3286, Fevereiro 010.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. “Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 1, pp. 13-21, 2005.

BARBOSA, L. C. A. *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. 1º ed. Belo Horizonte, Brasil, UFV, 2008.

BARBUCCI, R. et al. “Fibroblast Cell Behavior on Bound and Adsorbed Fibronectin”. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, pp. 638-645, 2005.

BAUJARD-LAMOTTE, L. et al. “Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. Colloids and Surfaces” *B: Biointerfaces*, v. 63, n. 1 (Maio), pp. 129-137, 2008.

- BERRIER, A. L.; YAMADA, K. M. "Cell–Matrix Adhesion". *J Cell Physio*, v. 213, n. 3 (Dez), pp. 565-573, 2007.
- BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds". *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 10 (Out), pp. 546-554, 2012.
- BURGA, K. J. L.; PORTER, S.; KELLAMB, J. F. "Biomaterial developments for bone tissue engineering". *Biomaterials*, v. 29, n. 23 (Dez), pp. 2347-2359, 2000.
- CARVALHO, G. A., 1997. *Aspectos tecnológicos e mercadológicos da reciclagem de plásticos descartados de lanchonetes*. M.Sc. Universidade Federal do Rio de Janeiro: Instituto de Macromoléculas Eloísa Mano, Rio de Janeiro, Brasil.
- CHEN, F. et al. "Injectable boné". *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 41, n. 4 (Ago), pp. 240-243, 2003.
- CHEN, G.; USHIDAA, T.; TATEISHI, T. "Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering". *Materials Science and Engineering: C*, v. 17, n. 1-2 (Nov), pp. 63-69, 2001.
- CHEN, G.-Q.; WU, Q. "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials". *Biomaterials*, v. 26, n. 33 (Nov), p. 6565–6578, 2005.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. "Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation". *Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 6 (Nov), pp. 335-342, 1997.
- CHOI, S.; ZHANG, Y.; XIA, Y. "Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering: The Importance of Uniformity in Pore Size and Structure". *Langmuir*, v. 26, n. 24 (Nov), pp. 19001–19006, 2010.
- CHOU, Y.-F.; DUNN, J. C. Y.; WU, B. M. "In Vitro Response of MC3T3-E1 Preosteoblasts within Three-Dimensional Apatite-Coated PLGA Scaffolds". *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 75, n. 1 (Out), pp. 81-90, 2005.
- DEPAN, D. et al. "Organic/inorganic hybrid network structure nanocomposite scaffolds based on grafted chitosan for tissue engineering". *Acta Biomaterialia*, v. 7 (Fev), pp. 2163–2175, 2011.
- DHANDAYUTHAPANI, B. et al. "Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review". *International Journal of Polymer Science*, v. 2011, n. 1 (Jul), pp. 1-19, 2011.

- DONG, L. S.; YU, P. H.; CHEUNG, M. K. “Thermogravimetric Analysis of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)”. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 82, n. 1 (Out), pp. 90-98, 2001.
- DUTTA, R. C.; DUTTA, A. K. “Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications”. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4 (Ago), pp. 334–339, 2009.
- ESPOSITO, A. R. et al. “Citocompatibilidade de Blendas de Poli(p-dioxanona)/Poli(hidroxi butirato) (PPD/PHB) para Aplicações em Engenharia de Tecido Cartilaginoso”. *Polímeros*, v. 20, n. 5, pp. 383-388, 2010.
- FERREIRA, B. M. P. et al. “Haste intramedular polimérica bioreabsorvível (PLLA/PHBV) para uso na recuperação de fraturas ósseas”. *Polímeros*, v. 18, n. 4, pp. 312-319, 2008.
- FREIER, T. et al. “In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate)”. *Biomaterials*, v. 23, n. 13 (Jul), pp. 2649-2657, 2002.
- GARCÍA, A. J.; VEGA, M. D.; BOETTIGE, D. “Modulation of Cell Proliferation and Differentiation through Substrate-dependent Changes in Fibronectin Conformation”. *Molecular Biology of the Cell*, v. 10 (Mar), pp. 785–798, 1999.
- GIAMBLANCO, N. et al. “Fibronectin Conformation Switch Induced by Coadsorption with Human Serum Albumin”. *Langmuir*, v. 27, n. 1, pp. 312-319, 2011.
- GOLDSTEIN, J. et al. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. 3ª ed. Londres, Inglaterra, Springer London, 2003.
- GOLUB, E. E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. “The role of alkaline phosphatase in mineralization”. *Current Opinion in Orthopedics*, v. 18, n. 5 (Set), pp. 444-448, 2007.
- GRIFFITH, L. G. “Polymeric biomaterials”. *Acta Materialia*, v. 48, n. 1 (Jan), pp. 263-277, 2000.
- GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering”. *Cell Mater*, v. 20, n. 5 (Maio), pp. 1-16, 2003.
- HAJIALI, H. et al. “Mechanical Property of Poly (3-hydroxybutyrate)/Bioglass Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering”. *IFMBE Proceedings*, v. 31, pp. 1238-1241, 2010.

- HANCOCK, B. C.; MULLARNEY, M. P. "X-ray Microtomography of Solid Dosage Forms". *Pharmaceutical Technology*, pp. 92-100, 2005.
- HAYATI, A. N.; REZAIE, H. R.; HOSSEINALIPOUR, S. M. "Preparation of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering". *Materials Letters*, v. 65, n. 1, pp. 736-739, 2011.
- HOLLISTER, S. J. "Porous scaffold design for tissue engineering". *Nat Mater*, v. 4, n. 7 (Jul), p. 518-524, 2005.
- HUTMACHER, D. W. et al. "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective". *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 1 (Jun), pp. 245-260, 2007.
- ISHAUG, S. L. et al. "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds". *J Biomed Mater Res*, v. 36, n. 1 (Jul), p. 17-28, 1997.
- JING, X. et al. "Effects of Quenching Temperature and Time on Pore Diameter of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Porous Scaffolds and MC3T3-E1 Osteoblast Response to the Scaffolds". *Tsinghua Science and Technology*, v. 12, n. 4 (Ago), pp. 366-371, 2007.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11^a ed. Rio de Janeiro, Brasil, Guanabara Koogan, 2008.
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis". *Biomaterials*, v. 26, n. 27 (Set), pp. 5471-5491, 2005.
- KENESER, U. et al. "Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view". *Journal Cell. Mol. Med.*, v. 10, n. 1 (Mar), p. 7-19, 2006.
- KHALED, A.-R. A.; VAFAI, K. "The role of porous media in modeling flow and heat transfer in biological tissues". *International Journal of Heat and Mass Transfer*, v. 46, n. 26 (Dez), pp. 4989-5003, 2003.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. "Tissue Engineering". *Sciense*, v. 260 (Maio), pp. 920-926, 1993.

- LEE, S. Y. "Bacterial polyhydroxyalkanoates". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1 (Jan), pp. 1-14, 1996.
- LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. "Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology". *Biomacromolecules*, v. 6, n. 1 (Fev), pp. 1-8, 2005.
- LIU, X.; MA, P. X. "Polymeric scaffolds for bone tissue engineering". *Ann Biomed Eng.*, v. 32, n. 3 (Mar), pp. 477- 486, 2004.
- LIU, X.; SMITH, I. O.; MA, P. X. "Biomimetic Nanophase Materials to Promote New Tissue Formation for Tissue-Engineering Applications". In: PULEO, D. A.; BIZIOS, R. *Biological Interactions on Materials Surfaces*. 1ª ed. Cap. 14, USA, Springer US, 2009.
- LUNDBLAD, R. L. *Chemical reagents for protein modification*. 3ª ed. Flórida, USA, CRC Press, 2004.
- MA, P. X. "Biomimetic materials for tissue engineering". *Adv Drug Deliv Rev*, v. 60, n. 2 (Jan), pp. 184-198, 2008.
- MA, Z.; MAO, Z.; GAO, C.. "Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 60, n. 2 (Nov), pp. 137-157, 2007.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. "Metabolic engineering of poly(3 hydroxyalkanoates): From DNA to plastic". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 1 (Mar), pp. 21-53, 1999.
- MAGNUSSON, M. K.; MOSHER, D. F. "Fibronectin Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 18, n. 9 (Set), pp. 1363-1370, 1998.
- MARKS JR, S. C.; HERMEY, D. C. "The Structure and Development of Bone". In: BILEZIKIAN, J. P. *Principles of Bone Biology*. 2ª ed. Academic Press, v. 1, 2002.
- MEIGA, T. O., 2010. *Avaliação de Metodologias para Imobilização Covalente de Fibronectina em Arcabouços de Poli(3-hidroxitirato)*. M.Sc. PEMM/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- MEIGA, T. O. et al. "Resposta Celular à Imobilização de Fibronectina na Superfície de Arcabouços de Poli(3-hidroxitirato)". *11º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Campos do Jordão, São Paulo, Outubro 2011.

- MEIJER, G. J. et al. “Cell-Based Bone Tissue Engineering”. *Plos Medicine*, v. 4, n. 2 (Fev), pp. 260-264, 2007.
- MENDONÇA, R. H. et al. “Adsorção de Fibronectina a Arcabouços de Polihidroxibutirato Aplicáveis à Engenharia Óssea”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 2, pp. 143-148, 2009.
- MIKAMI, Y.; ASANO, M.; HONDA, M. J. “Bone Morphogenetic Protein 2 and Dexamethasone Synergistically Increase Alkaline Phosphatase Levels Through JAK/STAT Signaling in C3H10T1/2 Cells”. *Journal of Cell Physiology*, v. 223, pp. 123-133, 2010.
- MISRA, S. K. et al. “Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications”. *Biomaterials*, v. 31, n. 10 (Abr), pp. 2806-2815, 2010.
- MURPHY, C. M.; HAUGHB, M. G.; O'BRIEN, F. J. “The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering”. *Biomaterials*, v. 21, n. 3 (Jan), pp. 461-466, 2010.
- NAIK, S.; VENU GOPAL, S. K.; SOMAL, P. “Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: a metabolic approach”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 10 (Out), pp. 2307-2314, 2008.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5ª ed. Porto Alegre, Brasil, Artmed, 2011.
- NEREM, R. M.; SAMBANIS, A. “Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes”. *Tissue Engineering*, v. 1, n. 1, pp. 3-13, 1995.
- ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. “Biomateriais – fundamentos e aplicações”. pp. 239-249, Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica, 2006.
- PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8 (Out), pp. 839-845, 2007.
- PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. “Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, n. 3 (Mar), pp. 233-247, 2007.

- PUPPI, D. et al. "Polymeric materials for bone and cartilage repair". *Progress in Polymer Science*, v. 35, n. 4 (Abr), pp. 403-440, 2010.
- RAPPAPORT, C.; POOLE, J. P.; RAPPAPORT, H. P. "Studies on properties of surfaces required for growth of mammalian cells in synthetic médium". *Experimental Cell Research*, v. 20, n. 3 (Set), pp. 465-479, 1960.
- RICO, P. et. al. "Substrate-Induced Assembly of Fibronectin into Networks: Influence of Surface Chemistry and Effect on Osteoblast Adhesion". *TISSUE ENGINEERING: Part A*. v.15, n. 11, 2009.
- RUOSLAHT, E. "Fibronectin and Its Receptors". *Ann. Rev. Biochem.*, v. 57, pp. 375-413, 1988.
- RUPANI, A.; BALINT, R.; CARTMELL, S. H. "Osteoblasts and their applications in bone tissue engineering". *Cell Health and Cytoskeleton*, v. 4 (Maio), pp. 49-61, 2012.
- SANTOS JR, A. R.; WADA, M. L. F. "Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual". *Polímeros*, v. 17, n. 4 (Dez), pp. 308-317, 2007.
- SCHELLER, E. L.; KREBSBACH, P. H.; KOHN, D. H. "Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation". *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 36, n. 5 (Maio), pp. 368-389, 2009.
- SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A. G. "Biomimetic materials for tissue engineering". *Biomaterials*, v. 24, n. 24 (Nov), pp. 4353-4364, 2003.
- SILVA, F. C. F.; MENEZES, G. C. "Osteoblasts attachment and adhesion: how bone cells fit fibronectin-coated surfaces". *Materials Science and Engineering: C*, v. 24, n. 5 (Nov), pp. 637-641, 2004.
- STEVENS, M. M. "Biomaterials for bone tissue engineering". *Materialstoday*, v. 11, n. 5 (Maio), pp. 18-25, 2008.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters". *Progress in Polymer Science*, v. 25, n. 10 (Dez), pp. 1503-1555, 2000.
- SULTANA, N.; WANG, M. "Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds". *J Mater Sci: Mater Med*, v. 19, pp. 2555-2561, 2008.

- THIRÉ, R. M. S. M. et al. "Functionalizations of biodegradable polyester for tissue engineering applications". *Macromolecular Symposia*, v. 258, n. 1 (Nov), pp. 38-44, 2007.
- THIRÉ, R. M. S. M.; MEIGA, T. O.; ANDRADE, L. R. "Effect of surface treatment on the biocompatibility of phb films". *CD dos Anais do 4º COLAQB*, Caxambu, Minas Gerais, 2006.
- TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. "Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture". *Biotechnol Bioeng*, v. 103, n. 4 (Jul), pp. 655-663, 2009.
- VALLIÈRES, K. et al. "AFM Imaging of Immobilized Fibronectin: Does the Surface Conjugation Scheme Affect the Protein Orientation/Conformation?" *Langmuir*, v. 23, n. 19, pp. 9745-9751, 2007.
- VEGA, D.; MAALOUF, N. M.; SAKHAEE, K. "The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications". *J Clin Endocrinol Metab*, v. 92, n. 12 (Dez), pp. 4514-4521, 2007.
- VIEIRA, J. G. H. "Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática". *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 43, n. 6 (Dez), pp. 415-422, 1999.
- WHYTE, M. P. "Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization". *Endocr Rev*, v. 15, n. 4 (Ago), pp. 439-461, 1994.
- WILLIAMS, D. F. "The Williams Dictionary of Biomaterials". 1ª ed. Liverpool, Inglaterra, Liverpool University Press, 1999.
- WOODARD, J. R. et al. "The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity". *Biomaterials*, v. 28, n. 1, pp. 45-54, 2007.
- XIONG, J.; O'BRIEN, C. A. "Osteocyte RANKL: New Insights Into the Control of Bone Remodeling". *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 27, n. 3 (Mar), pp. 499-505, 2012.
- YANG, S. et al. "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I". *Traditional Factors. Tissue Engineering*, v. 7, n. 6, pp. 679-689, 2001.
- YUAN, Y. Y. et al. "Skeletal deterioration induced by RANKL infusion: a model for high-turnover bone disease". *Osteoporos Int*, v. 19, n. 5 (Maio), pp. 625-635, 2008.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. “Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existente”. *Química Nova*, v. 21, n. 6, pp. 787-793, 1998.