

INVESTIGAÇÃO MORFOLÓGICA SOBRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE
TENSÃO A ARCABOUÇOS FUNCIONALIZADOS DE POLI(3-
HIDROXBUTIRATO) NO CULTIVO DE CÉLULAS ÓSSEAS EM BIORREATOR

Taíla de Oliveira Meiga

Tese de doutorado 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 Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira

Thiré

Rio de Janeiro
Outubro de 2014

INVESTIGAÇÃO MORFOLÓGICA SOBRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE
TENSÃO A ARCABOUÇOS FUNCIONALIZADOS DE POLI(3-
HIDROXBUTIRATO) NO CULTIVO DE CÉLULAS ÓSSEAS EM BIORREATOR

Taíla de Oliveira Meiga

TESE 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 DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

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

Prof^ª. Marysilvia Ferreira da Costa, D.Sc.

Prof^ª. Glória Dulce de Almeida Soares, D.Sc.

Prof. Fernando Costa e Silva Filho, D.Sc.

Dr. Alexandre Malta Rossi, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

OUTUBRO DE 2014

Meiga, Taíla de Oliveira

Efeito da aplicação de tensões associada à funcionalização prévia das superfícies de arcabouço de poli(3-hidroxibutirato) no cultivo de células ósseas em biorreator / Taíla de Oliveira Meiga. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014.

XVIII, 110 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré
Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2014.

Referencias Bibliográficas: p. 96 - 110.

1. Arcabouço de PHB. 2. Fibronectina. 3. Osteoblasto.
4. Biorreator. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira II.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE,
Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III.
Titulo.

Dedico este trabalho à minha mãe Mariangela, por ser o meu grande exemplo de trabalho e conquista em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Mariangela, por ser, além da pessoa que me criou e educou com grande eficiência, o meu maior exemplo de luta, conquista e superação.

À minha avó Margarida e ao meu avô Ernani por todo carinho e ensinamento de uma vida de grandes experiências.

A toda a minha família que sempre esteve junta me ensinando o real sentido da palavra união, apoiando uns aos outros para um caminho de vitórias.

À Professora Rossana Mara da Silva Moreira Thiré pela orientação e pela amizade. Por desde os tempos de iniciação científica ter acreditado e investido em mim.

Ao Fernando Pereira de Almeida, técnico operador do microscópio confocal, do Centro Nacional de Bioimagem, por todas as horas de análise.

Aos alunos e professores da Universidade de Patras, na Grécia, pela boa recepção e amizade ao longo do um ano que passei com eles. Em especial ao Stergios Dermenoudis, por ser, além de amigo, um grande colaborador durante o processo de ajustes do biorreator.

Ao CNPq e ao PROCAD/CAPES pelo apoio financeiro

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

A todos os amigos que estiveram por perto, me ajudando de forma direta ou indireta. Com um agradecimento especial as grandes amigas Renata Nunes e Bruna Teixeira pelo auxílio profissional e psicológico durante todos os dias destes 4 anos de pesquisa.

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

INVESTIGAÇÃO MORFOLÓGICA SOBRE OS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE
TENSÃO A ARCABOUÇOS FUNCIONALIZADOS DE POLI(3-HIDROXBUTIRATO)
NO CULTIVO DE CÉLULAS ÓSSEAS EM BIORREATOR

Taíla de Oliveira Meiga

Outubro/2014

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Nesta pesquisa foi avaliado o efeito da aplicação de diferentes tensões mecânica sobre a cultura de células osteoblásticas, cultivadas em arcabouços de poli(3-hidroxi-butilato) - PHB recobertos ou não por fibronectina imobilizada covalentemente. Culturas de células osteoblásticas foram submetidas a fluxo de meio de cultura unidirecional de forma isolada, gerando tensão cisalhante unidirecional, ou de forma combinada com tensão de compressão intermitente direta, que gerou cisalhamento oscilatório. As respostas celulares foram analisadas por microscopia confocal, com marcação de núcleo e citoesqueleto de actina, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por coloração de cortes histológicos. A compressão intermitente mostrou ser uma etapa de grande importância no que diz respeito à proliferação celular, promovendo modificações morfológicas indicativas de diferenciação celular. Foi observada, ainda, a aceleração do processo migratório e colonização celular das regiões mais internas dos arcabouços. A funcionalização prévia com a fibronectina mostrou ser indispensável para o cultivo celular em arcabouços poliméricos, utilizando biorreator. Os arcabouços funcionalizados também se mostraram propícios à vascularização com células endoteliais.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.)

MORPHOLOGICAL INVESTIGATION OVER THE EFFECT OF APPLIED TENSION ON FUNCTIONALIZED SCAFFOLDS OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) ON BONE CELL CULTURES IN A BIOREACTOR.

Taíla de Oliveira Meiga

October/2014

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Department: Metallurgy and Materials Engineering

It was evaluated the effect of applied mechanical tensions on osteoblasts cell cultures, cultivated over poly(3-hydroxybutyrate) - PHB scaffolds recovered or not by covalent immobilized fibronectin. Osteoblasts cell cultures were exposed to culture medium perfusion flow on an isolated way, that generate unidirectional shear stress, or combined with intermittent direct tension compression, that generate oscillatory shear stress. The cellular response was analyzed by confocal microscopy, staining nucleus and actin cytoskeleton, by scanning electron microscopy (SEM) and by stained histological sections. The intermittent compression proved to be a very important step when considered cellular proliferation, which promote morphological changes that indicate cellular differentiation. Was, too, observed acceleration on migratory process and cellular colonization on more inner scaffolds areas. The previous functionalization with fibronectin proved to be a required step for cell culture on polymeric scaffolds, in bioreactor. Functionalized scaffolds seems to be favorable for vascularization with endothelial cells.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Engenharia tecidual	04
2.2. Biomateriais	06
2.2.1. Poli(3-hidroxi-butirato) - PHB	09
2.2.2. PHB na engenharia tecidual	11
2.3. Tecido ósseo	13
2.3.1. Osteoblasto	15
2.3.2. Osseointegração	16
2.4. Vascularização na engenharia tecidual	18
2.4.1. Tecido endotelial	20
2.5. Matriz extracelular	21
2.5.1. Fibronectina (FN)	22
2.6. Biorreatores para cultura dinâmica	27
CAPÍTULO III – OBJETIVO	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33

CAPÍTULO IV – METODOLOGIA	34
4.1. Produção dos arcabouços porosos de PHB.....	34
4.2. Imobilização da fibronectina.....	35
4.3. Caracterização morfológica dos arcabouços de PHB.....	36
4.4. Crescimento e manutenção da cultura celular.....	37
4.5. Cultivo celular.....	37
4.5.1. Cultivo celular estático.....	38
4.5.1.1. Linhagem endotelial - BCE-HT ⁺	39
4.5.1.2. Linhagem osteoblástica - MG 63.....	39
4.5.2. Cultivo celular dinâmico em biorreator - MG 63.....	40
4.6. Avaliação do cultivo celular.....	43
4.6.1. Microscopia confocal.....	44
4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	45
4.6.3. Cortes histológicos.....	45
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Análise morfológica dos arcabouços de PHB.....	48
5.2. Linhagem endotelial - BCE-HT ⁺ - Análise de proliferação e organização estrutural.....	51
5.3. Descrição do biorreator.....	55
5.4. Linhagem osteoblástica - MG 63.....	62
5.4.1. Análise de proliferação e organização estrutural citoesquelética (Microscopia confocal).....	62
5.4.2. Análise da morfologia e da distribuição celular nas superfícies (MEV).....	85

5.4.3. Análise migratória (Cortes histológicos).....	88
5.5. Considerações finais.....	91
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....	94
CAPÍTULO VII – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Estrutura molecular do monômero do poli(3-hidroxi- <i>butirato</i>), PHB.....	10
Figura 2.2 - Esquema representativo de um fêmur parcialmente seccionado (adaptado de http://www.3bscientific.com.br/shop/brasil/posters-grandes/estrutura-do-osso-v2050u,p16_61_0_0_2128_image_full.html).....	14
Figura 2.3 - (a) Estrutura linear da FN, (b) desenho esquemático da conformação do segmento tipo III e (b-e) sequência de desdobramento da estrutura terciária do segmento tipo III que contém o grupamento RGD (adaptado de KRAMMER <i>et al.</i> , 1999, LEAHY, 1997).....	24
Figura 2.4 - Representação da mudança de conformação de uma molécula de integrina (adaptado de ALBERTS <i>et al.</i> , 2010).....	25
Figura 2.5 - Representação do efeito secundário de expansão do volume na direção perpendicular à força aplicada gerado após compressão uniaxial (adaptado de BASSO e HEERSCHKE, 2002).....	28
Figura 2.6 - Representação do fluxo de meio de cultura (setas amarelas) gerado no interior de arcabouços porosos após compressão e descompressão (adaptado de CHUNQIU <i>et al.</i> , 2008).....	30
Figura 4.1 - Esquema de ativação de superfícies poliméricas por EDC/NHS (MEIGA, 2010).....	36
Figura 4.2 - Esquema dos sistemas de retirada de ar de dentro dos arcabouço de PHB por imposição de vácuo.....	38
Figura 4.3 - Fotografia do biorreator LAB-DC3A modificado.....	41

Figura 4.4 - Esquema de imposição de fluxo de perfusão (seta azul) e de compressão intermitente (seta vermelha) em arcabouços de PHB cultivados com células, no biorreator LAB-DC3A.....	42
Figura 4.5 - Esquema de obtenção dos cortes histológicos para análise de migração celular invasiva a rede de poros.....	47
Figura 5.1 – Imagens de MEV da superfície externa dos arcabouços, mostrando a estrutura de poros (a) e, em detalhe, a interconectividade entre os poros (b).....	49
Figura 5.2 – Imagens de MEV da seção transversal dos arcabouços, mostrando a manutenção da morfologia de superfície no interior da rede de poros (a) e, em detalhe, a interconexão dos poros no interior da estrutura (b).....	49
Figura 5.3 - Imagens de microscopia confocal de arcabouços PHB _H (a, c, e) e PHB _{FN} (b, d, f) após cultura de BCE-HT ⁺ , por 1 (a, b), 4 (c, d) e 7 (e, f) dias, e marcação pelos corante PI e FDA. Todas as barras de escala medem 100 µm.....	52
Figura 5.4 - Imagens de microscopia confocal de arcabouços PHB _H , após 7 dias de cultivo de BCE-HT ⁺ . Nas imagens (a), (b) e (c) está apresentada a evolução do eixo Z, seguindo esta ordem, da região mais interna para a mais externa. Em (d) está a magnificação de uma área de interesse. Todas as barras de escala medem 100 µm.....	54
Figura 5.5 - Imagens de microscopia confocal da seção transversal de arcabouços PHB _H (a) e PHB _{FN} (b), após 7 dias de cultivo de BCE-HT ⁺ . As duas barras de escala possuem 100 µm.....	55
Figura 5.6 – Primeira versão do biorreator LAB-DC3A. Em (a), o biorreator montado e fechado, com o sistema de fluxo acoplado a bomba de vácuo (mais detalhes em (b)). E, em (c), o sistema de compressão.....	56
Figura 5.7 – Versão modificada do biorreator LAB-DC3A. Em (a), o sistema de fluxo acoplado a bomba de vácuo. Em (b), o sistema de manutenção de gás CO ₂ durante a cultura dinâmica. E, em (c), o novo sistema de compressão.....	56
Figura 5.8 - Esquema do biorreator e seu sistema de alimentação antes (a) e após (b) modificações.....	57

Figura 5.9 – Novo sistema de tubos. Em (a) está o sistema de injeção de líquido e, em (b), o de eliminação. Em (c) está o dispositivo que liga o tubo alimentador ao coletor e que acopla o sistema de injeção de líquido e de eliminação. Em (d) e (e), está o sistema de imposição de pressão positiva e negativa.....	58
Figura 5.10 - Sistema de troca de gases desenvolvido para o biorreator.....	59
Figura 5.11 – Primeiro conjunto de tubos do sistema de compressão modificado.....	61
Figura 5.12 - Compartimento porta-amostras modificado.....	61
Figura 5.13 - Segundo conjunto de tubos do sistema de compressão modificado.....	61
Figura 5.14 - Imagens de microscopia confocal de arcabouços PHB _H (a, c) e PHB _{FN} (b, d) após 4 h de adesão estática, de células MG 63, em projeção 2D (a, b) e, a mesma imagem, em visão 3D (c, d). O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.....	63
Figura 5.15 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB _H (a, c) e PHB _{FN} (b, d), em diferentes ampliações, após 19 h de cultura estática de MG 63. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.....	65
Figura 5.16 - Imagens em plano 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB _H (a, c) e PHB _{FN} (b, d), em diferentes ampliações de cultura de MG 63, após 15 h F/C0. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.....	67
Figura 5.17 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal, mostrando os núcleos celulares de células MG 63, em arcabouços PHB _H (a, c) e PHB _{FN} (b, d), após 4 h de cultura estáticas (a, b) e 15 h F/C0 (c, d).....	68
Figura 5.18 - Imagens 3D de microscopia confocal de arcabouços PHB _H (a, c, d) e PHB _{FN} (b, d, 3), com cultura de MG 63, após 15 h F/C0. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. As setas amarelas indicam a direção de migração da célula ao seu lado.....	70
Figura 5.19 - Fotografia das extremidades onduladas das hastes metálicas que promoviam compressão sobre os arcabouços de PHB (b) e representação do arcabouço de PHB após compressão intermitente (c).....	72

Figura 5.20 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB _H (a, c) e PHB _{FN} (b, d), em diferentes ampliações de cultura de MG 63, após 15 h F/C2,5. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.....	73
Figura 5.21 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal, mostrando os núcleos celulares de células MG 63, em arcabouços PHB _H (a, c) e PHB _{FN} (b, d), após 19 h de cultura estática (a, b) e 15 h F/C2,5 (c, d).....	76
Figura 5.22 - Imagens 3D de microscopia confocal de arcabouços PHB _{FN} , com cultura de MG 63, após 15 h F/C2,5. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. As setas amarelas indicam pontos de interconexão de poros.....	79
Figura 5.23 - Imagens em projeção 2D (a) e 3D (b, c, d) de microscopia confocal de arcabouços PHB _{FN} , com cultura de MG 63, após 15 h F/C2,5. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. Números (1, 2, 3, 4) destacam as células a serem observadas, setas indicam a orientação do seu citoesqueleto e (*) indica área de interconexão entre poros.....	82
Figura 5.24 - Imagens projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB _{FN} , com cultura de MG 63, após 15 h F/C5. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares (ou cromossomos), em azul. As setas amarelas indicam aglomerações de cromossomos.....	83
Figura 5.25 - Imagem projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB _{FN} , com cultura de MG 63, após 15 h F/C2,5 + 9 h de cultura estática. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. As setas brancas indicam células com grande alteração morfológica.....	84
Figura 5.26 - Imagem de MEV de arcabouços PHB _{FN} após cultura estática de MG 63 por 4 h (a, c) e por 19 h (b, d).....	86
Figura 5.27 - Imagem de MEV de arcabouços PHB _{FN} após cultura dinâmica de MG 63 por 15 h F/C0 (a, c) e por 15 h F/C2,5 (b, d).....	87
Figura 5.28 - Imagens de MEV mostrando detalhamento da superfície de células MG 63 após cultura dinâmica por 15 h F/C0 (a) e por 15 h F/C2,5 (b).....	88

Figura 5.29 - Cortes histológicos longitudinais de arcabouços PHBFN após ensaios estáticos de 4h (a, b) e 19h (c, d) e dinâmicos F/C0 (e, f) e F/C2,5 (g, h).....90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1 - Características estruturais dos arcabouços de PHB, antes e depois da hidrólise, medidas por μ CT.....	50
---	----

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A constante busca do homem pelo aumento da qualidade e do tempo de vida tem gerado uma crescente necessidade de desenvolver alternativas para o reparo e/ou substituição de tecidos avariados por traumas, patologias ou envelhecimento natural.

Neste contexto de recuperação, surge a engenharia tecidual. A base da engenharia tecidual é a multidisciplinaridade, que integra conceitos de áreas como biologia, medicina e engenharia a fim de produzir novos substitutos biológicos (biomateriais) com a função de restaurar e/ou manter o funcionamento normal do tecido. Para o sucesso das técnicas de engenharia tecidual, é importante conhecer e obter o controle dos processos de crescimento, diferenciação e comportamento celular que ocorrem na superfície e no interior do biomaterial (YANG *et al.*, 2003). A engenharia tecidual, ou bioengenharia, encontra-se em desenvolvimento constante, já apresentando bons resultados, como em processos de regeneração de pele e de defeitos em alguns ossos curtos (HENCH *et al.*, 2012).

Os biomateriais regenerativos devem ser temporários, podendo ter origem natural ou sintética, tal como polímeros (naturais ou sintéticos), cerâmicas ou materiais compósitos (O'BRIEN, 2011). Devem ser estruturados na forma de arcabouços porosos tridimensionais (3D), biodegradáveis, biocompatíveis, biorreabsorvíveis e com boa interconexão dos poros (NADERI *et al.*, 2011). A presença de poros interconectados nos arcabouços é apontada como um fator decisivo na produção do biomaterial, uma vez que as células precisam estar em contato umas com as outras e trocar nutrientes e gases com o meio (HUTMACHER, 2000).

O emprego de materiais poliméricos como biomaterial tem se destacado devido às suas características de biodegradabilidade, atividade fisiológica (guiando a reestruturação tecidual) e facilidade de conformação em vários formatos como fibras, filamentos, filmes, etc. O poli(3-hidroxiбутirato), ou PHB, é um poliéster de origem natural, produzido por microorganismos como reserva energética e pertencente ao grupo dos polihidroxiácidoalcanoatos (SUDESH *et al.*, 2000). É considerado um material versátil devido à possibilidade de, a partir dele, serem fabricados materiais em diferentes modelos e com propriedades mecânicas e tempo de degradação ajustáveis por processos

de copolimerização ou adição de aditivos (ex: plastificantes) (KUNZE *et al.*, 2006). As estruturas tridimensionais finais produzidas pelo PHB são capazes de suportar o peso das células sem colapsar os poros e apresentam taxa de degradação lenta, o que permite o crescimento celular com remodelação do tecido (LENZ e MARCHESSAULT, 2005). Além de versatilidade, o PHB também apresenta características como biodegradabilidade, bioreabsorção e biocompatibilidade com uma série de grupos celulares (GRIFFITH, 2000), apesar de não possuir grupamentos sinalizadores para a adesão celular em sua superfície.

Vários métodos de modificação de superfícies têm sido propostos na literatura a fim de otimizar os processos de adesão, proliferação, migração e diferenciação celulares nas superfícies de arcabouços poliméricos porosos. A imobilização de biomoléculas é o procedimento mais utilizado atualmente para desenvolver materiais bioativos (VALLIÈRES *et al.*, 2007).

A fibronectina (FN) é uma das biomoléculas mais utilizadas em pesquisas de biomimetização devido à sua participação em diversos processos fisiológicos, como cicatrização, adesão celular, migração, espraiamento, diferenciação e proliferação (MARTINO *et al.*, 2009, VALLIÈRES *et al.*, 2007). Trata-se de uma proteína adesiva, que pode se apresentar sob duas diferentes formas no organismo: conformação globular, quando solubilizada no plasma sanguíneo, ou estrutura fibrilar insolúvel, quando presente na matriz extracelular. Ao longo da cadeia polipeptídica, a FN possui sequências adesivas de tripeptídeos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) e uma série de outros sítios sinérgicos (que podem ou não apresentar dependência da sequência adesiva RGD), que interagem com as integrinas celulares, promovendo a adesão celular inicial e ativando processos relacionados.

As integrinas são os principais receptores celulares de ligação à matriz extracelular. Trata-se de proteína transmembrana que atua como ligante entre a proteína de matriz (FN) e o citoesqueleto de actina. A célula, a partir da contração ou reorganização do seu citoesqueleto, é capaz de alterar a conformação da FN da matriz (MAGNUSSON e MOSHER, 1998). Da mesma forma, a disposição das proteínas de matriz pode influenciar o comportamento celular de proliferação, de sobrevivência, de polarização e de migração (ALBERTS *et al.*, 2010).

O uso de biorreatores nas pesquisas de engenharia tecidual ganhou grande destaque devido à sua capacidade de simular, *in vitro*, as variáveis presentes nos experimentos *in vivo*, de forma isolada e controlada. Com a possibilidade de avaliação

específica de cada variável, é possível adequar, gradativamente, o material testado a fim de se obter o melhor desempenho.

Para esta pesquisa, foram desenvolvidos arcabouços de poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) de alta porosidade e funcionalizados com fibronectina, criando-se um ambiente propício para o cultivo de células de linhagem osteoblástica (MG 63). Os arcabouços cultivados foram submetidos à cultura dinâmica com compressão intermitente e fluxo constante de meio de cultura, aplicados de forma combinada ou isolada, com o objetivo de avaliar, baseado na morfologia e na disposição celular, o quanto as variantes mecânicas influenciam no processo de colonização. A compressão intermitente mostrou ser uma etapa de grande importância no que diz respeito à proliferação celular, promovendo modificações morfológicas indicativas de diferenciação celular. Foi observada, ainda, a aceleração do processo migratório e a colonização celular das regiões mais internas dos arcabouços. A funcionalização prévia com a proteína mostrou ser indispensável para o cultivo celular em arcabouços poliméricos utilizando biorreator. Os arcabouços funcionalizados também se mostraram propícios à vascularização com células endoteliais.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados conceitos atuais sobre o tema abordado pela presente tese, como base em livros de referência e pesquisas recentemente desenvolvidas.

2.1. Engenharia tecidual

A engenharia tecidual, ou bioengenharia, é a ciência multidisciplinar que combina conhecimentos da biologia de sistemas, medicina, ciências e engenharia dos materiais para a produção de substitutos biológicos com objetivo de restaurar, manter ou melhorar funções teciduais degeneradas. Está baseada no desenvolvimento e na manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos crescidos em laboratório sobre um substrato (biomaterial), que terão a função de substituir ou apoiar a região a ser tratada (HENCH *et al.*, 2012).

Existem pelo menos três técnicas distintas que podem ser utilizadas, de forma isolada ou combinada, na criação de um novo tecido (LANGER e VACANTI, 1993, HENCH *et al.*, 2012):

- 1) Transplante de tecidos humanos cultivados fora do corpo diretamente para a região a ser reparada;
- 2) Utilização de moléculas sinalizadoras apropriadas, como fatores de crescimento, no auxílio à regeneração guiada por um biomaterial;
- 3) Transplantes de arcabouços porosos tridimensionais, com ou sem células.

As células utilizadas para o tratamento de regeneração de tecidos ou órgãos são obtidas pela dissociação do tecido de um doador, podendo ser específicas, células-tronco ou embrionárias. Podem ter origem alogênica (de indivíduos diferentes, porém da mesma espécie) ou autóloga (do próprio indivíduo) (HENCH *et al.*, 2012). A utilização de células de origem autóloga para, por exemplo, a regeneração de órgão, pode representar o fim das longas filas de espera para transplantes e o aumento da qualidade de vida dos pacientes, uma vez que, nos transplantes de órgãos realizados hoje, existe a necessidade de utilização vitalícia de medicamentos imunossupressivos, o

risco de rejeição, os altos custos dos fármacos e a possibilidade de desenvolvimento de certos tipos de câncer (ATALA, 2007, HENCH *et al.*, 2012).

O elemento chave para o sucesso da engenharia tecidual é a obtenção do controle dos processos de crescimento, diferenciação e comportamento celular quando em contato com a superfície do biomaterial (YANG *et al.*, 2003). Assim, a escolha do biomaterial e da técnica ideais para a terapia regenerativa desejada é de grande importância, pois o comportamento das células, quando cultivadas *in vitro*, nem sempre é o mesmo que *in vivo*. Por exemplo, células do fígado, que *in vivo* apresentam grande capacidade regenerativa, quando cultivadas e expandidas *in vitro*, podem apresentar comportamento mais complexo de crescimento e proliferação (ATALA, 2007).

O cultivo de células *in vitro*, na engenharia tecidual regenerativa de tecidos espessos, é realizado sobre um arcabouço tridimensional poroso, o qual deve funcionar como molde, tendo sua taxa de degradação controlada de forma equivalente aos processos de adesão, proliferação e crescimento celular (O'BRIEN, 2011, HENCH *et al.*, 2012). Muitos materiais promissores têm sido estudados para a produção desses arcabouços, como cerâmicos e polímeros sintéticos ou naturais (HENCH *et al.*, 2012).

Para a confecção de um arcabouço com bom desempenho na terapia regenerativa, devem ser consideradas algumas propriedades importantes:

- 1) Ser biocompatível e biodegradável, com taxa de degradação compatível com o crescimento e estruturação tecidual; seus produtos de degradação devem ser não-tóxicos e facilmente excretados pelas vias metabólicas normais (KIM *et al.*, 2012, O'BRIEN, 2011, HENCH *et al.*, 2012).

- 2) Apresentar propriedades mecânicas adequadas e, preferencialmente, compatíveis com o tecido que a ser regenerado. Ser capaz de suportar o crescimento das células, com manutenção das propriedades mecânicas pelo tempo em que forem requeridas. A estrutura do arcabouço também deve ser capaz de suportar o processo de esterilização ao qual for submetido (KIM *et al.*, 2012, O'BRIEN, 2011, HENCH *et al.*, 2012).

- 3) Apresentar uma rede de poros interconectados que permita, entre outros: a penetração celular, o crescimento interno de tecido e a formação de uma rede de vascularização que supra o interior dos arcabouços com nutrientes e lixivie os excretas metabólicos (KIM *et al.*, 2012, O'BRIEN, 2011, HENCH *et al.*, 2012).

4) Prover boa área superficial, com microestrutura (em escala nano e micrométrica) específica para adesão de cada determinado tipo celular e de metabólitos biológicos, como proteínas (KIM *et al.*, 2012, O'BRIEN, 2011).

5) Ser bioativo, com grupamentos químicos disponíveis para a interação celular primária e homogênea, guiando e mantendo o funcionamento celular normal (KIM *et al.*, 2012, O'BRIEN, 2011).

6) Ser produzido por técnica econômica, tornando-o aplicável aos seguros de saúde, e reproduzido em pequena escala para suprir necessidades imediatistas. O material final deve poder ser esterilizado e transportado, se mantendo estéril até a sua utilização (O'BRIEN, 2011).

Para o cultivo sobre arcabouços tridimensionais porosos e aplicação destes em terapias regenerativas, existem, basicamente, duas técnicas. Na primeira, o transplante é realizado com a formação de um tecido prematuro, ou seja, uma estrutura física de arcabouço/célula/tecido, de forma que o material seja capaz de suportar física e mecanicamente as células, desde o momento da inoculação até o transplante para o tecido hospedeiro avariado (BARBANTI *et al.*, 2005). Na segunda, o transplante é realizado após a formação do tecido maduro, ou seja, capaz de suportar o próprio peso. Este procedimento conta com a utilização de biorreatores (BARBANTI *et al.*, 2005), que são equipamentos que proporcionam o controle das condições hidrodinâmicas e bioquímicas do ambiente de cultivo *in vitro*, simulando algumas condições do ambiente *in vivo* (DERMENOUDIS e MISSIRLIS, 2010, FREED e VUNJAK-NOVAKOVIC, 1997). Biorreatores influenciam, portanto, a formação do novo tecido e a regeneração da região avariada. O grau de remodelação alcançado depende da necessidade anatômica e da fisiologia do local de implante (HARDIN-YOUNG *et al.*, 1997).

2.2. Biomateriais

A definição clássica de biomaterial diz que: *Biomaterial é qualquer substância (exceto drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada por qualquer período de tempo, como um todo ou parte de um sistema que trata, aumenta ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo* (BORETOS e EDEN, 1984).

Os biomateriais regenerativos devem ser temporários, podendo ter origem natural ou sintética, tal como poliméricos (naturais ou sintéticos), cerâmicos ou

materiais compósitos (O'BRIEN, 2011). Devem ser estruturados na forma de arcabouços porosos tridimensionais (3D), biodegradáveis, biocompatíveis, biorreabsorvíveis e com boa interconexão dos poros (NADERI *et al.*, 2011). Para ser biocompatível, o material deve apresentar teor de citotoxicidade nulo ou muito baixo, sem ter ação imunogênica (a menos que esta seja desejada), não deve ser mutagênico, nem trombogênico (VERT, 2007). Biocompatibilidade é um conceito específico para cada sistema, variando de acordo com as características intrínsecas do biomaterial, o ambiente a ser implantado e a tarefa proposta (HENCH *et al.*, 2012). A bioatividade é entendida como a capacidade de interação entre o biomaterial e o tecido receptor, de forma a promover a aceitação do implante por estimulação de processos físico-químicos inertes a sistemas biológicos. A bioatividade envolve também características química, física, físico-química, térmica e biológica; e considera, ainda, a facilidade de manejo do biomaterial, a possibilidade de esterilização, a estabilidade ao ser estocado, a taxa de degradação controlada e a biorreabsorção, ou seja, a capacidade de eliminação de produtos de degradação por rotas metabólicas do organismo (O'BRIEN, 2011, HENCH *et al.*, 2012, VERT, 2007). A interconectividade dos poros nos arcabouços é um fator decisivo na produção do biomaterial, uma vez que as células precisam estar em contato umas com as outras e trocar nutrientes e gases com o meio (HUTMACHER, 2000).

Assim, as características fisiológicas do ambiente onde o biomaterial é implantado direcionam o seu comportamento físico, químico e biológico ao longo do tempo. Em outras palavras, características como pH, presença de cátions e ânions, temperatura e ainda os polissacarídeos (como proteínas presente no plasma sanguíneo), bem como os tecidos ao redor do implante devem ser levados em conta quando sugerida a aplicação de um novo artifício terapêutico, já que influenciam diretamente a aceitação do biomaterial pelo organismo (VERT, 2007).

Quando transplantados para um organismo vivo, os biomateriais desencadeiam uma série de reações similares à cicatrização de uma lesão (HILBORN e BJURSTEN, 2007), envolvendo dois componentes essenciais: a reparação e a regeneração (HILDEBRAND *et al.*, 2005).

A reparação ocorre pela cicatrização. Nas áreas circunvizinhas ao biomaterial, é formado um tecido fibroso, com posterior fabricação de colágeno. Assim, toda a superfície do biomaterial recebe recobrimento por tecido conectivo à base de colágeno. Na regeneração, as células diferenciadas se organizam de forma adjacente ao

biomaterial, recompondo a morfologia e a funcionalidade do tecido hospedeiro (HENCH *et al.*, 2012).

A reparação é composta por quatro estágios que estão interligados, são eles: hemorragia, inflamação, proliferação e remodelação (HILBORN E BJURSTEN, 2007).

1) Hemorragia - Fase de extravasamento sanguíneo para a cavidade lesionada, causada pelo rompimento de veias. É importante para a formação do coágulo de fibrina que inicia o processo de selamento da lesão.

2) Inflamação - Fase essencial. Os efeitos de uma inflamação aguda são muito benéficos, promovendo o aumento da vascularização local. É caracterizada pela ativação das cascatas vascular e celular, que ocorrem em paralelo e são interligadas.

3) Proliferação - Inicia com a inflamação e envolve a regeneração de tecidos para substituir o que foi perdido.

4) Remodelação - Acontece pela ação de diferentes enzimas proteolíticas produzidas por células presentes na região lesionada. Tais enzimas têm como função remodelar as proteínas da matriz extracelular, de acordo com as necessidades mecânicas requeridas pelo tecido.

Para que o biomaterial transplantado seja aceito pelo organismo receptor, é importante que este seja bioativo, aceitando e/ou induzindo a adesão, o crescimento e a proliferação celular. Em um organismo vivo, o contato célula-matriz extracelular é específico, gerando sinais codificados pelo núcleo que irão assegurar que cada tipo celular sobreviva e prolifere somente quando em situação adequada (ALBERTS *et al.*, 2010). Para induzir a adesão celular de forma apropriada em sua superfície, o material pode ser confeccionado juntamente com moléculas de sinalização (O'BRIEN, 2011). Trata-se de técnica de modificação de superfície, que permite o ajuste de características e propriedades, melhorando o reconhecimento celular e possibilitando a aceitação do biomaterial pelo organismo. Nesse processo, deve ser considerada a interação de inúmeros e complexos fatores físicos, biológicos, clínicos e tecnológicos.

Os polímeros têm recebido cada vez mais atenção quando se trata de aplicações biomédicas, comumente designados de *bipolímeros*. Tal condição se deve às suas características físico-químicas e à sua versatilidade estrutural, que permitem adequá-los, em termos de propriedades, para cada aplicação específica. Os biopolímeros foram inicialmente compostos por materiais que provocavam uma reação mínima com o tecido hospedeiro. Atualmente, os biopolímeros devem interagir com o organismo, no sentido de guiar a interação material-tecido, a fim de restabelecer a funcionalidade, a

morfologia e a saúde dos tecidos tratados. A aplicação de polímeros como biomateriais para a engenharia tecidual tem como exemplo o preenchimento de partes alveolares, as restaurações dentárias e a confecção de dispositivos para a liberação controlada de drogas (HENCH *et al.*, 2012).

Na engenharia tecidual, os biomateriais poliméricos são divididos em duas classes distintas (ATALA, 2007): os materiais de origem natural, por exemplo o colágeno, o alginato e o poli(3-hidroxi-butirato) (PHB); os sintéticos, como poli (ácido láctico) (PLA) e a policaprolactona (PCL).

2.2.1. Poli(3-hidroxi-butirato) - PHB

Membro da família dos polihidroxi-alcanoatos, o poli(3-hidroxi-butirato), ou PHB, é um poliéster natural produzido em grande escala no citoplasma bacteriano, como reserva de energia, quando há baixa concentração de nutrientes essenciais a sua sobrevivência (como oxigênio e nitrogênio) e excesso de fontes de carbono (MASAELI *et al.*, 2012). Devido à sua origem natural, o PHB exibe características atrativas para aplicação em terapias de engenharia tecidual, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e não-toxicidade (HAZER *et al.*, 2012, MASAELI *et al.*, 2012). Quando implantado *in vivo*, provoca resposta inflamatória branda e degrada em ácido 3-hidroxi-butírico, que, por uma série de reações enzimáticas, o converte em ácido acético e acetil- CoA (KUNZE *et al.*, 2006, LENZ e MARCHESSAULT, 2005), passíveis de eliminação pelo organismo, a partir da atividade mitocondrial, como elemento reagente no Ciclo de Krebs (uma das etapas bioquímicas da respiração celular).

O monômero da cadeia do PHB é o (R)-3-hidroxi-butirato ((R)-3HB) (Figura 2.1) e sua estrutura isotática apresenta somente configuração do tipo R (LENZ e MARCHESSAULT, 2005).

O PHB possui grande potencial para aplicação na regeneração de tecidos, por ser um polímero versátil e biocompatível com grande diversidade de grupos celulares, como: pele, osso, cartilagem, bexiga e veias sanguíneas de pequeno diâmetro (MASAELI *et al.*, 2012). A sua versatilidade está relacionada à possibilidade de fabricação de materiais de diferentes *designs*, com propriedades mecânicas e tempo de degradação ajustáveis por processos simples de copolimerização ou aditivção (ex: plastificantes) (KUNZE *et al.*, 2006). As estruturas tridimensionais finais produzidas pelo PHB são capazes de suportar o peso das células e apresentam taxa de degradação

lenta, o que permite o crescimento celular com remodelação do tecido (LENZ e MARCHESSAULT, 2005).

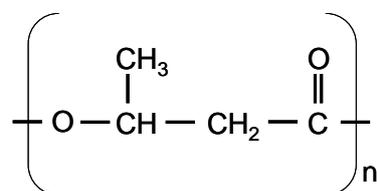


Figura 2.1- Estrutura molecular do monômero do poli(3-hidroxiбутирато), PHB.

Apesar das boas características apresentadas para aplicação do PHB em terapias regenerativas, existem algumas limitações de utilização, como, por exemplo, não fornecer grupamentos funcionais como sítios para a interação celular e apresentar caráter hidrofóbico. O equilíbrio entre hidrofobicidade e hidrofiliidade é um dos parâmetros mais importantes quando considerada a interação biomaterial-células/biomoléculas. Uma hidrofiliidade moderada é desejável, uma vez que, quando as paredes dos biomateriais são altamente hidrofóbicas, pode haver adsorção insuficiente de componentes de meio aquoso (como meio de cultura, sangue e suspensões celulares), desnaturação de proteínas adsorvidas (perda de bioatividade), baixa adesão/crescimento celular e distribuição celular desigual sobre as superfícies (MA *et al.*, 2007, OH e LEE, 2013, THIRÉ *et al.*, 2007). De outra parte, quando as superfícies se apresentam altamente hidrofílicas, pode haver repulsão ou inibição da adsorção de proteínas (MA *et al.*, 2007).

A performance do arcabouço de PHB como biomaterial regenerativo pode ser aperfeiçoada por processos de modificações de superfícies, como: tratamentos físico-químicos, para exposição de grupamentos oxigenados (aumento de hidrofiliidade e biocompatibilidade), ou imobilização de biomoléculas, principalmente proteínas (aumento de biocompatibilidade e bioatividade) (HAZER *et al.*, 2012; MOLINA *et al.*, 2011; THIRÉ *et al.*, 2007).

A biodegradação de um biomaterial de PHB está relacionada tanto à sua composição quanto às características do ambiente que o recebe, a saber: o local do implante, a solicitação mecânica exigida, o pH e a temperatura do ambiente, o peso molecular e a distribuição do polímero, a composição química do material, o grau de cristalinidade e características morfológicas (como tamanho do suporte, porosidade, relevo e carga de superfície) (MIDDLETON e TIPTON, 2000). O efeito provocado pela

localização do implante, por exemplo, está relacionado ao aporte vascular presente no local e à solicitação mecânica, que são considerados como aceleradores de degradação (HOLLINGER e BATTISTONE, 1986). O método utilizado para a esterilização também deve ser considerado como fator de alteração da taxa de degradação em polímeros, podendo comprometer a estrutura e as propriedades físicas do biomaterial (BIZIOS *et al.*, 2002).

FREIER *et al.* (2002) estudaram a degradação *in vitro* de filmes de PHB em solução tampão fosfato com pH 7,4 e temperatura de 37°C. Foi observada contínua diminuição do peso molecular com leve aceleração após 80 dias. Os autores concluíram que a meia vida do PHB a 37°C foi de 56 semanas, ou seja, aproximadamente 1 ano. Quando a degradação é avaliada *in vivo*, deve ser levada em consideração a participação de enzimas no processo de hidrólise do PHB. Assim, para cada diferente região no organismo onde o material será implantando, há diferente tempo de degradação. No trabalho de FREIER *et al.* (2002), o material à base de PHB foi implantado no sistema gastrointestinal de ratos e degradado completamente após 26 semanas.

2.2.2. PHB na engenharia tecidual

O comportamento de um biomaterial é basicamente controlado pela estrutura e composição da sua interface, que entra em contato com o as células, resultando na aceitação ou rejeição por parte do organismo (HENCH *et al.*, 2012).

A organização estrutural das moléculas envolvidas no processo de adesão celular, em superfície de PHB, foi estudado por NEBE *et al.* (2001), utilizando células ósseas e epiteliais. Em ambas as células, foram adotadas morfologias arredondadas, com baixo índice de espraiamento. A organização de integrinas e vinculinas, quando em processo de adesão focal, foi comprometida, não seguindo o padrão normal. Assim, a disposição dos filamentos de actina, no citoesqueleto, e das fibras de fibronectina, na matriz extracelular, também foi alterada. Considerando o fato desses componentes estarem relacionados à fisiologia celular, sendo de grande importância a sua manutenção da sua organização estrutural, a promoção de modificações de superfície ganha grande importância no processo de desenvolvimento de biomateriais de PHB.

Modificações de superfícies de natureza físico-química ou biológica, promovidas em biomateriais de PHB, aumentam a biocompatibilidade quando em contato com células, via testes *in vitro* ou transplantes (*in vitro*). Dentre os efeitos

diretos causados por tais modificações, estão: redução do tempo de carregamento após cirurgia, aceleração do crescimento e da maturação celular, aumento da estabilidade primária, garantia do sucesso dos implantes mesmo quando instalados em regiões muito avariadas (menor quantidade de tecido), atração de células e proteínas de ligação, obtenção do crescimento celular diretamente na superfície do implante, com maior área possível de integração e menor interposição de camadas proteicas amorfas (BRANDÃO *et al.*, 2010).

THIRÉ *et al.* (2006) estudaram o efeito da hidrólise alcalina na biocompatibilidade de filmes de PHB por dois diferentes tempos: 45 e 90 minutos. Nos dois tempos, foi detectado o aumento da hidrofiliabilidade e da rugosidade das superfícies tratadas. Testes *in vitro* com osteoblastos melhoraram a resposta celular de adesão e espraiamento nas amostras hidrolisadas. Considerando os resultados obtidos para resposta celular e degradação do material, o tempo de hidrólise de 45 minutos foi considerado ideal. Durante o processo de hidrólise, há quebra do grupamento éster das cadeias poliméricas, expondo grupamentos oxigenados (hidroxílicos e carboxílicos). Os grupamentos oxigenados expostos nas superfícies de biomateriais funcionam como sítios para o ancoramento de células e biomoléculas, aumentando a hidrofiliabilidade e a biocompatibilidade das paredes (MOLINA *et al.*, 2011).

Por meio de processos de aminólise, THIRÉ *et al.* (2007) conseguiram reagir grupamentos amino da etilenodiamina com grupamentos ésteres do PHB, expondo grupos $-CONH$ e/ou $-CONH_2$ nas superfícies tratadas. Avaliações da biocompatibilidade do tratamento por culturas *in vitro* mostraram maior adesão e espraiamento de condrócitos humanos nas superfícies dos filmes modificados. MENDONÇA (2008) também realizou aminólise na superfície de arcabouços de PHB, na sequência, a recobriu com quitosana e adsorveu a proteína adesiva fibronectina, encontrando maior biocompatibilidade no cultivo de células ósseas humanas. O recobrimento prévio das superfícies dos biomateriais com proteínas de matriz extracelular aumenta, significativamente, a resposta celular durante o processo de cultivo (DÅNMARK *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2005).

A fabricação do arcabouço de PHB junto à hidroxiapatita promoveu melhora na biocompatibilidade do material quando submetido a culturas de osteoblastos, aumentando os índices de crescimento e proliferação celular. Porém, quando comparadas as propriedades mecânicas (ex: módulo de elasticidade e resistência à tração) do arcabouço de PHB puro e de PHB com hidroxiapatita, após a cultura celular,

a presença de hidroxiapatita mostra maior comprometimento das propriedades em menor espaço de tempo (MISRA *et al.*, 2006).

A biocompatibilidade de arcabouços de PHB foi testada *in vivo*, por 7 dias, em abdômen de ratos (MISRA *et al.*, 2010). Após esse tempo, os arcabouços se mostraram capazes de manter a morfologia da estrutura porosa, permitindo a invasão de fibroblastos e macrófagos. Também foi observado o início da estruturação de rede de capilares, sem nenhum efeito tóxico ou inflamatório.

RENTSH *et al.* (2010) testaram arcabouços de PHB recoberto com colágeno para o cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana. A estrutura porosa interconectada permitiu a migração, proliferação e diferenciação celular em testes *in vitro*. Em testes sequenciais *in vivo*, os autores semearam as mesmas célula-tronco nos arcabouços de PHB e as implantaram em subcutâneo de ratos, detectando, após seis semanas, a presença de marcadores de linhagem osteogênica.

2.3. Tecido ósseo

O tecido ósseo apresenta alto grau de rigidez e resistência à tensão como resultado da interação entre os componentes orgânicos e minerais da matriz. Participa de processo constante de remodelação, produzindo osso novo no lugar do osso velho que é degradado. Estima-se que 10-15% dos ossos em todo o corpo são substituídos por ossos novos a cada ano (ETHIER e SIMMONS, 2013).

Cada osso individual deve ser considerado como um órgão, pois é formado por vários tecidos diferentes que trabalham juntos, como: tecido ósseo, cartilagem, tecido conjuntivo denso, epitélio, vários tecidos formadores de sangue, tecido adiposo e tecido nervoso. O osso é responsável por diversas funções, como sustentação de tecidos moles, proteção dos órgãos internos, tração dos músculos esqueléticos, homeostasia mineral, produção de células sanguíneas e armazenamento de triglicérides.

Nos seres humanos, de acordo com a forma e localização, os ossos podem ser classificados em: longos, curtos, planos, irregulares e sesamóides. No tecido ósseo existem quatro tipos de células: células osteogênicas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A matriz extracelular do tecido ósseo é composta por 90% de proteínas colagenosas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e de 10% de proteínas não-colagenosas (NCP), todas sintetizadas pelos osteoblastos e a maioria envolvida nos processos de adesão. Dentre as proteínas não-colagenosas, constam: 20% de

osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas, 10% de proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, factores de crescimento, proteínas morfogenéticas ósseas etc (ANSELME, 2000).

A Figura 2.2 ilustra a estrutura externa e interna de um osso longo, representado pelo fêmur. A estrutura externa se divide em diáfise, metáfise e epífise, com um revestimento de cartilagem nas extremidades epifisárias. A estrutura interna é composta por osso trabecular e osso compacto, com a cavidade medular. Revestindo o osso compacto interna e externamente, estão o endóstio e o perióstio, respectivamente. O osso tem ainda uma rede de vasos sanguíneos para o aporte de nutrientes, que passam por dentro da rede de canais de Volkmann e de Havers.

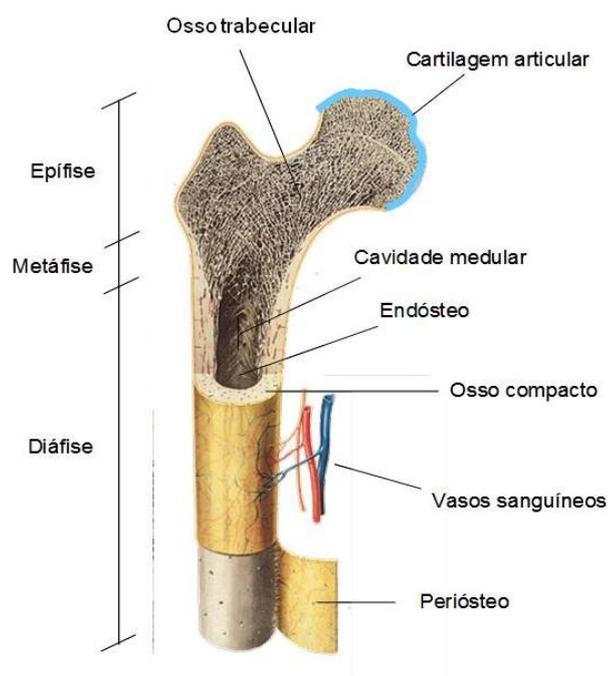


Figura 2.2 - Esquema representativo de um fêmur parcialmente seccionado (adaptado de http://www.3bscientific.com.br/shop/brasil/posters-grandes/estrutura-do-osso-v2050u,p16_61_0_0_2128_image_full.html).

O processo de formação do osso se chama *ossificação*. No início da vida embrionária, o ser humano possui esqueleto formado por tecido conjuntivo fibroso, que se assemelha ao formato ósseo e serve como molde para o processo de ossificação, que se inicia durante a sexta ou sétima semana de vida. O processo de ossificação (osteogênese) pode ser de duas formas distintas, intramembranosa (formado diretamente sobre o molde de tecido conjuntivo fibroso) ou endocondral (formado em molde de

cartilagem hialina). Independentemente do processo de osteogênese seguido, o osso maduro não apresenta diferença nas suas propriedades estruturais.

Quando o tecido ósseo sofre pequena lesão, é capaz de se regenerar sem nenhum auxílio externo, produzindo novo osso tão forte quanto o anterior e sem deixar qualquer cicatriz. Quando se trata de fratura mais complexa, como desalinhamento das partes fraturadas, é necessário realinhamento anatômico e imobilização de fragmentos ósseos para a recuperação das funções teciduais. Contudo, um defeito ainda maior, causado por trauma ou doença, não é capaz de ser regenerado pelo organismo sem o auxílio de implante.

O osso é um tecido dinâmico, todas as células que o compõem respondem a estímulos do seu microambiente, regulando o crescimento, a manutenção e o reparo do tecido. As células ósseas respondem a fatores mecânicos locais, como tensão, pressão e fluxo, produzindo novo osso e reabsorvendo o antigo (ETHIER e SIMMONS, 2013). De acordo com a Lei de Wolff, o osso é funcionalmente adaptável, ou seja, o formato e a estrutura dos ossos em crescimento, ou em processo de remodelação, dependem das forças de tensão e deformação às quais são submetidos. No osso trabecular, as tensões impostas durante o processo de mineralização são responsáveis por determinar sua estrutura final. A ausência de carregamento está relacionada à diminuição de formação óssea e de conteúdo mineral e à diminuição na produção e síntese de proteínas de matriz extracelular óssea (DUCAN e TURNER, 1995). De todo modo, a maquinaria de resposta celular aos estímulos externos ainda não é bem compreendida (ETHIER e SIMMONS, 2013).

2.3.1. Osteoblasto

Os osteoblastos se originam da diferenciação das células osteoprogenitoras. Trata-se de células cúbicas ou cilíndricas, localizadas na superfície do tecido ósseo, com prolongamentos citoplasmáticos que se intercomunicam com os prolongamentos do osteoblasto vizinho. São capazes de detectar sinais químicos e físicos oriundos de tensões mecânicas aplicadas a superfícies ósseas, traduzindo-os em formação óssea específica (MATSUGAKI *et al.*, 20013).

A matriz secretada pelos osteoblastos que ainda não foi calcificada é denominada *osteóide* e é observada em imagens de microscopia ótica como uma região mais clara localizada entre o tecido ósseo e os osteoblastos.

Os osteoblastos expressam receptores para diversos hormônios que estão envolvidos na sua regulação e diferenciação, como os hormônios da paratireóide, o estrogênio e os glucocorticóides (MEYER e WIESMANN, 2006). Sua atividade é estimulada pela presença de alguns fatores de formação óssea, como a fosfatase alcalina, e pode ser determinada pela síntese osteoblástica de proteínas colagenosas e não-colagenosas de matriz óssea (ANSELME, 2000, MEYER e WIESMANN, 2006, VIEIRA, 1999).

A ação dos osteoblastos está diretamente ligada à ação dos osteoclastos. A atividade coordenada dessas células promove o processo de remodelação óssea e de controle dos níveis de Ca^{2+} no sangue. O hormônio mais importante nesse processo é o paratiróideo, que ativa e recruta os osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea e a liberação de íons Ca^{2+} na corrente sanguínea. Em contraposição, quando os níveis de Ca^{2+} no sangue atingem níveis muito altos, é secretado o hormônio calcitonina. A calcitonina inibe a ação dos osteoclastos pela ativação dos osteoblastos, promovendo formação óssea e consequente diminuição de íons Ca^{2+} na corrente sanguínea (TORTORA E GRABOWSKI, 2000).

2.3.2. Osseointegração

O processo de osseointegração foi definido por BRÅNEMARK *et al.* (1977) como “uma ligação direta, estrutural e funcional entre osso vital organizado e a superfície de um implante sujeito à cargas funcionais”. A partir de estudos utilizando microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a formação de uma camada de lipoproteínas entre o implante e o tecido ósseo. ZARB *et al.* (1991) desenvolveram, então, o conceito bioquímico a respeito do processo de osseointegração que o define como “o processo onde uma fixação rígida e assintomática de materiais aloplásticos no osso é obtida e mantida durante o carregamento funcional”.

A osseointegração não deve ser entendida como um fenômeno que ocorre de forma isolada, mas sim como dependente de outros processos, como a osteoindução e a osteocondução (ALBREKTSSON e JOHANSSON, 2001). A osteoindução é a capacidade do material de induzir células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblasto. A osteocondução é a característica atribuída aos materiais capazes de orientar a proliferação de células osteoprogenitoras já existentes, permitindo

a aposição de tecido ósseo no entorno do material (ALBREKTSSON e JOHANSSON, 2001).

O primeiro contato entre o material implantado e o organismo promove resposta inflamatória com formação do coágulo sanguíneo, que servirá como suporte para o crescimento do tecido de reparação. É promovido o aporte sanguíneo pela presença de capilares e, por estes, são liberados fatores de crescimento que estimularão o recrutamento de células mesenquimais e células de defesa, como neutrófilos e macrófagos. As células de defesa desfazem o coágulo, enquanto as células mesenquimais, diferenciadas em osteoblastos, formam a matriz osteóide com subsequente mineralização. O equilíbrio entre a formação de tecidos moles e a formação do novo osso é o que dita o sucesso ou não da reparação (MENDONÇA *et al.*, 2008).

A osseointegração bem sucedida está relacionada a diversos fatores, desde o material a ser implantado até a região que receberá o implante, como os apresentados a seguir (MENDONÇA *et al.*, 2008):

- 1) Biocompatibilidade do material;
- 2) Desenho do material;
- 3) Características de superfície (topografia, química, etc.);
- 4) Saúde do local de regeneração (quantidade óssea disponível);
- 5) Técnica cirúrgica utilizada;
- 6) Influências externas (aplicação de carregamento antes do tempo, alterações de pH, saturação de O₂, etc.).

Dados como o quanto da superfície do material entra em contato direto com o osso, a velocidade de aposição óssea bem como a natureza mecânica da ligação existente entre osso-implante são influenciados pela natureza da superfície do implante (MENDONÇA *et al.*, 2008). As propriedades físicas e químicas das superfícies têm influência direta na osseointegração, uma vez que a resposta celular depende da topografia (necessário um mínimo de rugosidade), da energia de superfície e das cargas presentes (MOLINA *et al.*, 2011). Em testes de cultivo celular, osteoblastos humanos já mostraram aderir melhor em superfícies de biomateriais com recobrimento de fibronectina e, em menor intensidade, com recobrimento de laminina ou colágeno tipo V (ANSELME, 2000). Assim, os tratamentos de superfície objetivando a osseointegração devem, dentre outros: obter o crescimento ósseo diretamente na superfície do implante, elevar ao máximo a área possível de osseointegração, promover contato osso-implante sem a interposição de camadas protéicas amorfas, atrair células

osteoprogenitoras e proteínas de ligação específicas para células osteogênicas (BRANDÃO *et.al.*, 2010).

Para o sucesso da terapia regenerativa, também é importante considerar a carga mecânica que o arcabouço deve suportar, pois quando a transferência é muito alta ou muito baixa pode haver reabsorção óssea (MULLENDER e HUISKES, 1995), remodelação de matriz extracelular ou ineficiência de transporte de nutrientes para dentro dos tecidos (CHUNQIU *et al.*, 2008). Em ossos que recebem baixa intensidade de cargas, como no caso dos ossos curtos, a terapia regenerativa tende à utilização de polímeros bioreabsorvíveis (biopolímeros) com propriedades físico-químicas adequadas para cada situação. Na bioengenharia óssea, é importante que o biomaterial seja capaz de permitir o rápido acesso e a migração das células osteoprogenitoras para a região do tecido lesionado, recrutando fatores de bioativação (SHIN *et al.*, 2003). Diversas proteínas de matriz extracelular, como osteopontina, trombospondina e sialoproteínas ósseas, atuam de forma fundamental, induzindo a migração e a proliferação das células, a deposição de matriz extracelular e a mineralização (SHIN *et al.*, 2003).

2.4. Vascularização na engenharia tecidual

Ainda que com superfícies ativadas por conjugação de biomoléculas para adesão e recrutamento celular, os arcabouços utilizados na engenharia tecidual enfrentam outro problema: o limite de difusão de meio de cultura para dentro da rede de poros a uma profundidade máxima de 200 a 300 μm (FOLKMAN e HOCHBERG, 1973, LASCHKE *et al.*, 2006, NAING e WILLIAMS, 2011). Esse limite tem sido indicado como a principal restrição para a aplicação de biomateriais em processos regenerativos, uma vez que compromete o processo de crescimento de órgãos e tecidos complexos (estrutura espessa) pela ausência do aporte de nutrientes/oxigênio e lixiviação de excretas, ambos indispensáveis para a manutenção celular (LASCHKE *et al.*, 2006). Quando um biomaterial com células é transplantado para o organismo hospedeiro, há ativação da cascata inflamatória, resultando em invasão por vasos sanguíneos. Porém essa inflamação não invade a rede de poros mais do que alguns poucos micrômetros por dia. Ou seja, para a total vascularização de um biomaterial da ordem de milímetros, são necessárias algumas semanas. Tal condição leva à morte de muitas células e, conseqüentemente, ao insucesso do implante (ROUWKEMA *et al.*, 2008).

No caso de arcabouços para regeneração óssea, a formação da nova rede de capilares está diretamente relacionada ao processo de osteogênese (intramembranosa ou endocondral). Na osteogênese endocondral, o molde de cartilagem (avascular) é substituído por tecido ósseo altamente vascularizado, enquanto na intramembranosa a diferenciação de células osteoprogenitoras para osteoblastos é realizada durante extensa vascularização. Deve-se considerar, ainda, uma alta atividade angiogênica durante a formação de calos fibrosos para o reparo de fraturas (CARANO e FILVAROFF, 2003). PERYN (2011) relatou que, em terapias de regeneração óssea, quando não é possível estruturar uma rede de capilares para dentro dos arcabouços, o crescimento ósseo restringe-se somente às áreas externas. Por conta dessa limitação, é extremamente importante que o arcabouço seja capaz de suportar a estruturação de uma rede de capilares por dentro da sua matriz de poros, permitindo o aporte de nutrientes para todas as regiões por onde passar, possibilitando invasão celular (LASCHKE *et al.*, 2006, SILVESTRE *et al.*, 2008).

Angiogênese é o processo de formação de novos capilares sanguíneos, por brotamento, utilizando-se os vasos sanguíneos pré-existentes como base. Dentro do organismo, o início da angiogênese se dá pela ativação das células endoteliais. Essas, por sua vez, degradam a membrana basal local, pela expressão e liberação de metaloproteinases de matriz extracelular, num processo semelhante ao que ocorre na vasodilatação. Em seguida, as células endoteliais migram para a região aberta pelo processo de degradação, começando um tipo de “brotamento capilar”. Novas células endoteliais são recrutadas para a nova região, alongado o novo capilar formado. Para a estabilização das paredes do novo capilar, são recrutados diferentes tipos celulares (incluindo as musculares lisas e os fibroblastos), bem como a produção de compostos da matriz extracelular. Todas as etapas descritas referentes ao processo de angiogênese são diretamente reguladas pela interação de fatores solúveis distintos, como citocinas, e fatores de crescimento (LASCHKE *et al.*, 2006, MOON e WEST, 2008, NADERI *et al.*, 2011, SILVESTRE *et al.*, 2008).

As células endoteliais se encontram intimamente envolvidas nos processos de vascularização, revestindo a parede interior de todos os vasos sanguíneos (LASCHKE *et al.*, 2006, LEE e MOONEY, 2001, NADERI *et al.*, 2011, SUMPIO *et al.*, 2002). Várias abordagens têm sido propostas para se obter a estruturação de rede de capilares dentro de arcabouço regenerativo, tais como: moldagem da microestrutura, utilização de

fatores pró-angiogênicos, pré-vascularização *in vivo* e pré-vascularização *in vitro* (NADERI *et al.*, 2011, ROUWKEMA *et al.*, 2008).

2.4.1. Tecido endotelial

As células endoteliais são as responsáveis por revestir internamente as paredes de todos os vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares), formando uma barreira anticoagulante e semipermeável entre o sangue e os vasos (CARDOSO *et al.*, 1994, NADERI *et al.*, 2011, SUMPIO *et al.*, 2002). O endotélio está presente em todos os tecidos e órgãos do corpo, sendo considerado o maior de todos os sistemas. Num indivíduo adulto, consiste em aproximadamente 1×10^{13} células que, juntas, formam quase 1 Kg de "órgão" (SUMPIO *et al.*, 2002).

As referidas células estão envolvidas em atividades metabólicas, neuroendócrinas, proliferativas e imunológicas. Reagem a partir de estimulação física e química, proveniente do fluxo sanguíneo, e apresentam funções vasomotora (regula o calibre do vaso), homeostática (equilibra coagulação e fibrinólise), de reparo tecidual e de regulação de respostas imunitárias e inflamatórias. Essas células produzem e secretam (localmente) um grande número de componentes metabólicos ativos, com ação direta nos tecidos vizinhos (CARDOSO *et al.*, 1994, SUMPIO *et al.*, 2002).

A técnica de pré-vascularização *in vitro* combina, em mesmo arcabouço, células endoteliais, com outra linhagem celular, para a formação de novo tecido com rede vascular pré-estabelecida. Tal estratégia ganha cada vez mais interesse a partir do fato de que células endoteliais, quando cultivadas em arcabouços porosos, *in vitro*, sob condições apropriadas, são capazes de formar estrutura vasculares. Assim, as células endoteliais podem ser incluídas em culturas em andamento, *in vitro*, resultando na estruturação de uma rede de capilares para dentro da rede de poros. Essa nova estrutura de arcabouço + células, após transplantada para o tecido a ser tratado, reduz o tempo total para a vascularização, uma vez que os vasos adjacentes locais somente necessitam se unir aos vasos já estruturados (ROUWKEMA *et al.*, 2008). Para que essa técnica seja bem sucedida, é muito importante combinar a origem das células endoteliais (pele, cordão umbilical, capilares), com a origem das células que já estão em cultura.

Na pré-vascularização *in vitro*, é possível estimular e guiar as células endoteliais para sua estruturação em forma de tubos, posteriormente estabilizados, para dentro dos arcabouços regenerativos. Esse estímulo às células pode ser dado pela utilização de

fatores pró-angiogênicos ou de sequências peptídicas, como, por exemplo, os sítios PHSRN (LASCHKE *et al.*, 2006, SAGNELLA *et al.*, 2005) e WQPPRARI (MARTINO *et al.*, 2009), presentes na cadeia da fibronectina, glicoproteína de matriz extracelular (melhor discutida no item 2.5.1).

Todas as etapas envolvidas no processo de interação célula endotelial-arca-bouço, da adesão celular até a organização de capilares, estão sob investigação com o objetivo de determinar o nível ótimo, de cada etapa, para a promoção de angiogênese.

2.5. Matriz extracelular

A matriz extracelular é componente de grande parte da região extracelular do tecido. Desempenha papel não só passivo, de sustentação das células, mas também ativo, na regulação do comportamento celular e na influência ao desenvolvimento, à migração, à proliferação, à forma bem como à função celular (ALBERTS *et al.*, 2010). A matriz extracelular é constituída por macromoléculas produzidas localmente por suas próprias células. As células responsáveis pela produção da matriz são os fibroblastos ou células da família (no caso dos ossos, são os osteoblastos). Tais células atuam ainda na determinação da orientação da matriz, a partir da orientação do seu citoesqueleto.

As duas principais classes de macromoléculas presentes na matriz são os polissacarídeos de glicosaminoglicanos (quase sempre ligados covalentemente às proteínas, na forma de proteoglicanos) e as proteínas fibrosas (como colágenos, fibronectinas, elastina e lamininas). Os proteoglicanos formam uma massa gelatinosa resistente à compressão, permitindo a rápida difusão de nutrientes (metabólitos e hormônios do sangue para as células); são também encontrados na superfície das células, atuando como correceptores celulares a proteínas-sinal secretadas. As proteínas fibrosas fortalecem e auxiliam a organização da matriz (ALBERTS *et al.*, 2010). A quantidade relativa de cada componente e a sua disposição na matriz é determinada de acordo com as necessidades funcionais de cada tecido formado.

As diferentes proteínas fibrosas formadoras da matriz apresentam funções específicas: as diferentes famílias de colágenos encontradas são responsáveis por fornecer suporte e resistência mecânica e por fenômenos de adesão e diferenciação celular. A elastina forma rede de fibras e camadas que pode ser estendida e retraída, conferindo elasticidade à matriz (seu movimento é restringido pelo entrelaçamento com fibras colagenosas). As lamininas funcionam como filtros reguladores da passagem de

proteínas, como barreiras de contato para muitos tipos celulares (exceto macrófagos, linfócitos e células nervosas) e exercem, também, papel crucial na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular. A fibronectina, também presente no plasma sanguíneo de mamíferos, é a proteína mais abundante na matriz e está relacionada tanto aos processos da adesão celular, por ter domínios de adesão celular, quanto aos de potencialização da adesão e de estruturação da matriz, uma vez que possui sítios de ligação para diversas proteínas de matriz (ALBERTS *et al.*, 2010, LASCHKE *et al.*, 2006, MARTINO *et al.*, 2009; SAGNELLA *et al.*, 2005, VALLIÈRES *et al.*, 2007).

2.5.1. Fibronectina (FN)

Trata-se de uma proteína adesiva e não-colagenosa que pode ser encontrada na forma insolúvel e fibrilar, compondo a matriz extracelular, ou na forma solúvel e globular, quando presente no plasma e outros fluidos corporais (BAUJARD-LAMOTTE *et al.*, 2008). Sua caracterização como proteína de matriz extracelular e de superfície celular, junto à capacidade de se ligar a diversas outras proteínas (em destaque colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e fibrinogênio), destacou-a como agente constituinte de matriz capaz de promover adesão celular. Por conter tantos sítios de interações com variadas moléculas, a FN participa de muitos processos fisiológicos, guiando a adesão, a migração, a diferenciação e o crescimento celular/tecidual, em grande variedade de tipos celulares (MARTINO *et al.*, 2009, VALLIÈRES *et al.*, 2007).

A FN é uma proteína flexível, com ponto isoelétrico ácido (pI= 5,5 – 6,0) (BAUJARD-LAMOTTE *et al.*, 2008) e estruturada na forma de dímero protéico, em que as subunidades, cada uma com massa molar de aproximadamente 220 KDa, estão vinculadas por duas pontes dissulfeto próximas a terminações carboxílicas (BIZIOS *et al.*, 2002). Cada cadeia polipeptídica é composta por três diferentes tipos de FN, tipos I, II e III, determinados pelas sequências de aminoácidos que os compõem (Figura 2.3(a)). A FN tipo I possui cerca de 45 aminoácidos e está situada nas terminações amínicas e carboxílicas do polipeptídeo, repetindo-se 12 vezes ao longo da molécula. A do tipo II é formada por 60 aminoácidos e só aparece duas vezes na cadeia, interrompendo a sequência de nove repetições do tipo I, na terminação amínica. Os segmentos do tipo III, com aproximadamente 90 aminoácidos cada, estão localizadas na porção central da

cadeia, em grupos de 15 a 17 repetições (RUOSLAHTI, 1988). Assim, no somatório geral, a cadeia polipeptídica registra cerca de 2500 aminoácidos.

A estrutura polipeptídica pode variar de acordo com ambiente em que se encontra. A fibronectina isolada do plasma, por exemplo, pode apresentar polipeptídeos que diferem entre si quanto aos pesos moleculares e que são menores do que os produzidos por diferentes linhagens celulares mantidas em cultura (RUOSLAHTI, 1988). Estudos comparativos utilizando dicroísmo circular (para proteína em solução salina, pH 7) e microscopias de força atômica e eletrônica (para proteína adsorvida em sílica) relataram raios de 15 nm e 30 nm para proteína em solução na forma nativa e desenovelada, respectivamente, e comprimento de 120 nm com diâmetro de 2 nm para proteína adsorvida (BAUJARD-LAMOTTE *et al.*, 2008).

A conformação da FN é baseada principalmente em estruturas secundárias de folhas β -pregueadas antiparalelas (BAUJARD-LAMOTTE *et al.*, 2008). A FN do tipo III, quando em solução, possui conformação β -sanduíche, composta por sete filamentos em que grupos de 4 filamentos e de 3 filamentos estão dispostos sob orientação antiparalela entre si, formando as folhas β -pregueadas G-F-C-C' e A-B-E, respectivamente (Figura 2.3(b)) (LEAHY, 1997). A conformação geral atribuída à FN presente no plasma sanguíneo e na superfície celular é de estrutura compacta quaternária de cadeias polipeptídicas dobradas e enroladas; já na proteína da matriz extracelular, as cadeias adquirem conformação estendida, mantendo os domínios específicos dobrados (ULMER *et al.*, 2008).

Alterações na conformação da FN que a levam a sua extensão (Figura 2.3(b-e)) são causadas por tensões mecânicas, oriundas da ligação entre a integrina celular (proteína transmembrana de ligação) e as proteínas na matriz extracelular. Essa ligação ocorre, inicialmente, pela sequência tripeptídica RGD (R=Arginina, G=Glicina e D=Ácido aspártico), localizada na décima repetição do segmento peptídico do tipo III, na região central da molécula de FN (MA *et al.*, 2007, MARTINO *et al.*, 2009, MORRA, 2006).

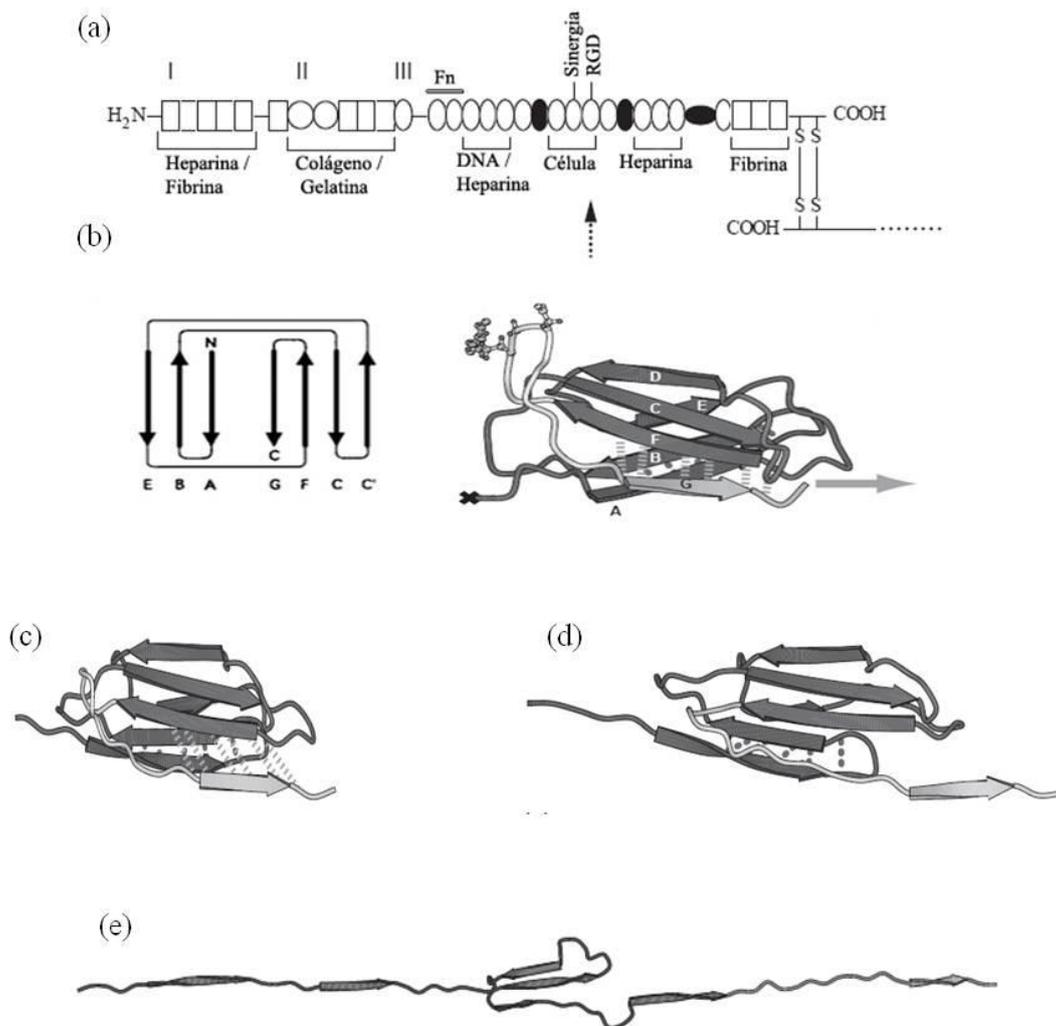


Figura 2.3- (a) Estrutura linear da FN, (b) desenho esquemático da conformação do segmento tipo III e (b-e) sequência de desdobramento da estrutura terciária do segmento tipo III que contém o grupamento RGD (adaptado de KRAMMER *et al.*, 1999, LEAHY, 1997).

A ligação da maioria das proteínas da matriz extracelular com a membrana celular, no processo de adesão, é dada principalmente pela integrina. A integrina é uma proteína transmembrana, formada por heterodímeros e responsável pela mediação de grande variedade de interações célula-célula e célula-matriz (ALBERTS *et al.*, 2010). As cadeias polipeptídicas α (massa molar 150-180 KDa) e β (massa molar 90-110 KDa), que compõem a integrina, estão ligadas de forma não covalente e dispostas em sua maior porção no lado externo na membrana citoplasmática (ALBERTS *et al.*, 2010). Em mamíferos, já foram descritos 24 genes que codificam a subunidade α , 9 que codificam β e, por combinação dessas subunidades, 25 diferentes integrinas (BAUER EeJECKEL-NETO, 2002).

A integrina apresenta duas diferentes conformações: uma para o estado ativo e outra para o estado inativo (Figura 2.4). Quando inativa, as cadeias α e β se aproximam e aderem uma a outra, resultando em conformação dobrada do domínio externo à célula. Quando entra em contato com o ligante (estado ativo), as cadeias se afastam, desdobrando suas porções externas. Desse afastamento, resulta a exposição do sítio de ligação para a proteína talina, na cauda da cadeia β . A ligação da talina recruta uma série de outras proteínas de ancoramento intracelular para a ligação final aos filamentos da actina (ALBERTS *et al.*, 2010). Assim, a interação da integrina com o ligante de matriz extracelular desencadeia a polimerização de feixes fibrosos de actina, que levam à orientação consistente das demais organelas intracelulares (INGBER e FOLKMAN, 1989). A interação dos filamentos de actina com as proteínas de ancoramento resulta na morfologia celular final, que sofre influência direta de estresses mecânicos externos, sentidos e transmitidos pelas integrinas (mecanotransmissão) (INGBER e FOLKMAN, 1989). Associada à actina polimerizada, também é possível encontrar filamentos de miosina e, dessa associação, resultam o espraiamento e a migração celular (INGBER e FOLKMAN, 1989).

A organização do citoesqueleto é capaz de promover a aplicação de forças nos pontos de ligação da integrina. Desta forma, a célula, a partir da contração ou reorganização do citoesqueleto, altera a conformação da FN, expondo sítios antes escondidos e organizando, assim, a fibrilogênese na matriz extracelular (MAGNUSSON e MOSHER, 1998). Na matriz extracelular, a fibrilogênese ocorre pelo desenovelamento da FN e exposição de dois segmentos do tipo III, localizados próximo à região amínica da cadeia (KARURI *et al.*, 2009, ULMER *et al.*, 2008). Esses segmentos reconhecem outras molécula de FN e estimulam a exposição de seus sítios, numa reação em cadeia (Figura 2.3(a)) (KARURI *et al.*, 2009). ZHANG *et al.* (2007) descreveram o processo de fibrilogênese sobre superfícies de biomateriais, iniciado como ligação covalente entre o grupamento amino (positivo) da FN e o sítio ativo do biomaterial. Tal ligação forçou o desenovelamento da FN que, na conformação estendida, expõe grupamentos negativos, em orientação oposta à superfície do biomaterial, e também expõe sítios de reconhecimento de FN. A formação de uma nova superfície negativamente concentrada promoveu a atração de novas moléculas de FN, imobilizando-as e desenovelando-as, umas sobre as outras, como no processo de estruturação da matriz extracelular. Em contrapartida, o estímulo de fora para dentro, a partir da ligação de diferentes receptores externos às respectivas subunidades das

cadeias α e β , influenciam aspectos do comportamento celular, que vão desde a proliferação e a sobrevivência, até a polaridade celular e a orientação para a migração (ALBERTS *et al.*, 2010).

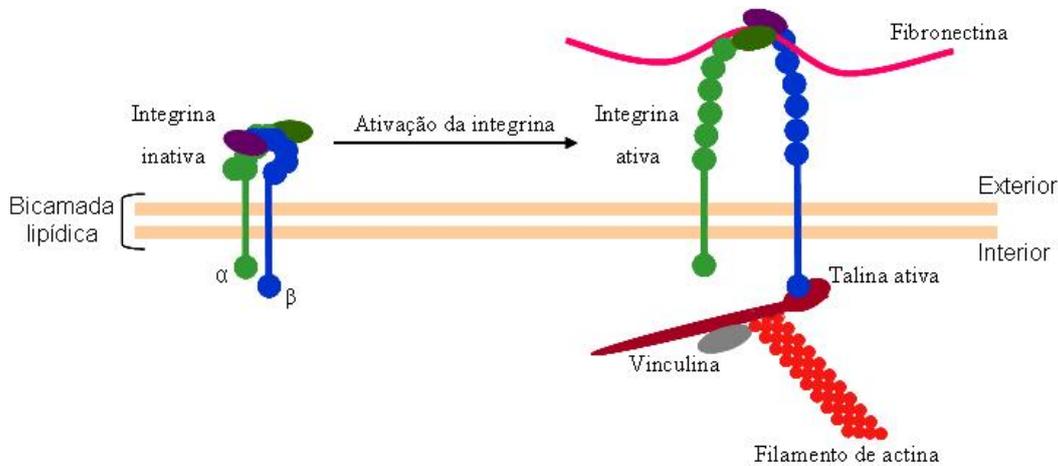


Figura 2.4- Representação da mudança de conformação de uma molécula de integrina (adaptado de ALBERTS *et al.*, 2010)

Além do sítio RGD, a FN apresenta outros sítios sinérgicos envolvidos nos processos de interação celular com a matriz. São mais de 20 sítios que podem, ou não, apresentar dependência do sítio RGD para reagir com as integrinas celulares, como:

- PHSRN - Sítios de ligação para a integrina $\alpha_5\beta_1$ - Intensifica a adesão em diferentes tipos celulares (MAGNUSSON E MOSHER, 1998, MARTINO *et al.*, 2009, SAGNELLA *et al.*, 2005), estimula a diferenciação de células precursoras de osso (MARTINO *et al.*, 2009) e estimula ações pró-angiogênicas em células endoteliais (LASCHKE *et al.*, 2006).

- WQPPRARI - Sítio de ligação para heparina (polissacarídeo transmembrana) (Figura 2.3(a)) - Sequência presente nos sítios de interação com heparina, que intensifica pontos de adesão focal em diferentes tipos celulares, principalmente pelo domínio PRARI, agindo diretamente em atividades pró-angiogênicas (MARTINO *et al.*, 2009, WOODS *et al.*, 1993).

- EILDVPST - Sítios de ligação para integrina $\alpha_4\beta_1$ - Trata-se de uma sequência adesiva e de especificidade celular, com capacidade de promover duplicação e reorganização dos microfilamentos citoplasmáticos (MAEDA *et al.*, 1993). A região EILDV é preferencialmente reconhecida por linfócitos (células sanguíneas de defesa) e algumas células tumorais (ex: melanoma) (MAEDA *et al.*, 1993).

- KLDAPT - Sítios de ligação para integrina $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$ - Sequência adesiva que desencadeia uma série de sinalizações celulares. Compete com a sequência EILDVPST e também apresenta alta especificidade por linfócitos (MOYANO *et al.*, 1997).

Além os sítios referidos, a capacidade fisiológica molecular de se enovelar e se desenovelar, nas mais de 15 sequências de repetição de FN tipo III, tem sido proposta como parte do mecanismo de controle para a ligação específica com integrinas (MARTINO *et al.*, 2009).

2.6. Biorreatores para cultura dinâmica

Ao tratamos de regeneração tecidual, é importante a avaliação do material regenerativo sob condições semelhantes às da região a ser tratada. Quando *in vivo*, as células são submetidas a diferentes tensões, de acordo com a região do corpo em que se encontram. Assim, para a aceitação de biomaterial regenerativo, é importante simular, *in vitro*, esses estímulos mecânicos e avaliar o comportamento celular após determinada quantidade de horas e/ou ciclos. Em tal contexto, entram em evidência os biorreatores, que são equipamentos para cultivo sob imersão temporária ou permanente de células, com objetivo de simular as funções biológicas. A imposição de diferentes fluxos e pressões, de forma isolada ou combinada, interfere diretamente nas etapas de adesão, espraiamento e crescimento celular (DERMENOUDIS e MISSIRLIS, 2010), influenciando, portanto, a formação de novo tecido e regeneração da região avariada.

Quando em culturas estáticas sobre arcabouços porosos, as células ósseas já demonstraram que sua capacidade de mineralização de matriz não ultrapassa o limite de 200 a 240 μm de profundidade, a partir das superfícies externas. O mesmo vale quando sobre arcabouços pouco espessos (2 a 3 mm de espessura) (CHUNQIU *et al.*, 2008). A utilização de tensões mecânicas em culturas ósseas tridimensionais vem demonstrando capacidade de promover o estímulo adequado para o cultivo celular, o transporte eficiente de nutrientes e excretas, bem como o desenvolvimento de matriz extracelular funcional (CHUNQIU *et al.*, 2006).

O tecido ósseo é dinâmico e capaz de responder a estímulos mecânicos externos sem romper ou sofrer danos. Sua microestrutura apresenta anisotropia característica, que se acredita estar fortemente associada à natureza de distribuição de tensões *in vivo* e à função mecânica (DUCAN e TURNER, 1995, MATSUGAKI *et al.*, 2013). Uma das

consequências da aplicação de cargas a tecidos ósseos é a deformação da sua matriz, e é tal estímulo/reação que vem sendo reproduzido *in vitro*, na tentativa de se entender as respostas das células ósseas (ETHIER e SIMMONS, 2013). Quando um osso trabecular é comprimido uniaxialmente, de modo automático ocorre expansão de volume na direção perpendicular, fazendo com que as células presentes nessa região sofram tensão biaxial, com maior concentração de pressão no centro do que na periferia do substrato deformado (Figura 2.5) (BASSO e HEERSCHKE, 2002, DUNCAN e TURNER, 1995).

Já é conhecido que a deformação sofrida pelo osso, *in vivo*, varia de 0,1% a 0,7% do comprimento total (THOMPSON *et al.*, 2012). De outra parte, experimentos de compressão de matrizes porosas, *in vitro*, normalmente utilizam tensão de deformação maior, a fim de que se obtenha alguma resposta celular. Já se sabe que, quando é imposta tensão de deformação de substrato da ordem de 1 - 10%, são promovidas diversas variações nas funções das células ósseas, incluindo: síntese de DNA, produção de enzimas, síntese de proteínas colagenosas e não-colagenosas, regulação dos filamentos de actina e mineralização (ANSELME, 2000, ETHIER e SIMMONS, 2013, SCHWARTZ *et al.*, 2007).

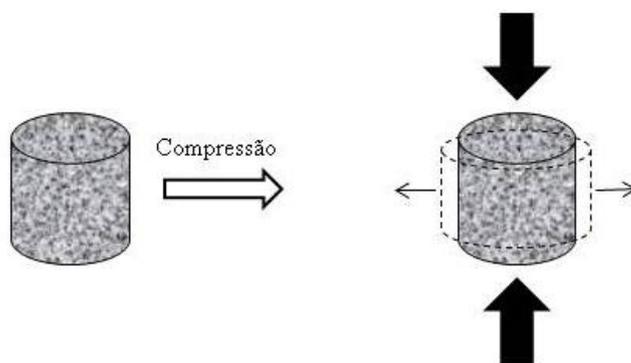


Figura 2.5 - Representação do efeito secundário de expansão do volume na direção perpendicular à força aplicada gerado após compressão uniaxial (adaptado de BASSO e HEERSCHKE, 2002).

Em um estudo dos efeitos da aplicação de força de compressão hidrostática, intermitente ou contínua, em processo de calcificação de placa de cartilagem de rato, por 5 dias, se concluiu que ambas as compressões foram capazes de promover calcificação da placa. Porém a compressão intermitente foi duas vezes mais efetiva do que a contínua e apresentou efeito celular anabólico, em contraste com o efeito primário catabólico, manifestado pela compressão contínua (KLEIN-NULEND *et al.*, 1986). Os mesmos autores testaram a compressão hidrostática intermitente, em cultura de células

murinas precursoras de osso, e observaram: aumento na atividade e expressão de fosfatase alcalina, aumento na expressão de marcadores típicos de células ósseas (ex: colágeno e osteopontina) e maior produção de prostaglandinas e outras moléculas ósseas sinalizadoras. Os autores concluíram que os efeitos associados à compressão intermitente, em termos de estímulo e resposta celular, foram similares aos provocados pelo fluido oscilatório intracorporal.

ROELOFSEN *et al.* (1995) também testaram a compressão hidrostática intermitente em cultura monocamada de células osteoprogenitoras e de linhagem de osteoblástica (MC3T3). Os autores constataram que, em diferentes níveis para cada tipo celular, houve aumento nas enzimas envolvidas no processo de mineralização, aumento na síntese de colágeno tipo I e aumento na expressão de actina. O aumento na expressão de actina, gerado pelo estresse mecânico aplicado às células, levou à rigidez do citoesqueleto. INGBER e FOLKMAN (1989) já haviam descrito o processo de rigidez do citoesqueleto, como resposta à forte interação entre a membrana celular e a matriz extracelular, que polimeriza feixes contráteis de actina, resultando na orientação consistente de organelas intracelulares.

A aplicação de compressão intermitente em cultura celular sobre arcabouço poroso, assim como no osso trabecular, promove o direcionamento do fluxo de meio de cultura das regiões de aplicação de compressão para as de expansão, gerando fluxo oscilatório nas cavidades macro e microscópicas, bem como aceleração na região central da rede de poros (Figura 2.6) (CHUNQIU *et al.*, 2006, DUNCAN e TURNER, 1995, RUMNEY *et al.*, 2012). Quando em organismo vivo, esse fluxo aumenta o transporte de massa no osso, gerando aumento das funções metabólicas essenciais para o crescimento e manutenção celular. O estímulo mecânico aplicado é reconhecido pelas células, tanto como interferência mecânica, com deformação direta da matriz extracelular (pela compressão) e tensão de cisalhamento (pelo fluxo oscilatório), quanto como interferência elétrica, com geração de potencial elétrico nos canais iônicos (promovido pela deformação da membrana) (CHUNQIU *et al.*, 2006, DUNCAN e TURNER, 1995). Os experimentos de compressão intermitente realizados *in vitro* com células ósseas, normalmente, utilizam tensões associadas a 0,5 - 10% de deformação no arcabouço (alta deformação) e frequência de 0,1 - 1 Hz (baixa frequência).

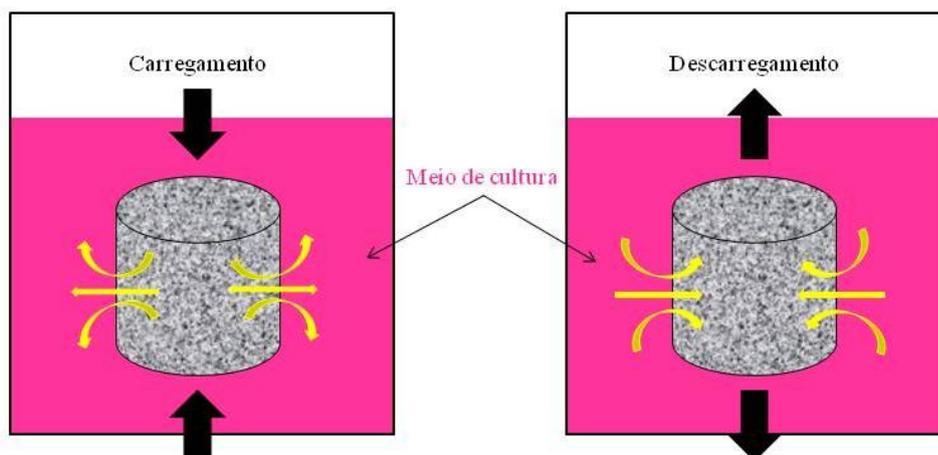


Figura 2.6 - Representação do fluxo de meio de cultura (setas amarelas) gerado no interior de arcabouços porosos após compressão e decompressão (adaptado de CHUNQIU *et al.*, 2008).

O fluxo cisalhante oscilatório, gerado por compressão intermitente, parece ser o estímulo mecânico mais importante na ativação de sinais mecanotransdutores e mediadores de adaptação em culturas 3D (CHUNQIU *et al.*, 2007, TANAKA *et al.*, 2005, THOMPSON *et al.*, 2012). Esse sinal mecânico dinâmico é essencial para a adaptação óssea, atuando na diferenciação de osteoblastos e na elevação das taxas de proliferação celular (NAING e WILLIAMS, 2011), aumentando a atividade celular e a síntese de fosfatase alcalina (DA SILVA *et al.*, 2010) e intensificando a deposição mineral (NAING e WILLIAMS, 2011, SIKAVITSAS *et al.*, 2003). Está relacionado, ainda, à migração celular, promovendo melhor distribuição dessas células na rede de poros dos arcabouços (KOCH *et al.*, 2010, NAING e WILLIAMS, 2011, SITTICHOCKECHAINWUT *et al.*, 2009).

Um biorreator que promova compressão intermitente direta sobre arcabouço polimérico com células é capaz de simular o ambiente do osso trabecular, com deformação em direção perpendicular e gradiente de pressão (CHUNQIU *et al.*, 2008). DAVID *et al.* (2008) testaram tal efeito pela combinação de baixo fluxo de perfusão (3 mL/h) e compressão intermitente diária (3 ciclos de compressão com variação de forças), diretamente sobre amostras de osso trabecular bovino jovem, obtendo aumento nos níveis de diferenciação osteoblástica, sem afetar, porém, as atividades dos osteoclastos.

TANAKA *et al.* (2005) estudaram a aceleração do fluxo oscilatório gerado durante compressão intermitente de arcabouço poroso de colágeno, encontrando intensidade 5 vezes maior, nas áreas de borda, do que no centro das amostras

(dimensões da amostra retangular: 20 x 16 x 2 mm). Em segunda etapa, os autores revestiram os arcabouços cultivados com linhagem celular MC3T3-E1 com gel de colágeno, a fim de estudar o efeito da compressão intermitente, na ausência de fluxo oscilatório. Ao final do experimento, encontraram diminuição na expressão de genes ligados ao RNAm e envolvidos tanto no processo de proliferação celular, quanto nos processos de produção, deposição e mineralização de matriz extracelular.

SITTICHOCKECHAIWUT *et al.* (2009) identificaram aumento na proliferação celular e na deposição de matriz extracelular em arcabouços porosos de poliuretano cultivados com linhagem osteoblástica (MLO-A5) e ensaiados por compressão intermitente (1 Hz, 5% deformação). De outra parte, RUMNEY *et al.* (2012), em estudo baseado na liberação de marcadores de proliferação celular, atestaram que, para os mesmos parâmetros de compressão aplicados em cultura tridimensional de linhagem osteoblásticas SaOS-2, no mesmo arcabouço poroso de poliuretano, os níveis de liberação de ATP não foram alterados (ATP atua como molécula de energia para uma série de reações celulares). Quando a cultura 3D foi submetida somente ao fluxo oscilatório, houve aumento de 5 vezes nos níveis de liberação de ATP e de aproximadamente 4 vezes na expressão c-fos mRNA (principal gene autoregulador de proliferação/diferenciação celular em tecido ósseo (Angel e Karin, 1990). Os autores relacionam como possíveis causas da não alteração nos níveis de ATP nos arcabouços de compressão intermitente: a porosidade insuficiente (que não permitiria o fluxo apropriado internamente), a baixa interação celular com a superfície polimérica ou a rigidez inadequada do arcabouço (que não teria propagado da deformação para estímulo à formação óssea).

A aplicação de compressão direta por placas rígidas, promovida sobre arcabouços cultivados com células ósseas *in vitro*, traz a vantagem da grande variedade de deformações possíveis, o que aumenta a possibilidade de mimetização do ambiente *in vivo*. Porém a fricção entre a placa e o arcabouço pode causar deformação heterogênea local e diminuição, ou bloqueio, do acesso de nutrientes à interface arcabouço/placa de compressão (BROWN, 2000). Assim, considera-se de extrema importância o correto desenvolvimento de uma superfície de placa de compressão que não só estabilize o contato com o arcabouço, mantendo a compressão local, como também permita o acesso do meio de cultura à região de interface, promovendo o aporte de nutrientes e oxigênio.

A aplicação de cargas mecânicas gera novo equilíbrio do sistema. A resposta celular produzida varia de acordo com a intensidade de força, o número de ciclos e a frequência aplicada no cultivo dinâmico, o tempo de aplicação da carga mecânica, a microestrutura do biomaterial utilizado como substrato e a linhagem celular cultivada. Células precursoras de osso, osteoblastos humanos e osteoblastos murinos, por exemplo, podem apresentar respostas muito diferentes à aplicação das mesmas cargas mecânicas (ANSELME, 2000).

CAPÍTULO III

OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da imposição de tensões mecânicas, por compressão intermitente e fluxo de perfusão, na morfologia de células osteoblásticas cultivadas *in vitro*, em arcabouço poroso de PHB.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar morfologicamente arcabouços porosos de poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) funcionalizados.
- Avaliar o comportamento de proliferação, colonização e organização das células endoteliais sobre os arcabouços, em ambiente estático, como possibilidade de estruturação futura de uma rede de capilares.
- Realizar os ajustes finais ao biorreator LAB-DC3A, desenvolvido para a aplicação de fluxo-compressão em culturas 3D.
- Avaliar a proliferação, a colonização e a orientação citoplasmática de células osteoblásticas associadas a arcabouços de PHB (funcionalizados ou não) em ambiente estático ou em ambiente dinâmico, sob diferentes aplicações de tensões.
- Avaliar a influência da funcionalização prévia das superfícies do arcabouço na morfologia das células submetidas a ensaios dinâmicos.

CAPÍTULO IV

METODOLOGIA

Neste capítulo, são apresentadas as metodologias, os materiais, os reagentes, os equipamentos e as técnicas de caracterização utilizadas ao longo desta pesquisa.

4.1. Produção dos arcabouços porosos de PHB

O PHB, em pó, foi fornecido pela PHB Industrial S/A (Biocycle[®]100, lote: 150, São Paulo, Brasil). O material foi peneirado (em peneiras para análise granulométrica) para retirada de contaminantes sólidos, utilizando-se a faixa granulométrica de 250 - 500 μm . As soluções foram preparados segundo técnicas de evaporação de solvente seguida pela lixiviação do agente porogênico (Mendonça, 2008). A solução de PHB em clorofórmio 15% (p/p) (pureza P.A.; Vetec Química Fina Ltda) foi preparada em sistema de refluxo a 65°C, segundo procedimento adotado no Laboratório de Biopolímeros (MEIGA, 2010).

Para a produção dos arcabouços, foi utilizada solução de PHB a 15% (p/v). A esta solução foram adicionados 10% (p/p) do plastificante citrato de trietila (pureza \geq 98%; Sigma-Aldrich) (CHOI e PARK, 2004) e 70% (p/p) de sacarose comercial peneirada (faixa granulométrica de \leq 250 μm) (MESSIAS *et al.*, 2011). Aproximadamente 5 mL dessa mistura final foi vertida em moldes de vidros, os quais foram mantidos em dessecador, sem imposição de vácuo, por 96 horas até a completa evaporação do solvente. Após secas, as amostras foram imersas em água destilada e mantidas sob agitação magnética constante, por 48 horas, com troca de água a cada 12 horas, a fim de se evitar a saturação do meio. A remoção das partículas do agente porogênico (sacarose) leva à formação dos poros do arcabouço. Após a lixiviação, os arcabouços foram cortados com molde metálico cilíndrico de 4 mm de diâmetro, a fim de adaptá-los ao tamanho do porta amostra do biorreator utilizado, e lixiviados por mais 48 h, com trocas de água a cada 12 h. O tamanho final do arcabouço foi de 4 mm de diâmetro e 5 mm de altura.

Após cortados e lixiviados, os arcabouços de PHB foram, então, submetidos ao processo de hidrólise. Foram incubados em recipiente contendo solução de NaOH em água destilada a 1 M (pureza P.A.; Vetec Química Fina Ltda) (THIRÉ *et.al.*, 2006). O

recipiente foi aquecido a 65°C por 45 minutos. Após aquecimento, os arcabouços foram submetidos a dois banhos de imersão em água destilada, a temperatura ambiente, com duração de 20 minutos cada um, com o objetivo de cessar a reação.

4.2. Imobilização da fibronectina

A incorporação da proteína à superfície dos arcabouço foi realizada via ligação covalente, seguindo o método biológico de modificação cruzada estudado em MEIGA (2010). Para tal, foi necessária etapa prévia de ativação, pela incorporação de agente de acoplamento.

A incorporação do agente de acoplamento foi realizada pela incubação dos arcabouços porosos hidrolisados em solução aquosa 0,1 M de tampão ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES) (pureza $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich), ajustado com NaOH 1 M a fim de obter pH 4,75, contendo 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (pureza P.A.; Sigma-Aldrich) e N-hidroxissuccinimida (NHS) (pureza 98%; Sigma-Aldrich). A determinação da concentração de EDC em solução seguiu procedimento descrito por MEIGA (2010), fixando-se em 0,1% (p/v, em relação ao tampão MES). O NHS foi adicionado à solução tampão mantendo o mesmo número de moles da EDC. Assim, para 30 mL de tampão MES foram utilizados 0,03 g de EDC e 0,0223 g de NHS. A reação foi mantida por 4 horas a temperatura ambiente, seguida de lavagem com água destilada corrente.

Após a ativação da superfície, foi realizado o processo de incorporação da proteína. A solução estoque de fibronectina (obtida de plasma humano, liofilizado, pureza $> 95\%$, Sigma-Aldrich) foi diluída até a concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$, em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 (0,145 M NaCl em 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). O arcabouços de PHB ativados foram imersos na solução proteica e mantidos a temperatura ambiente por 4 horas. Após a modificação, os arcabouços foram lavados com água destilada corrente, a fim de retirar a FN que se mantivesse apenas adsorvida fracamente nas superfícies.

Assim, ao final do procedimento (Figura 4.1), foram produzidos dois diferentes arcabouços. O arcabouço hidrolisado PHB_H , e o arcabouço hidrolisado com FN imobilizada: PHB_{FN} .

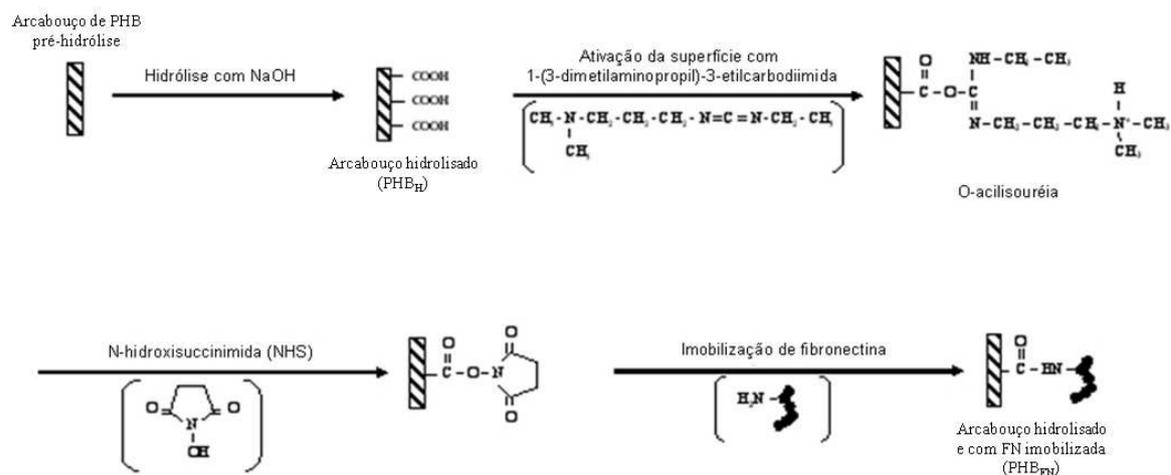


Figura 4.1- Esquema de ativação de superfícies poliméricas por EDC/NHS (MEIGA, 2010)

4.3. Caracterização morfológica dos arcabouços de PHB

A caracterização morfológica ultraestrutural do arcabouço PHB_H foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a caracterização da ultraestrutura interna, os arcabouços foram previamente fraturados em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo (20 mA por 2 min), de forma a não alterar a topografia de superfície do arcabouço, e observadas a 15 kV em microscópio JEOL JSM, modelo 6460 LV.

A fim de quantificar o efeito causado pela etapa de hidrólise à microestrutura do arcabouço, amostras de PHB_H e PHB pré-hidrólise (n = 3), com maior diâmetro (8 mm), foram submetidas à microtomografia computadorizada (μCT). A μCT é uma técnica não destrutiva de análise morfométrica, em duas ou três dimensões, capaz de medir variantes importantes na caracterização microestrutural de um biomaterial, como, por exemplo: porosidade, distribuição do tamanho de poros, interconectividade de poros, área de superfície exposta e espessura de paredes. A análise das amostras em microtomógrafo Bruker-Skyscan, modelo 1173, ocorreu a 40 kV sob corrente de 200 μA, operando com tubos de raios-X microfoco de tamanho focal ≤ 5m e um detector de 2240 x 2240 pixels. Um filtro de alumínio de 0,5 mm foi utilizado a fim de melhorar a qualidade da imagem. A obtenção da imagem se deu por rotação de 360° da amostra ao longo do seu eixo Z, com escaneamento a cada 0,5°. As imagens foram reconstruídas com base no algoritmo de Feldkamp (FELDKAMP *et al.*, 1984), com tamanho de pixel de 7,4 μm e utilizando, aproximadamente, 400 fatias escaneadas por amostra. Os

parâmetros morfológicos foram calculados diretamente nos modelos 3D processados digitalmente (LORENSEN e CLINE, 1987), considerando um volume de interesse de 152,3 mm³. Para tal, foi necessária etapa prévia de binarização das imagens, em que foram utilizados os softwares NRecon® (NRecon 2011- versão 1.6.8.0) e InstaRecon (InstaRecon 2011- versão 1.3.9.2).

4.4. Crescimento e manutenção da cultura celular

Neste trabalho foram utilizadas duas células de linhagens distintas: endotelial BCE-HT⁺, células de capilar bovino imortalizadas com telomerase humana (VEITONMAKI *et al.*, 2003), e osteoblástica MG-63, células de osteosarcoma humano, (European Collection of Cell Cultures - ECACC). As células das duas linhagens foram crescidas em garrafas de cultura de 75 cm², em meio Alpha-MEM (Minimum Essential Medium Eagle – Alpha Modification), para células BCE-HT⁺, e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), para células MG 63, ambos enriquecidos com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) (todos da Biochrom AG), em estufa a 37⁰C e 5% CO₂, com trocas de meio de cultura a cada 2 dias.

Quando as células atingiam estado de semiconfluência, equivalente a 60-70% de sua confluência, eram tripsinizadas (tripsina-etilenodiamina tetra-ácido acético (EDTA), Biochrom AG), centrifugadas e ressuspensas em meio para utilização nos testes de cultivo celular. Dependendo do volume de experimentos a serem realizados, a cultura celular era expandida para novas garrafas ou congelada para posterior utilização.

4.5. Cultivo celular

Para o cultivo celular, todos os arcabouços foram previamente esterilizados com óxido de etileno. Antes da inoculação celular, para a retirada de ar de dentro da malha de poros, os arcabouços estéreis passaram por etapa de imposição de vácuo (esquema na Figura 4.4). Para tal, em seringa descartável com a ponta hermeticamente vedada, foram introduzidos o meio de cultura estéril e os arcabouços (2 mL de meio por arcabouço). A vedação da ponta foi substituída pela agulha (com tampa) e o êmbolo empurrado para cima, a fim de se retirar de todo o ar de dentro da seringa. A vedação foi refeita entre a tampa da agulha e a ponta da seringa e, por tração do embolo, foi imposto vácuo,

forçando a entrada do meio de cultura na rede de poros (e consequente saída do ar). Após sucessivos ciclos de imposição de vácuo, quando os arcabouços já não podiam mais flutuar no meio cultura, o processo cessava e os arcabouços estavam prontos para receber as células.

Os testes de cultivo celular nos arcabouços PHB_H e PHB_{FN} foram conduzidos sob duas condições gerais diferentes: cultivo estático e cultivo dinâmico (em biorreator). As distintas linhagens celulares foram expostas a distintas condições de cultivo. Tais ensaios foram conduzidos no Laboratório de Engenharia Mecânica e Aeroespacial, da Universidade de Patras – Grécia.

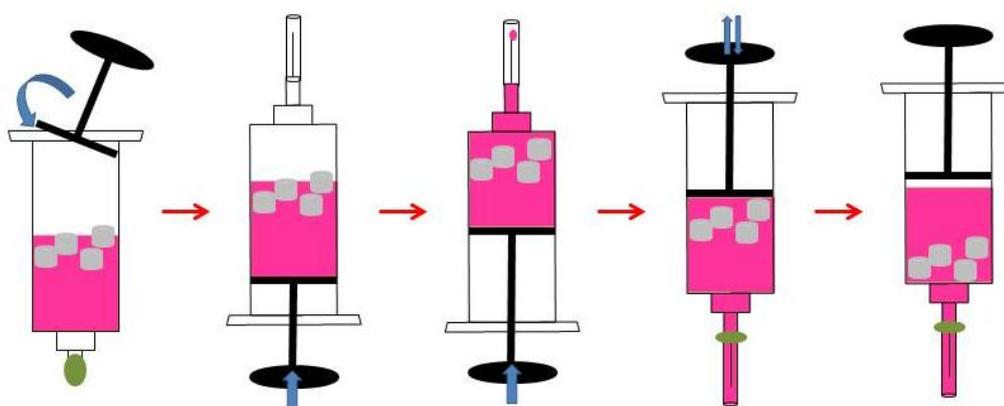


Figura 4.2 - Esquema dos sistemas de retirada de ar de dentro dos arcabouço de PHB por imposição de vácuo.

4.5.1. Cultivo celular estático

O cultivo estático foi utilizado como etapa única de cultivo celular ou como etapa prévia do cultivo dinâmico. Assim, as duas linhagens celulares (BCE-HT⁺ e MG 63) tiveram seus tempos de cultivo estático, variando de acordo com o objetivo do experimento, como detalhado nos itens a seguir (itens 4.6.1.1 e 4.6.1.2).

Independentemente da linhagem celular utilizada, quando as células atingiram estado de semiconfluência, foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura específico, contadas em câmara de Neubauer e semeadas, na área central da superfície circular dos arcabouços, a uma concentração de 8×10^4 células/arcabouço (aproximadamente $6,5 \times 10^4$ células/cm²). Os arcabouços cultivados foram mantidos em placa de 96 poços, em estufa a 37°C e 5% CO₂, com troca de meio de cultura a cada 2

dias. Após os 45 minutos iniciais de cultura, os arcabouços foram trocados de poços para garantir que as células do fundo do poço não afetassem os resultados finais.

4.5.1.1. Linhagem endotelial - BCE-HT⁺

A linhagem celular endotelial foi utilizada somente para testes prévios, estáticos, por até 7 dias. Por serem células envolvidas nos processos de reparo tecidual e na formação de vasos sanguíneos, sua utilização prévia forneceu respostas mais imediatas a respeito da interação célula-superfície polimérica, considerando-se a influência da química de superfície (cargas expostas e sítios de ligação celular) bem como a morfologia de poros e paredes (microrrugosidade).

Assim, os testes conduzidos com BCE-HT⁺ tiveram por finalidade:

1. Avaliar a resposta celular à superfície do arcabouço em curto prazo.
2. Avaliar a possibilidade de geração de rede de capilares, capaz de abastecer (com nutrientes e oxigênio) o interior da malha de poros e lixiviar os excretas metabólicos celulares.

Para a cultura de células BCE-HT⁺ sobre arcabouço PHB_H e PHB_{FN}, foi utilizado meio de cultura Alfa-MEM (10% SFB e 1% antibiótico), com troca a cada 2 dias e avaliação do processo de colonização após 1, 4 e 7 dias. A avaliação foi realizada por marcação de células vivas e mortas, com as células não-fixadas, em microscópio confocal (descrito no item 4.7.1).

4.5.1.2. Linhagem osteoblástica – MG 63

Os testes estático com a linhagem osteoblástica foram realizados com meio de cultura DMEM (10% SFB e 1% antibiótico) e tiveram duas finalidades:

1. Avaliar a etapa inicial de adesão celular, para posterior imposição de tensões no cultivo em biorreator (processo que garante a densidade celular planejada) - tempo: 4 h.
2. Análise comparativa do efeito das tensões impostas durante o cultivo em biorreator - tempos: 4 e 19 h.

Para a definição das 4 h de adesão inicial, foram testados diferentes intervalos de tempos, a fim de se encontrar o menor intervalo possível em que as células apresentassem adesão suficiente (início do processo de espraiamento) para suportar as

tensões impostas pelos testes dinâmicos, sem serem lixiviadas. Após estas 4 h de adesão celular, os arcabouços semeados poderiam seguir em cultura estática ou serem passados à cultura dinâmica (descrito no item 4.6.2), ambas por mais 15 h. Ao final dos experimentos estáticos, foram obtidas amostras com 4 e 19 h de cultivo.

A avaliação da interação celular aos arcabouços PHB_H ou PHB_{FN} foi realizada com base nas análises de microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura e cortes histológicos. Todas as amostras pós-cultura foram fixadas para posterior análise, seguindo protocolo descrito no item 4.7.

4.5.2. Cultivo celular dinâmico em biorreator – MG 63

O cultivo dinâmico foi realizado no biorreator LAB-DC3A modificado. Esse biorreator foi projetado e construído pelo grupo Steeldot LTDS para o Laboratório de Engenharia Mecânica e Aeroespacial, da Universidade de Patras – Grécia. Para a sua utilização, porém, foram necessárias algumas alterações estruturais a fim de viabilizar o cultivo celular estéril (ver item 5.3).

O biorreator (Figura 4.3) possui um porta-amostra com capacidade para até 5 amostras, em paralelo, um sistema de manutenção de temperatura constante a 37°C, permitindo a imposição de força cisalhante (controlada por fluxo imposto por uma bomba peristáltica) e compressão intermitente (controlada pelo software LabDot DC3A V1.00, desenvolvido especificamente para este biorreator pelo grupo Steeldot LTDS). A manutenção da atmosfera de 5% de CO₂ era mantida pela ligação entre a estufa e o biorreator, passando por uma segunda bomba peristáltica e sendo intermediada por filtros descartáveis para seringa com membrana de poro 0,22 µm (Millipore), que funcionavam como bloqueios a contaminantes.

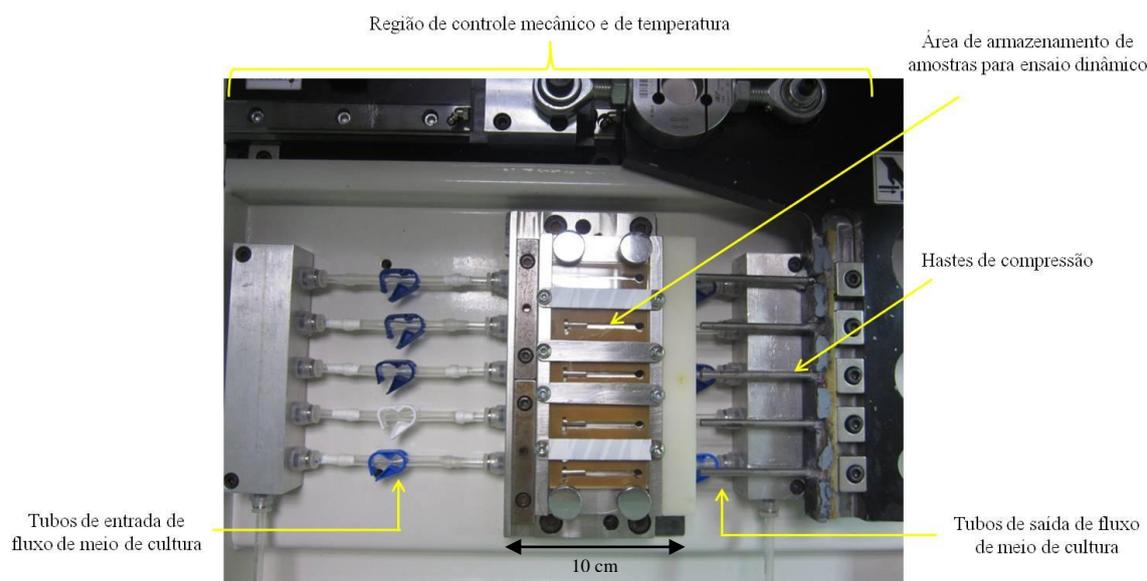


Figura 4.3 - Fotografia do biorreator LAB-DC3A modificado

Antes de iniciar qualquer experimento no biorreator, todas as suas áreas internas eram esterilizadas em fluxo contínuo de álcool 70%, sob luz ultravioleta, por período de 30 minutos, seguido por 4 lavagens sequenciais, com água destilada e esterilizada, viabilizando o biorreator para a cultura celular. Após a esterilização, o meio de cultura DMEM (10% SFB e 1% antibiótico) era inserido e estocado, em concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ do antifúngico Anfotericina B (Biochrom AG).

Após assepsia do biorreator, os arcabouços com células, passadas 4 h de cultura estática, foram alocadas dentro do compartimento porta-amostras, manuseado dentro da câmara de fluxo. Para cada rodada de experimento, foram utilizados 3 arcabouços, alocados nas aberturas centrais do porta-amostras. Os testes em biorreator seguiram dois padrões diferentes de aplicação de tensão: tensão cisalhante isolada por perfusão ou tensão cisalhante + compressão intermitente. A tensão cisalhante foi imposta a partir do ajuste de fluxo da bomba peristáltica, enquanto a compressão intermitente, pelo ajuste do software acoplado ao biorreator, em que a tensão era aplicada em função da deformação final pré-estabelecida (Figura 4.4). Os dados experimentais foram estabelecidos da seguinte maneira:

- Tensão cisalhante (F) - fluxo: 15 mL/minuto; tempo: 15 h.
- Compressão intermitente ($C_{2,5}$) - frequência: 1 Hz; deformação final: 2,5% da altura do arcabouço; tempo: 15h.

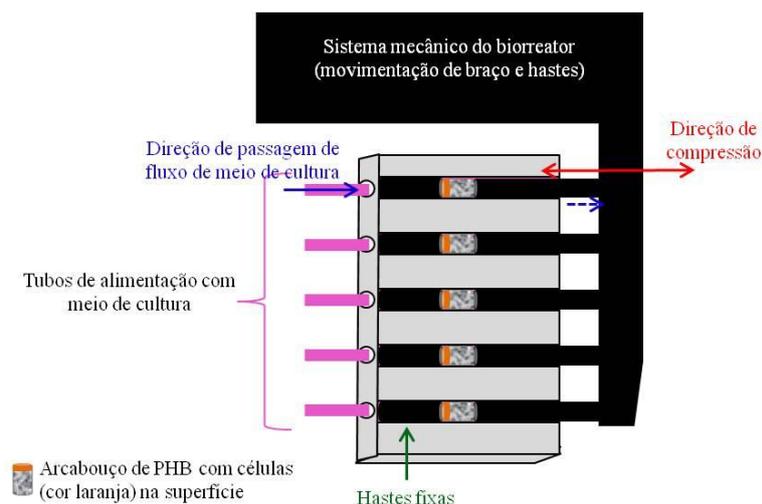


Figura 4.4 - Esquema de imposição de fluxo de perfusão (seta azul) e de compressão intermitente (seta vermelha) em arcabouços de PHB cultivados com células, no biorreator LAB-DC3A

Para o cálculo da tensão cisalhante estimada de menos de 1 dyn/cm^2 , sofrida pelo arcabouço durante a imposição do fluxo de perfusão, foi aplicada a equação: $\tau = 6\mu Q/A$; em que μ é viscosidade do fluido (o meio de cultura DMEM suplementado, a 37°C , possui viscosidade dinâmica igual a $0,0078$ Poise), Q é o fluxo imposto na cultura (em cm^3/s) e A é a área do arcabouço (BACABAC *et al.*, 2005; SCHWARTZ *et al.*, 2007). Deve-se considerar que, quando aplicada a superfícies rugosas ou porosas, a tensão cisalhante inicial sofre alterações, como, por exemplo, formação de pequenos vórtices, que podem gerar diferentes respostas celulares num mesmo material (BANNISTER *et al.*, 2002), ou ainda intensificação do efeito cisalhante pela passagem por poros de baixo diâmetro (TANAKA *et al.*, 2005).

Para chegar ao padrão final de experimento descrito (experimentos dinâmico 5 e 6 a seguir), foram necessários diversos experimentos prévios, a fim de avaliar, entre outros aspectos, o menor tempo de cultura estática associado à combinação de fatores de cultura dinâmica. Foram realizados, no total, os 7 experimentos descritos abaixo. Quando a cultura estática era mantida por 24 h antes do experimento de compressão, observava-se ao final do experimento baixa densidade celular total, com alta incidência de células mortas nas áreas mais internas da rede de poros do arcabouços. O tempo de cultura estática foi, então, reduzido para o mínimo possível capaz de permitir boa adesão celular (considerando-se, por base de avaliação, o arcabouço bioativado (PHB_{FN})). Os tempos de experimentos dinâmicos foram aumentados a fim de acelerar a

resposta celular. Dessa forma, chegou-se ao padrão experimental (experimentos 5 e 6) discutido nesta tese, e ao experimento de limite de tensão (7), que também é apresentado (F = fluxo constante, C = compressão, X (C_X) = % de deformação final):

Estático: 4 horas, 6 horas, 10 horas, 19 horas, 24 horas, 28 horas e 48 horas.

Dinâmico:

1. 24 horas em cultura estática + 1 hora de F/C_{2,5} + 23 horas de F/C₀.
 2. 24 horas em cultura estática + 1 hora de F/C_{2,5} + 4 horas de F/C₀.
 3. 6 horas em cultura estática + 2 horas de F/C_{2,5} + 2 horas de F/C₀.
 4. 6 horas em cultura estática + 4 horas de F/C₀.
 5. 4 horas em cultura estática + 15 horas de F/C₀.
 6. 4 horas em cultura estática + 15 horas de F/C_{2,5}.
 7. 4 horas em cultura estática + 15 horas de F/C₅.
- Padrão {
- Limite de tensão →

A avaliação do efeito das forças impostas às culturas celulares nos arcabouços PHB_H ou PHB_{FN} foi realizada com base nas análises de microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura e cortes histológicos. Todas as amostras pós-ensaio dinâmico foram fixadas para posterior análise, seguindo-se protocolo descrito no item 4.7.

Ao fim das pesquisas, uma complementação experimental foi realizada com o objetivo de avaliar resultados após o carregamento dinâmico e abrir portas para novos questionamentos acerca do tema abordado. Um arcabouço PHB_{FN}, após 4 horas em cultura estática + 15 horas de F/C_{2,5} (experimento 6), foi mantido em cultura estática, em estufa (37°C e 5% CO₂), por mais 9 horas. Esse arcabouço foi analisado por microscopia confocal, segundo protocolo do item 4.7.

4.6. Avaliação do cultivo celular

Para os arcabouços cultivados com a linhagem celular BCE-HT⁺, a análise do efeito da microestrutura e do recobrimento proteico sobre a cultura foi realizada por microscopia confocal.

Para os arcabouços cultivados com a linhagem celular MG 63, foram empregadas 3 técnicas de análise (microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura e análise de cortes histológicos), a fim de serem avaliados os efeitos do

recobrimento com FN e das forças mecânicas impostas pelo biorreator sobre a cultura celular.

4.6.1. Microscopia confocal

Para essas análises, foram utilizados dois diferentes microscópios:

1. Invertido Nikon D-eclipse C1 (modelo ECLIPSE TE-2000U). Esse microscópio é equipado com canhões de lasers de Ar⁺ (50 mW / 458, 477, 488, 514 nm), excitando com comprimento de onda 488 nm, Diodo Azul (36 mW / 405 nm) e He-Ne (2mW / 543nm). As imagens foram obtidas e tratadas pelo software EZ-C1, versão 3.90;

2. Zeiss, modelo LSM 510 META. Esse microscópio é equipado com canhões de lasers de Ar⁺ (50 mW / 458, 477, 488, 514 nm), excitando com comprimento de onda 488 nm, e Mai Tai HP (>2.5 W / 690 a 1040 nm), excitando com comprimento de onda 800 nm. As imagens foram obtidas e tratadas pelo software ZEN 2009 Light Edition.

Para os experimentos prévios realizados com células da linhagem BCE-HT⁺, a microscopia confocal foi realizada logo após terminado o tempo de ensaio (1, 4 e 7 dias), com as células vivas (não-fixadas). Para tal, os arcabouços com células foram imersos, por 5 min, em 4 µg/mL de Diacetato de fluoresceína (FDA) em tampão PBS, que emite cor verde para marcação das células vivas e, por outros 5 min, em 4 µg/mL de Iodeto de propídio (PI) em tampão PBS, que emite em vermelho para destaque das células mortas (ambos da Sigma-Aldrich). Ao término da marcação, os arcabouços foram levados, imediatamente, para o microscópio confocal Nikon e observados com objetiva de 10x. A observação foi realizada em duas áreas: na superfície onde as células foram gotejadas e na seção transversal, gerada por corte longitudinal na região central da amostra.

Para os ensaios realizados com a linhagem MG 63, após os tempos das culturas estáticas (4 e 19 h) e dos experimentos 5, 6, 7 e "6 + complemento" (item 4.6.2), as células foram fixadas por imersão das amostras em solução aquosa de 4% de paraformaldeído. Após fixação, as amostras foram imersas em solução tampão 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich), que emite em azul a marcação dos núcleos celulares, seguida por imersão em solução tampão de 50 µg/ml de Faloidina Alexa Fluor-488 (Invitrogen), que emite em verde par marcar os filamentos

de actina polimerizada presentes no citoesqueleto celular. Parte dos experimentos preparados por tal protocolo foram analisados no microscópio confocal Nikon e outra parte no confocal Zeiss, com objetivas de 10x, 60x (Nikon) e 63x (Zeiss).

As análises de microscopia confocal foram realizadas em triplicata, sendo possível, a partir dos resultados obtidos, avaliar: a disposição celular na rede de poros dos arcabouços, o nível e espriamento de cada célula, a orientação proteica do citoesqueleto celular de actina e, de forma qualitativa, a proliferação celular.

4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada na caracterização de células MG 63 cultivadas em arcabouços PHB_{FN} (n= 1), após os tempos de ensaio estático e experimentos 5 e 6 (item 4.6.2), a fim de avaliar o comportamento e a morfologia celulares e de comparar os diferentes estágios de adesão em que cada grupo se encontrava.

Para a observação em MEV (JEOL JSM, modelo 6460 LV), foi utilizada amostra de cada experimento, fixada em solução tampão de glutaraldeído 2,5%. Na preparação, as amostras passaram por 3 lavagens (10 min cada), em tampão cacodilato de sódio 2 M, visando à total retirada do fixador. Foi realizada etapa de pós-fixação com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, seguida por mais 3 lavagens com tampão cacodilato de sódio 2 M.

O processo de desidratação foi realizado por banhos alcoólicos em escala crescente de concentração. Foi utilizado álcool etílico P.A. (Merck) nas concentrações de 50, 70, 80, 90, 95 e 100%. A etapa posterior de secagem foi realizada por banho de 10 min em solução 1:1 (v/v) de hexametildisilazano (HMDS) (Sigma-Aldrich) e álcool 100%, seguida por outro banho em solução pura de HMDS e exposição das amostras ao ar (dentro da capela com o sistema de exaustão ligado), por 48 h, para a total remoção do líquido. Ao final do processo, todas as amostras foram recobertas com ouro e observadas a 15 kV.

4.6.3. Cortes histológicos

A análise por cortes histológicos foi realizada pela marcação das células MG 63 cultivadas nos arcabouços PHB_{FN} (n= 1), após o tempo de ensaio estático e

experimentos 5 e 6 (item 4.6.2). Essa análise teve objetivo de avaliar a capacidade de migração celular para dentro da rede de poros, considerando-se as forças mecânicas impostas, a microestrutura do material e o recobrimento com FN.

A fixação das células após ensaio foi realizada por imersão dos arcabouços cultivados em solução aquosa a 3,7% (v/v) de formol. As amostras fixadas foram levadas à Empresa Junior APC Biotecnologia (Rio de Janeiro, RJ), de onde seguiram para a etapa histotécnica. Antes de serem submetidos ao processamento, os arcabouços foram seccionados na direção do comprimento, de forma a se obterem duas metades de volumes iguais. A empresa utilizou o seguinte protocolo:

1. Processamento e corte: o material fixado foi submetido ao processador automático Lupetec, seguindo as etapas de desidratação em banhos de álcool etílico (em concentrações alcoólicas crescentes), clarificação em banhos de xilol, impregnação e emblocagem em parafina. Após o endurecimento da parafina e formação do bloco, foram feitos os cortes, em micrótomo manual, com espessura de 10 µm cada um.

2. Coloração: cada corte foi disposto em lâmina de vidro, seco em estufa, 60°C por 30 min, e levado para a bateria de banhos de coloração. A sequência de lavagens seguiu a ordem de imersão em xilol, desidratação em álcool etílico e coloração por hematoxilina de Harris por 15 min. Após a coloração, os cortes foram lavados em água corrente e desidratados. As lâminas finais foram montadas com Entellan (Merck).

Em cada metade do arcabouço, foram obtidos 5 cortes para análise histológica, somando-se 10 cortes por amostra. Estabeleceu-se que, para analisar uma maior área de colonização celular, a cada corte montado em lâmina o corte seguinte seria desprezado (Figura 4.5). Assim, foi analisado um total de 180 µm de espessura da região central da amostra.

A análise dos cortes histológicos foi realizada em Microscópio Invertido Leica (modelo DM IL LED, com câmera Leica DFC310 FX acoplada) por contraste de fase. As imagens obtidas foram analisadas e tratadas pelo software LAS, versão 4.2.

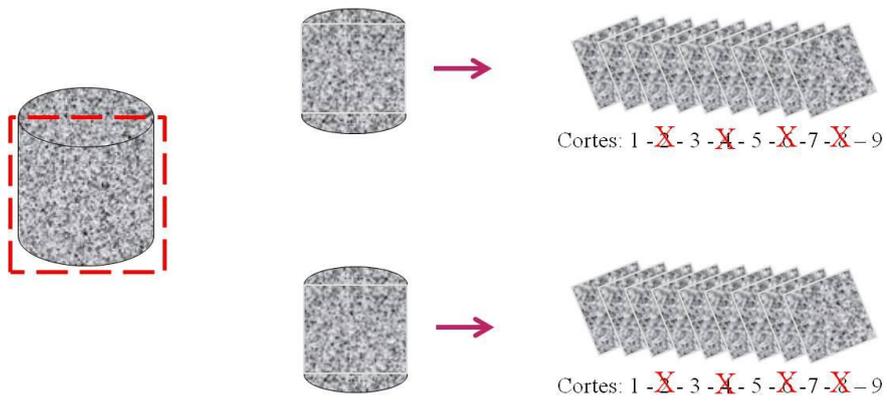


Figura 4.5 - Esquema de obtenção dos cortes histológicos para análise de migração celular invasiva a rede de poros.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos ao longo da presente pesquisa, com suas respectivas discussões, baseadas nos conceitos mais recentemente descritos na literatura.

5.1. Análise morfológica dos arcabouços de PHB

Na Figura 5.1 estão apresentadas eletrônicas micrografias da superfície externa dos arcabouços após hidrólise (PHB_H), região onde foram semeadas as células. Nessas eletrônicas micrografias, é possível observar grande quantidade de poros interconectados (interconexão indicada por setas na Figura 5.1(b)), com tamanhos que variam de micrômetros a milímetros. A morfologia dos poros segue o padrão poligonal dos cristais de sacarose, que foram utilizados como agente porogênico. Na Figura 5.2 estão apresentadas as micrografias da região interna (seção transversal) do arcabouço, mostrando a manutenção da morfologia da superfície externa e a distribuição homogênea dos poros ao longo da estrutura, uma evidência da boa dispersão do agente porogênico na solução de PHB.

As características morfológicas apresentadas pelo arcabouço estão de acordo com os resultados encontrados por MASAELI *et al.* (2012) para arcabouços produzidos por lixiviação de particulados. Segundo os autores, a técnica de lixiviação de particulados apresenta a vantagem de produzir poros com morfologia irregular, adequados para adesão celular, elevando o volume de células inicialmente aderidas, bem como a melhora da taxa de permeabilidade da rede de poros, o que otimiza a infiltração celular, o suprimento de nutrientes/gases e a lixiviação de excretas do interior da rede de poros.

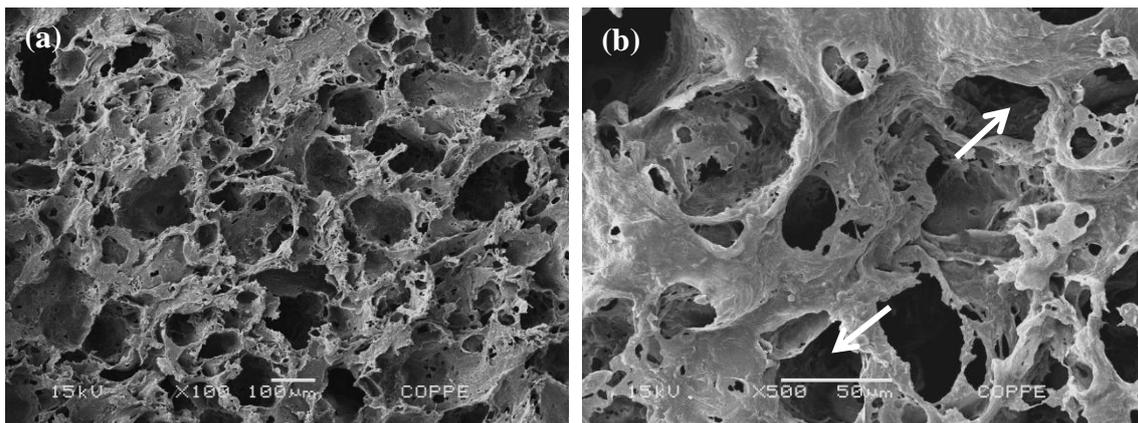


Figura 5.1 – Imagens de MEV da superfície externa dos arcabouços, mostrando a estrutura de poros (a) e, em detalhe, a interconectividade entre os poros (b).

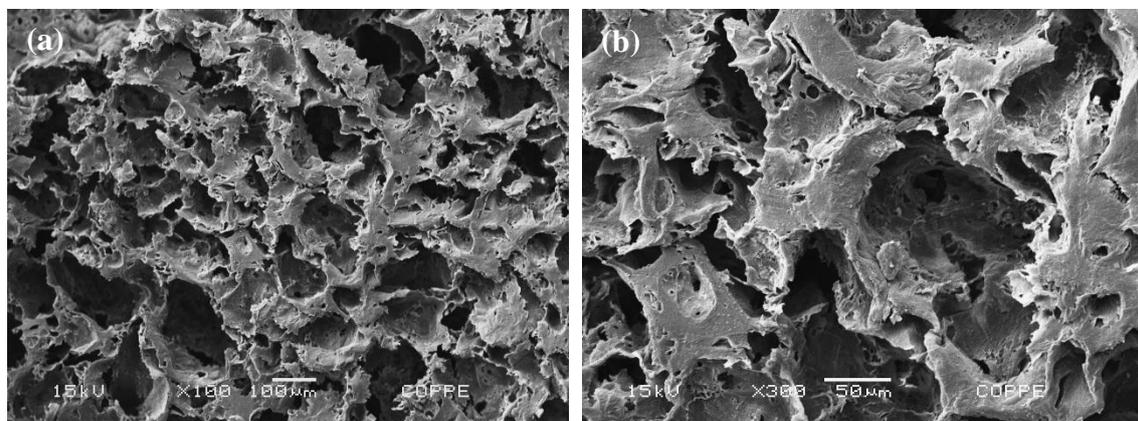


Figura 5.2 – Imagens de MEV da seção transversal dos arcabouços, mostrando a manutenção da morfologia de superfície no interior da rede de poros (a) e, em detalhe, a interconexão dos poros no interior da estrutura (b).

Os arcabouços PHB_H e PHB pré-hidrólise foram submetidos a análises por microtomografia computadorizada (μ CT), a fim de quantificar, de forma não destrutiva, suas características estruturais. Os resultados encontrados estão sintetizados na Tabela 5.1. A partir dos valores encontrados por μ CT, pode-se supor que a quebra das cadeias de PHB causada pela hidrólise dá origem a novos pequenos poros, provavelmente onde a espessura da parede polimérica apresenta-se mais fina, uma vez que a espessura média geral das paredes não é alterada. Sendo assim, possivelmente as propriedades mecânicas do arcabouço também não são afetadas. Esses pequenos poros não apresentam importância significativa no cálculo final de porosidade média, já que os arcabouços têm grandes poros ($>100 \mu\text{m}$), porém revelam grande importância no aumento da conectividade entre os poros. O aumento da área polimérica superficial pode ser

relacionado não só aos novos poros formados, mas também à nova microrrugosidade, formada como resultado da quebra das cadeias poliméricas durante a hidrólise (MOLINA *et al.*, 2012). A microrrugosidade da superfície apresenta influência direta no aumento da adesão e espriamento celular, com efeito refletido na morfologia, proliferação e diferenciação, quando considerados osteoblastos e células endoteliais (KIM *et al.*, 2012, MOLINA *et al.*, 2011).

Tabela 5.1 - Características estruturais dos arcabouços de PHB, antes e depois da hidrólise, medidas por μ CT.

Características estruturais	PHB pré-	
	hidrólise	PHB _H
Porosidade média (%)	(66 ± 4.5)	
Porosidade fechada (%)	(0.017 ± 0.01)	
Espessura de paredes poliméricas (μ m)	(80 ± 10)	
Intervalo de tamanho de poros predominante (μ m)	90-165	60-140
Conectividade entre os poros (mm^{-3})	(322 ± 87)	(627 ± 7)
Área superficial polimérica exposta (mm^2)	(2628 ± 137)	(2930 ± 4)

Em estudo complementar realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biopolímeros (TEIXEIRA, 2013), foram utilizados os mesmos protocolos de fabricação e de modificação de arcabouços de PHB apresentados nesta tese e analisadas as cargas de superfície, com base na concentração de grupamentos negativos presentes. Para tal, o corante cristal violeta (de carga positiva) foi adsorvido às superfícies dos arcabouços e, posteriormente, eluido com metanol. Após eluição, as soluções de corante foram lidas em espectrofotômetro, encontrando valor de absorbância significativamente maior nos arcabouços PHB_{FN}, e as amostras que permaneceram coradas foram analisadas em software de tratamento de imagem, encontrando quase o dobro de intensidade de coloração nas superfícies dos arcabouço PHB_{FN}. A alta concentração de grupamentos negativos nos arcabouços PHB_{FN}, quando comparada aos arcabouços PHB_H, foi atribuída à possível exposição de aminoácidos de carga negativa que compõem as cadeiras da FN.

5.2. Linhagem endotelial - BCE-HT⁺ - Análise de proliferação e organização estrutural

Uma análise qualitativa da adesão, distribuição e organização celular nas superfícies dos arcabouços, imobilizados ou não com fibronectina, foi realizada com base em imagens de microscopia confocal, obtidas após 1, 4 e 7 dias de cultivo (Figura 5.3). Nessas imagens as células aparecem coradas em verde, quando vivas, e em vermelho, quando mortas.

Ambos os arcabouços, PHB_H e PHB_{FN}, permitiram a adesão e a colonização celular, apresentando, porém, diferentes taxas e tempos de proliferação (Figura 5.3). Nos arcabouços PHB_H, as células não apresentaram boa adesão inicial, o que é possível ser comprovado pelo pequeno grupo de células aderidas após um dia de cultura (Figura 5.3(a)). Devido à presença de grupamento oxigenados gerados pela quebra das cadeias poliméricas pós hidrólise, as células que conseguiram aderir às superfícies mais externas dos arcabouços PHB_H foram as que ficaram inicialmente presas na rede de poros, ganhando tempo para iniciar os processos de adesão e espraiamento, produzindo e secretando proteínas de matriz extracelular e bioativando as superfícies poliméricas (OH e LEE, 2013, WOODARD *et al.*, 2007).

Provavelmente, devido a essa produção local de proteínas de matriz, não houve estímulo para a migração celular, o que acabou promovendo o crescimento de grupos celulares na forma de aglomerados (Figura 5.3(c)). Durante o processo de proliferação, os aglomerados celulares podem ter entrado em contato por emissão de filopódios, passando a se concentrar em torno dos poros com crescimento direcionado para dentro da rede (Figura 5.3(e)). O reconhecimento célula-célula por proteínas transmembrana dispara cascata interna de reação, que estimula a proliferação e a estruturação tecidual (ALBERTS *et al.*, 2010). Contudo, após 7 dias de cultura, as células endoteliais não foram capazes de cobrir as superfícies externas dos arcabouços PHB_H (Figura 5.3(e)). Assim, é possível apontar a microarquitetura dos arcabouços (tamanho dos poros, microrrugosidades e grupamentos químicos) como satisfatória para o crescimento de células endoteliais, ainda que com taxa lenta de proliferação e espraiamento.

Nos arcabouços PHB_{FN}, os níveis de adesão celular apresentaram-se muito mais altos do que nos arcabouço PHB_H, desde o primeiro dia de experimento (Figura 5.3(b)).

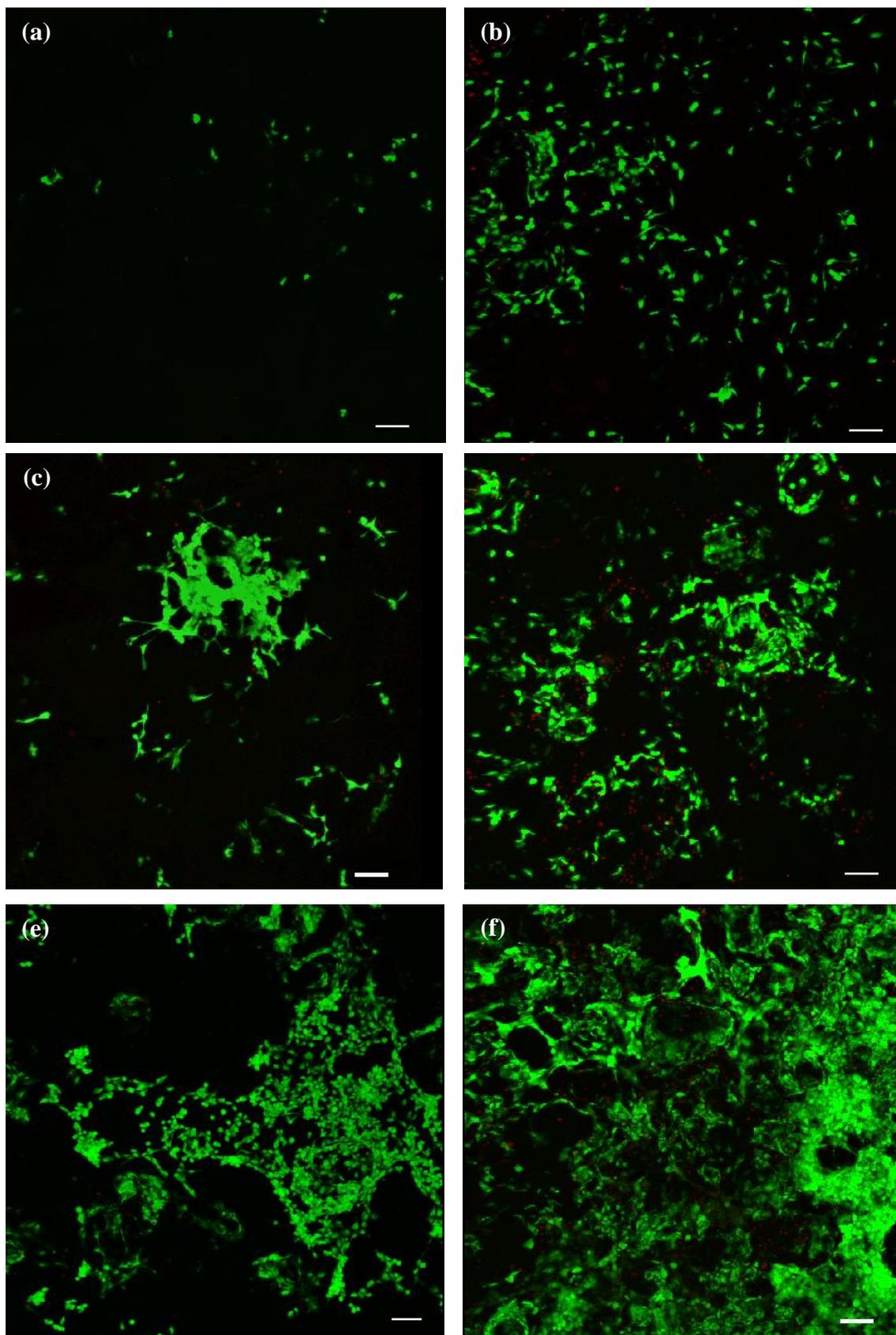


Figura 5.3 - Imagens de microscopia confocal de arcabouços PHB_H (a, c, e) e PHB_{FN} (b, d, f) após cultura de BCE-HT⁺, por 1 (a, b), 4 (c, d) e 7 (e, f) dias, e marcação pelos corante PI e FDA. Todas as barras de escala medem 100 μm.

A técnica empregada para a imobilização prévia de FN foi capaz de promover o reconhecimento celular às superfícies poliméricas. BUSER *et al.* (2006) estudaram o comportamento de células endoteliais microvasculares bovinas, imortalizadas com telomerase humana (hTERT) (semelhantes à linhagem BCE-HT⁺ utilizada nesta tese), e afirmam que tal processo de imortalização não afeta as características celulares, mantendo-se, praticamente, a mesma densidade de crescimento apresentada por células endoteliais primárias e o controle de proliferação por inibição por contato. Outra característica observada nas células imortalizadas com hTERT é sua capacidade de organização em estruturas tubulares, mesmo na ausência de fatores pró-angiogênicos (BUSER *et al.*, 2006). Nas Figuras 5.3(f), após 7 dias de cultivo, é possível observar o crescimento da camada de células para dentro dos poros, em forma de estruturas circulares sobrepostas, que lembram o início da estruturação de um capilar sanguíneo. Esse crescimento está apresentado de forma mais detalhada na Figura 5.4.

Na Figura 5.4, se demonstra a evolução do eixo Z da Figura 5.3(f), com profundidade de 155 μm , partindo-se da área mais interna (Figura 5.13(a)) do arcabouço PHB_{FN}, até a mais externa (Figura 5.4(c)). Por essa sequência de imagens, é possível acompanhar a invasão celular à rede de poros. Aparentemente as células estão organizado-se em camadas de formato circular, o que pode ser o indício do início de crescimento de estruturas tubulares. Nas três imagens de profundidade apresentadas (Figura 5.4 (a), (b) e (c)), as setas indicam uma linha bem definida de células, dispostas em formato circular e rodeando um lúmen central.

Devido à boa conectividade de poros obtida após a hidrólise (ver Tabela 5.1, item 5.1), é possível que, durante o processo de imobilização de FN, as moléculas proteicas tenham conseguido alcançar áreas mais internas da rede de poros, ligando-se às superfícies poliméricas desta região. Tal presença de FN dentro da rede de poros pode ter estimulado a incursão celular, acelerando o gradiente de migração. Esse resultado coincide com o descrito por LIU *et al.* (2007), que mostram o estímulo à migração exercido pela FN nas células endoteliais, e por BUSER *et al.* (2006), que afirmam que células endoteliais imortalizadas por hTERT mantêm a característica de invasão. Na Figura 5.4(d) é apresentada a ampliação de uma zonas de interesse da Figura 5.3(f), onde estão destacadas (por setas) as estruturas de crescimento em formato circular, formadas após 7 dias de cultura.

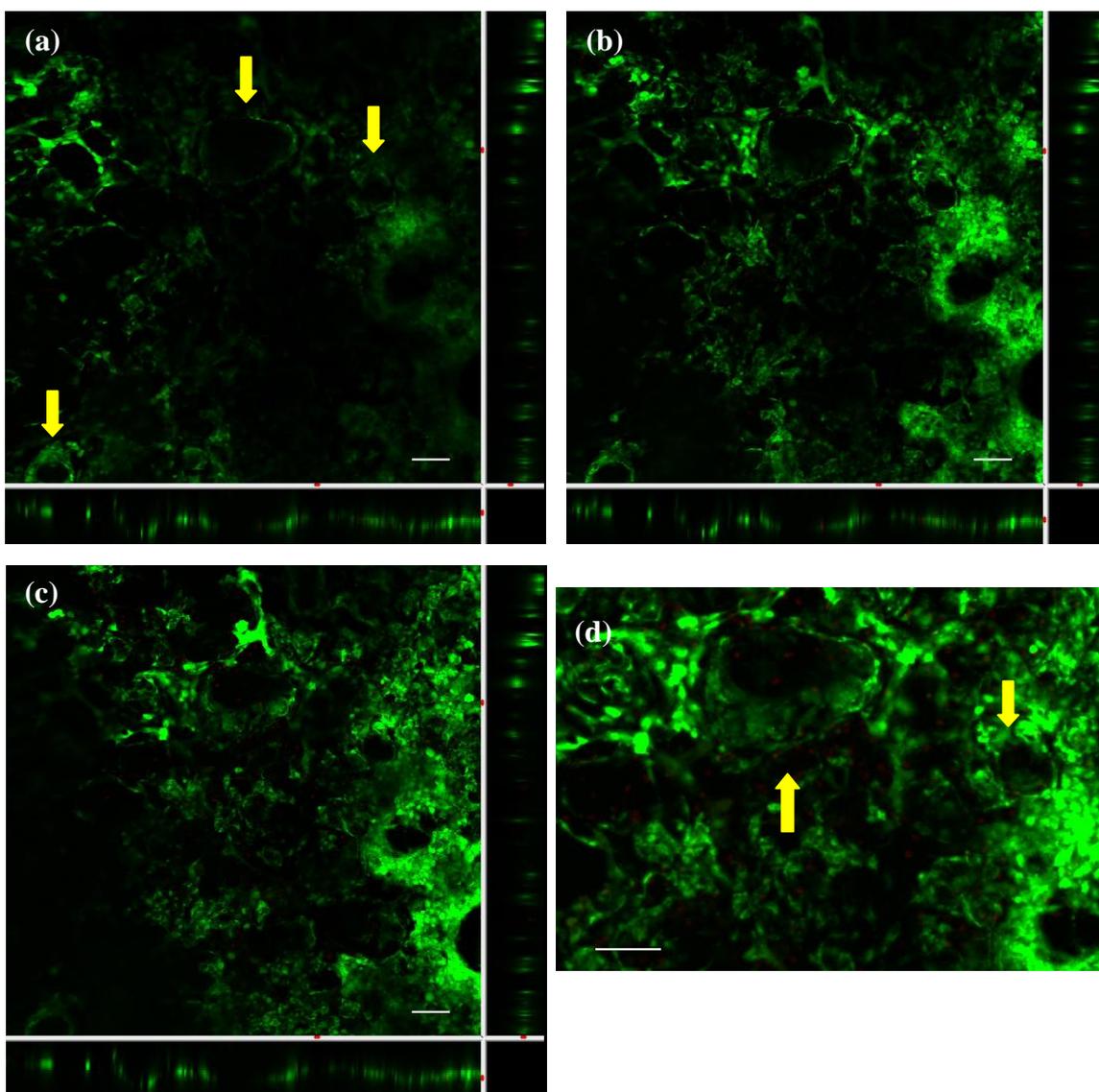


Figura 5.4 - Imagens de microscopia confocal de arcabouços PHB_H, após 7 dias de cultivo de BCE-HT⁺. Nas imagens (a), (b) e (c) está apresentada a evolução do eixo Z, seguindo esta ordem, da região mais interna para a mais externa. Em (d) está a magnificação de uma área de interesse. Todas as barras de escala medem 100 μ m.

Em algumas imagens, é possível observar a presença de células mortas (marcadas por emissão de cor vermelha), fato que pode ser atribuído ao limite de difusão de gases e nutrientes. Essas células estão presentes em regiões mais internas da rede de poros ou em áreas de alta densidade celular, sendo mais facilmente visualizáveis nas Figuras 5.3(d) e (f), devido à alta densidade celular, e nas Figuras 5.5(a) e (b).

A capacidade de invasão celular à rede de poros dos arcabouços de PHB_H e PHB_{FN}, após 7 dias de cultivo, foi avaliada por imagens de microscopia confocal das suas seções transversais (Figura 5.5). Dentro da rede de poros do arcabouço PHB_H,

poucas células vivas foram observadas, alcançando profundidade de até 200 μm (Figura 5.5(a)). ZELTINGER *et al.* (2001) descrevem que, em arcabouços poliméricos porosos não bioativos, com tamanho médio de poros de 90 μm , células endoteliais microvasculares caninas foram capazes de crescer, formando fino revestimento celular sobre as superfícies poliméricas e migrando lentamente para dentro da rede de poros.

Para arcabouços PHB_{FN}, a imagem da seção transversal mostrou alta densidade de células vivas, com migração para dentro da rede de poros a profundidade de até 400 μm (Figura 5.5(b)). Por esses resultados, é possível confirmar a influência da imobilização covalente de FN, não só para a adesão celular inicial e para o processo proliferativo, mas também para a migração de células endoteliais, permitindo a colonização das áreas mais internas dos arcabouços, característica de extrema importância nos processos de vascularização.

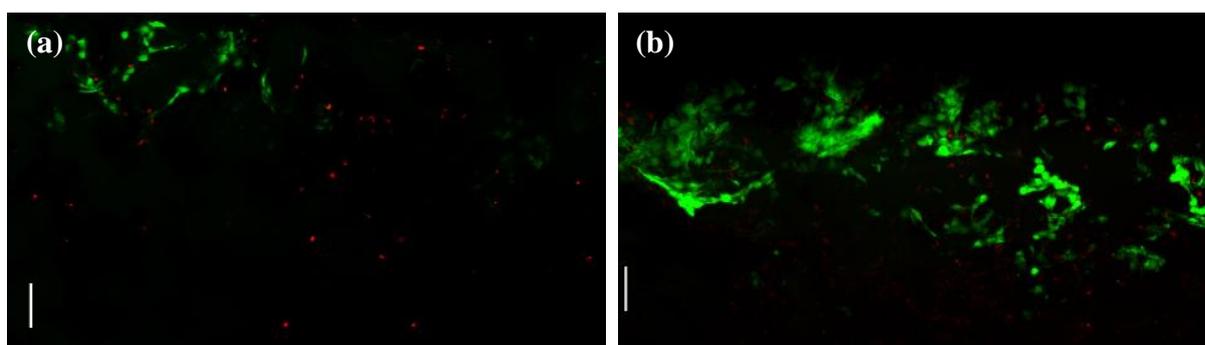


Figura 5.5 - Imagens de microscopia confocal da seção transversal de arcabouços PHB_H (a) e PHB_{FN} (b), após 7 dias de cultivo de BCE-HT⁺. As duas barras de escala possuem 100 μm .

5.3. Descrição do biorreator

Testes preliminares mostraram que o biorreator LAB-DC3A, na primeira versão (Figura 5.6), não funcionava bem. Sendo assim, foram necessárias modificações no sistema de fluxo e no modelo final da máquina (Figura 5.7), adaptando-o ao trabalho de maneira asséptica e permitindo melhor desempenho do experimento. O modelo final, com as modificações realizadas, detalhadas e discutidas, é apresentado no decorrer da discussão.

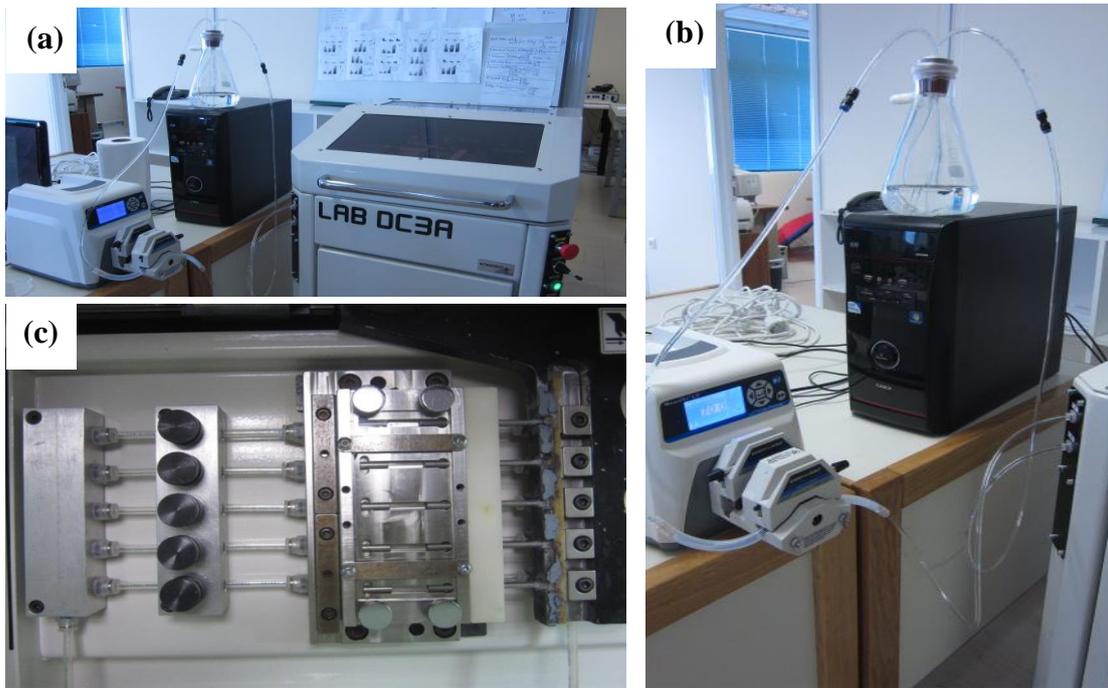


Figura 5.6 – Primeira versão do biorreator LAB-DC3A. Em (a), o biorreator montado e fechado, com o sistema de fluxo acoplado a bomba de vácuo (mais detalhes em (b)). E, em (c), o sistema de compressão.

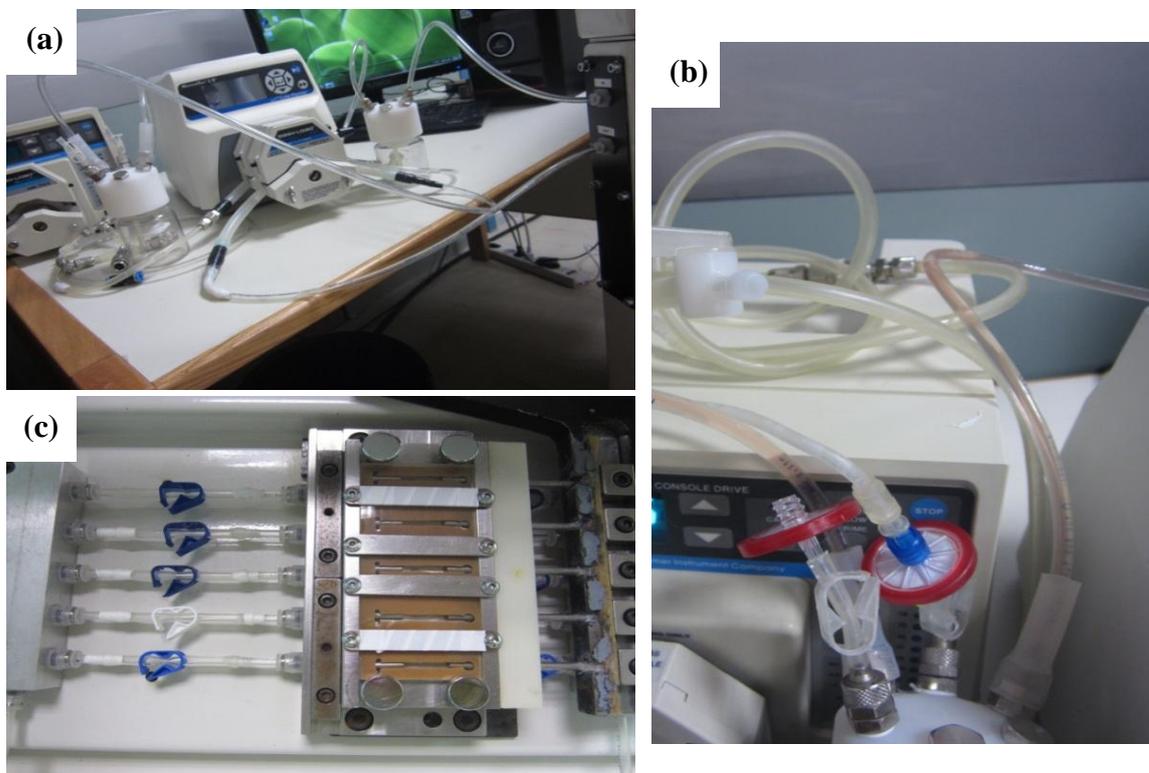


Figura 5.7 – Versão modificada do biorreator LAB-DC3A. Em (a), o sistema de fluxo acoplado a bomba de vácuo. Em (b), o sistema de manutenção de gás CO_2 durante a cultura dinâmica. E, em (c), o novo sistema de compressão.

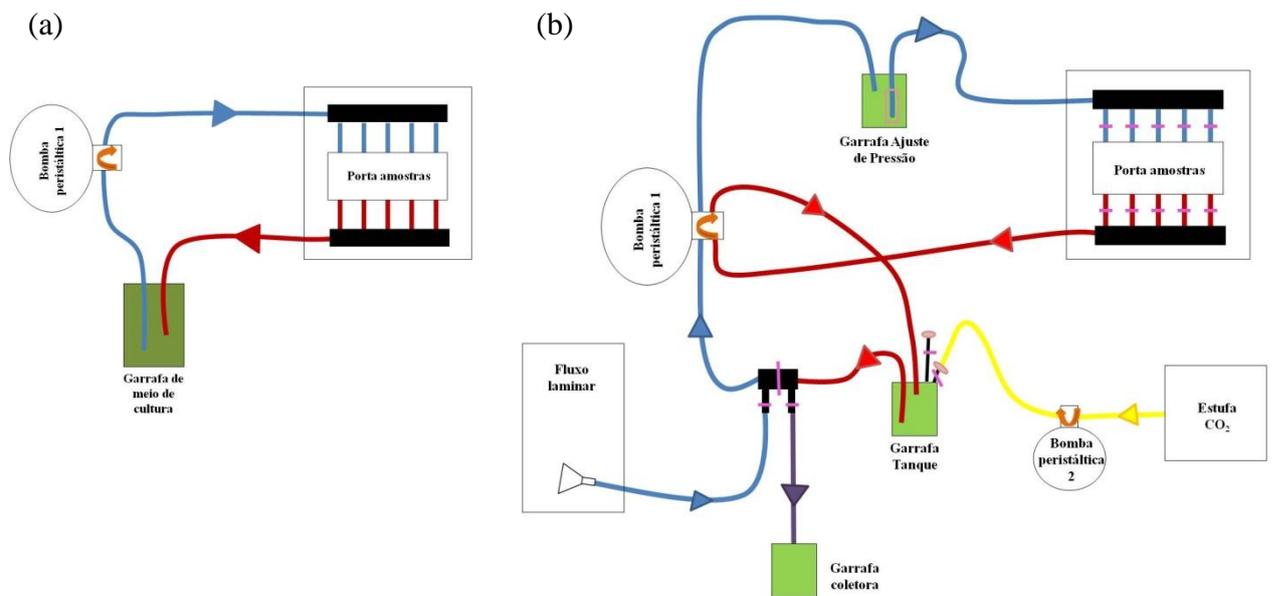


Figura 5.8 - Esquema do biorreator e seu sistema de alimentação antes (a) e após (b) modificações.

Para melhor compreensão das muitas mudanças sofridas pelo biorreator e por seu sistema de alimentação, apresentadas na sequência dessa discussão, foi esquematizado, na Figura 5.8, como era o sistema inicial (Figura 5.8(a)) e como este sistema ficou, após todas as modificações sofridas (Figura 5.8(b)). Na Figura 5.8(b) estão esquematizados todos os tubos que passaram a fazer parte do sistema, a saber: tubos alimentadores, em azul; tubos coletores, em vermelho; tubo de eliminação, em roxo e tubo de gases, em amarelo. O biorreator passou a contar também com válvulas para abrir ou fechar a passagem de fluxo pelos tubos (em rosa) e garrafas de ajuste de pressão, tanque e coletora.

O sistema de tubos que supria o biorreator, após modificações, passou a contar com sistema de injeção de líquido de forma estéril, manipulado dentro da câmara de fluxo (Figura 5.9(a)). Após os processos de esterilização e limpeza (descritos no item 4.5.2) e de inclusão de meio de cultura, o dispositivo que liga os tubos alimentador e coletor era aberto (Figura 5.9(c)) e tais tubos se tornavam contínuos. Com tal procedimento, eram retirados do sistema o início do tubo alimentador e o tubo de eliminação (Figura 5.8(b) e Figura 5.9(a) e (b)).

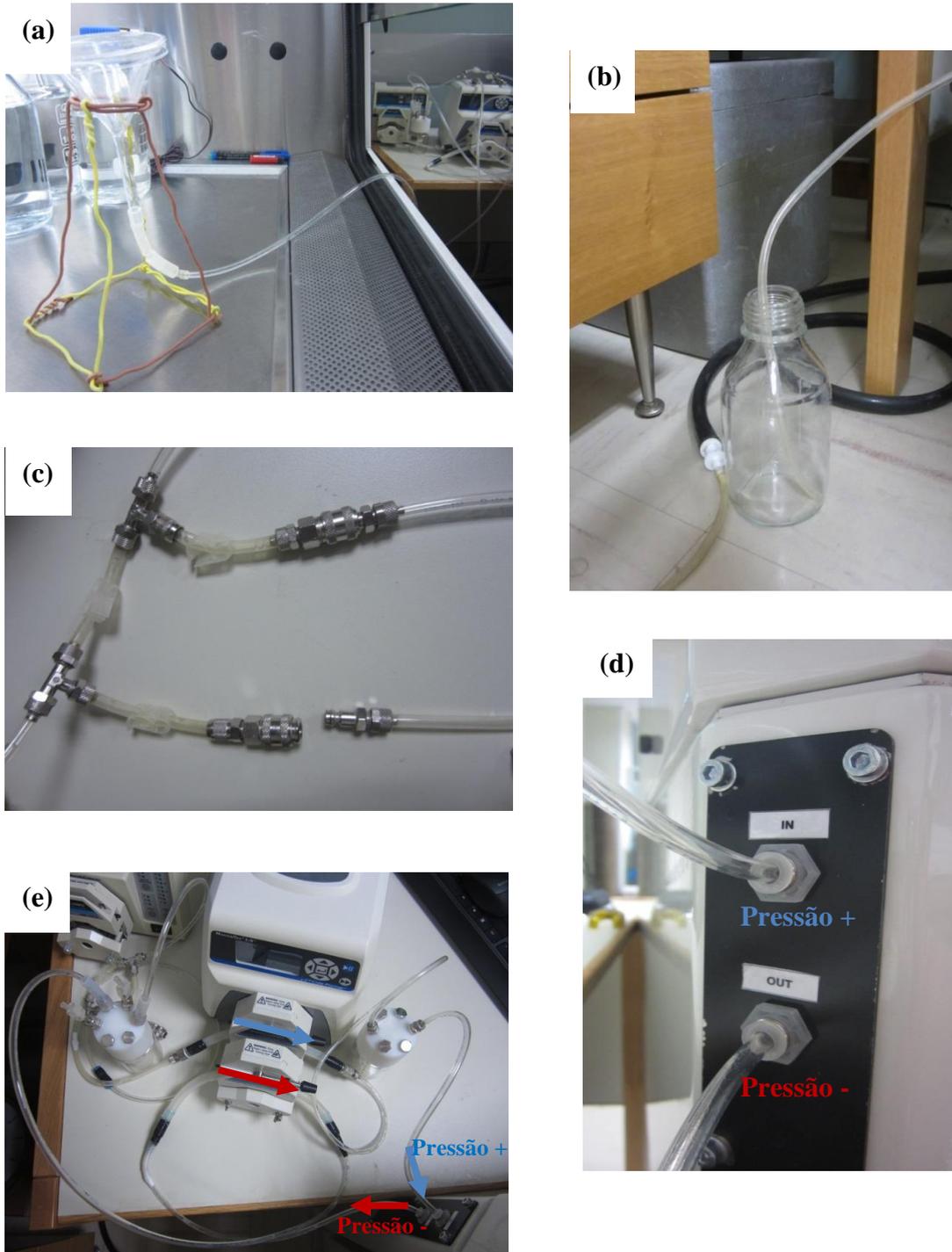


Figura 5.9 – Novo sistema de tubos. Em (a) está o sistema de injeção de líquido e, em (b), o de eliminação. Em (c) está o dispositivo que liga o tubo alimentador ao coletor e que acopla o sistema de injeção de líquido e de eliminação. Em (d) e (e), está o sistema de imposição de pressão positiva e negativa.

Tanto o tubo alimentador quanto o coletor passavam então pela bomba de vácuo. O tubo alimentador sofria pressão positiva, levando o líquido para dentro do sistema de compressão, passando, previamente, pela garrafa de ajuste de pressão (Figura 5.9(d) e (e)), inibindo o efeito pulsátil provocado pelo bomba de vácuo. No tubo coletor, a pressão era negativa, retirando-se o líquido de dentro do sistema de compressão (Figuras 5.9(d) e (e)). A imposição de vácuo nos dois sentidos do sistema de compressão se fez importante, uma vez que, por apresentar longo percurso de tubos e uma grande variação de caminhos a serem percorridos pelo meio de cultura, algumas bolhas de ar ainda permaneciam retidas dentro do biorreator LAB-DC3A. Caso essas bolhas não sofressem saída forçada pelo sistema de pressão positiva e negativa, poderiam impedir a passagem de líquido por dentro do porta-amostras, provocando o esvaziamento de alguns dos cinco segmentos ou ainda o extravasamento de líquido pelos segmentos periféricos.

Ainda considerando a reformulação do sistema de tubos, foi inserido no sistema o tubo de gases (Figura 5.10). Esse tubo conectava a estufa (37°C e 5% CO₂) à garrafa tanque, por intermédio de bomba peristáltica. A garrafa tanque tinha, além de duas aberturas para entrada e saída de líquidos, outras duas para o balanço de gases. Nas aberturas de saída para gases, após esterilização, foram conectados dois filtros descartáveis para seringas (esquema da Figura 5.8(b)), que evitavam a contaminação do interior da garrafa (ver item 4.5.2). Após a conexão dos filtros, as pequenas presilhas plásticas foram abertas, permitindo, em uma das aberturas, a conexão com o tubo de gases e a entrada da atmosfera de 5% de CO₂/ 95% O₂ para dentro da garrafa, enquanto, na outra abertura, havia manutenção do equilíbrio gasoso com o meio externo.



Figura 5.10 - Sistema de troca de gases desenvolvido para o biorreator.

No sistema de compressão, foram realizadas as seguintes mudanças:

1. O primeiro conjunto de tubos do sistema de compressão (Figura 5.11) foi modificado, objetivando bloquear totalmente a passagem de fluxo pelos compartimentos que não eram utilizados durante os experimentos. Para tanto, foram adaptados novos tubos nas regiões centrais dos já existentes. Esses novos tubos, por apresentarem paredes maleáveis, permitiam sua compressão por pequenas presilhas plásticas. A referida compressão era forte o suficiente para bloquear a passagem de líquido sem romper as paredes do tubo.

A total troca dos tubos iniciais não foi possível, uma vez que os adaptadores que os conectavam aos segmentos metálicos não aceitavam novos tubos de parede maleável ou diâmetro diferente. O novo segmento de tubo maleável era trocado ao final de cada experimento, para garantir o máximo de assepsia, uma vez que não tinha paredes antibacterianas.

2. O porta-amostras continha 5 compartimentos separados, um para cada amostra, por onde passava o fluxo de meio de cultura (Figura 5.12). Para evitar extravazamento de líquido por ausência de um sistema de isolamento hídrico, a nova configuração do porta-amostras contou com: uma placa de acrílico (no lugar da anterior de vidro), duas placas metálicas extras (totalizando 4 placas) e uma camada extra de borracha de silicone esterilizável entre a placa de acrílico e a estrutura de metal.

A placa de acrílico foi capaz de suportar a compressão necessária para o isolamento dos compartimentos sem sofrer danos, como rachaduras ou quebras. As duas placas de metal antigas foram recobertas com fitas teflon para evitar sua oxidação. Essas fitas de teflon eram trocadas ao final de cada experimento. Foram incluídas, ainda, mais duas novas placas de aço inoxidável. Esse total de 4 placas metálicas de compressão promoveu melhor estabilidade da placa de acrílico.

3. Mesmo com a imposição de pressão negativa (Figura 5.9(d) e (e)), que forçava a saída de meio de cultura de dentro do sistema de compressão do biorreator, ainda se fez necessário um sistema de isolamento no segundo módulo de tubos do sistema de compressão. Para tanto, foi adotada a mesma medida descrita para o primeiro conjunto de tubos: tubos maleáveis foram acoplados à região central dos tubos iniciais e presilhas plásticas foram utilizadas no bloqueio da passagem de meio de cultura (Figura 5.13). Esses pedaços de tubos maleáveis também eram trocados ao final de cada experimento.

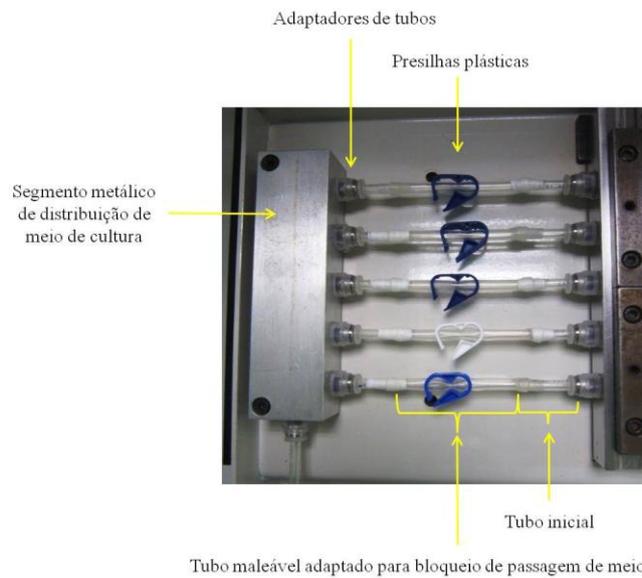


Figura 5.11 – Primeiro conjunto de tubos do sistema de compressão modificado.

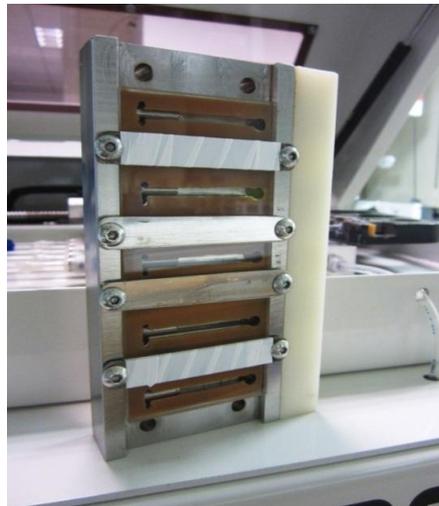


Figura 5.12 - Compartimento porta-amostras modificado.



Figura 5.13 - Segundo conjunto de tubos do sistema de compressão modificado.

5.4. Linhagem osteoblástica - MG 63

Arcabouços cultivados com a linhagem celular MG 63 foram analisados quanto a adesão, a proliferação, a migração e a morfologia celular, antes e depois dos experimentos dinâmicos de aplicação de tensões, traçando um comparativo com arcabouços mantidos em culturas estáticas. As análises foram realizadas com base em imagens de microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e cortes histológicos longitudinais.

5.4.1. Análise de proliferação e organização estrutural citoesquelética (Microscopia confocal)

A análise inicial das culturas estáticas, realizada por 4 e 19 h, permitiu avaliar não só o efeito da técnica de imobilização da FN para a cultura de osteoblastos, como também as futuras modificações promovidas, na cultura celular, pela imposição de tensões.

Na Figura 5.14, estão expostas as micrografias confocais dos arcabouços PHB_H e PHB_{FN} realizadas após experimentos estáticos de 4 h. Após as 4 h iniciais (tempo comum padronizado para os experimentos estático e dinâmicos), foi possível observar células aderidas nos dois arcabouços. Porém, nos arcabouços PHB_H, a quantidade de células foi consideravelmente menor do que nos arcabouços PHB_{FN}. O nível de espraiamento celular também variou, estando as células do arcabouço PHB_{FN} mais espraiadas e com conexões células-célula e célula-substrato (adesão focal) mais estabelecidas (Figura 5.14 (b) e (d)), demonstrando a importância da presença de FN nos arcabouços.

A boa densidade celular e o estágio de início de espraiamento encontrados nos arcabouços sem recobrimento proteico (Figura 5.14(a) e (c)) podem ser atribuídos à microestrutura do arcabouço que apresenta: diferentes tamanhos de poros, boa interconexão entre tais poros, microrrugosidade e polaridade de superfície (KIM *et al.*, 2012, MASAELI *et al.*, 2012, MOLINA *et al.*, 2011, OH e LEE, 2013). WOODRAD *et al.* (2007) mostraram que células ósseas aderem, preferencialmente, na região mais interna dos macroporos dos arcabouços, ao redor dos microporos (poros < 20 µm), onde há maior área de adesão, maior microrrugosidade e maior solubilidade iônica (mais "canais" de conexão que trocam e armazenam sinais químicos secretados pelas células).

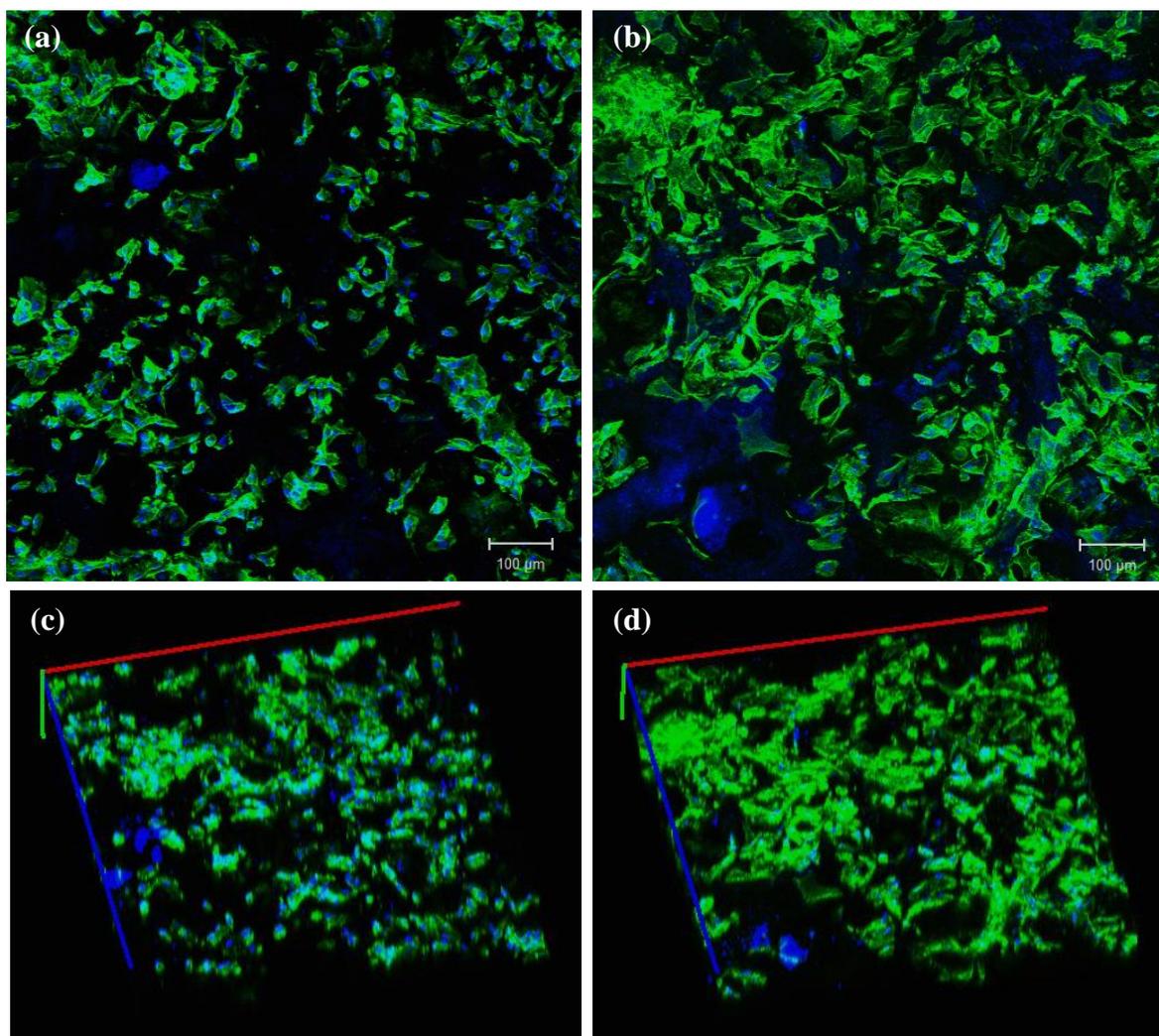


Figura 5.14 - Imagens de microscopia confocal de arcabouços PHB_H (a, c) e PHB_{FN} (b, d) após 4 h de adesão estática, de células MG 63, em projeção 2D (a, b) e, a mesma imagem, em visão 3D (c, d). O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.

O osso é um tecido sensível a carregamentos mecânicos e responde a estes carregamentos produzindo sinais químicos (mecanotransdução). Tais sinais atuam diretamente na taxa de remodelação óssea, controlando osteoblastos e osteoclastos e, por vezes, podem promover aumento da massa óssea final (SCHWARTZ *et al.*, 2007). Os experimentos de aplicação de tensões são avaliados, de forma qualitativa e comparativa, entre si mesmos e entre experimentos estáticos que seguem em paralelo.

A partir da análise do experimento estático após 19 h (Figura 5.15(a) e (b)) tem-se que, nos arcabouços PHB_H (Figura 5.15(a)), além de haver menor quantidade de células, quando comparado aos arcabouços PHB_{FN} na mesma condição de cultivo (Figura 5.15(b)), há maior irregularidade na disposição dos pontos de adesão, com

acúmulos de actina em regiões aleatórias do citoesqueleto celular (indicados por setas Figura 5.15(a)). Essa aleatoriedade é característica de adesão celular sobre superfícies não-bioativas porém biocompatíveis. Nessas superfícies, as células aderem em áreas estruturalmente favoráveis (ex: área de borda de poroso ou de alta microrrugosidade) e iniciam o processo de produção e secreção da sua própria matriz extracelular, otimizando o reconhecimento à superfície e a colonizando.

Ainda no arcabouço PHB_H após 19 h de cultura estática, é possível observar o movimento migratório celular, por emissão de lamelipódios (indicados por setas vermelhas na Figura 5.15(b)) e de alguns filopódios (indicados por setas amarelas na Figura 5.15(b)) pelo citoplasma celular. O mecanismo de movimentação celular sobre um substrato sólido envolve: impulsão de estruturas ricas em actina para fora da face anterior da célula, ligação destas estruturas com o substrato através das integrinas e tração da parte traseira da célula (ALBERTS *et al.*, 2010). Tais estruturas impulsionadas são denominadas lamelipódios e caracterizadas pela desordem local dos feixes de actina. No processo de tração, podem ser formados filopódios, que são estruturas caracterizadas pelo alinhamento paralelo das fibras de actina, originando finos feixes de alta tensão de interação célula-substrato (ALBERTS *et al.*, 2010). Filopódios também podem ser formados para impulsionar o citoplasma à migração, quando sobre superfícies com alto reconhecimento celular. A migração celular é um processo normal e de grande importância para a estruturação tecidual. De outra parte, nos arcabouços PHB_H, possivelmente devido à ausência de substrato bioativo e à necessidade das células de sintetizar as suas próprias proteínas de matriz, reestruturando quimicamente as superfícies para a colonização/migração, há efeito migratório em direções aleatórias, dificultando a organização tecidual (Figura 5.15(c)).

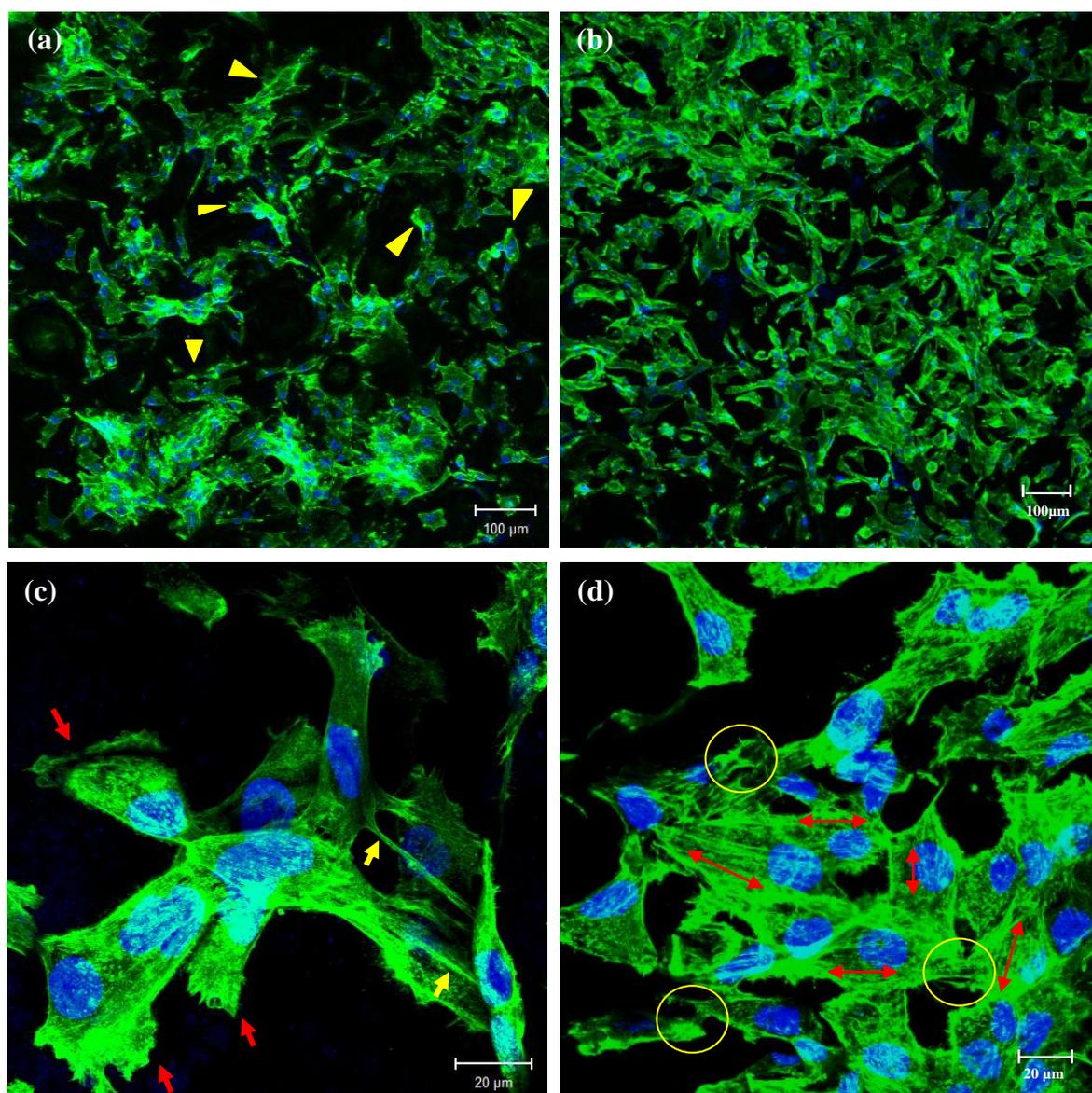


Figura 5.15 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB_H (a, c) e PHB_{FN} (b, d), em diferentes ampliações, após 19 h de cultura estática de MG 63. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.

No arcabouço PHB_{FN}, por haver recobrimento proteico prévio, as células apresentaram melhor organização do citoesqueleto de actina, com alinhamento interno de fibras contráteis (indicado por setas vermelhas na Figura 5.15(d)), o que lhes confere, individualmente (já que cada célula segue própria direção de alinhamento), melhor estabilidade de ligação à superfície polimérica e maior rigidez (GANDINIER *et al.*, 2009). A melhor organização citoplasmática e a bioativação do substrato proporciona a essas células maior emissão de filopódios, aumentando os pontos de adesão focal e

permitindo conexão mais estável entre células mais distantes (indicada por círculos amarelos na Figura 5.15(d)). O índice de espraiamento dos osteoblastos tem efeito direto na capacidade de reconhecimento e resposta a sinais químicos, como fatores de crescimento e prostaglandinas (também conhecidas como "hormônios locais") (SCHWARTZ *et al.*, 2007). Por outro lado, a orientação das fibras do citoesqueleto, promove maior resistência quando sob aplicação de cargas mecânicas (MATSUGAKI *et al.*, 2013).

A passagem de fluxo de baixa tensão promoveu cisalhamento ($< 1 \text{ dyn/cm}^2$) nas paredes dos arcabouços, exercendo efeito direto sobre as células em cultura (Figura 5.16(a) e (b)). Analisando as Figuras 5.16(a) e (c), que apresentam arcabouço PHB_H, após 15 h de imposição de fluxo contínuo, observa-se que o espraiamento celular retrocedeu, levando as células a uma morfologia arredondada. Por essas imagens, é possível observar não só a compactação do núcleo, como também a diminuição na quantidade inicial de células utilizadas no experimento, o que pode ser demonstrado pela comparação com o arcabouço inicial, após 4 h de cultura estática. Considerando a diminuição expressiva da área de adesão celular à superfície polimérica, provocada pela retração do citoesqueleto e, ainda, que esta superfície não apresenta pontos fortes de ancoramento celular (não é bioativa), é possível considerar que a passagem contínua de fluxo de perfusão, nas condições impostas, promoveu morte e/ou lixiviação de parte das células presentes (Figura 5.17(a) e (c)). Resultado parecido foi obtido por SCHWARTZ *et al.* (2007), pela aplicação de fluxo contínuo unidirecional com tensão abaixo de 1 dyn/cm^2 em superfícies rugosas de titânio, em que encontraram redução no número de células MG 63, nas primeiras 6 a 12 h, e reestabelecimento da densidade celular inicial, após 24 h.

As imagens do arcabouço PHB_{FN}, após 15 h exposto a fluxo de baixa tensão, estão apresentadas nas Figuras 5.16(b) e (d). Observam-se células morfologicamente menores (quando comparadas aos experimentos estáticos de 19 h), porém não arredondadas, como visto nos arcabouços PHB_H expostos à mesma condição de cultivo (Figura 5.16(c)). Tal distinção na resposta celular após cisalhamento pode estar relacionada ao maior índice de espraiamento ou à presença de conexões célula-célula e células-substrato já estabelecidas no início do experimento (Figura 5.14(b)). BJERRE *et al.* (2008) afirmam que as primeiras interações celulares serão determinantes para processos posteriores de proliferação e diferenciação. Já MATSUGAKI *et al.* (2013)

relacionam essas mesmas interações à orientação intracelular das fibras de actina e geração de maior resistência mecânica à imposição de cargas

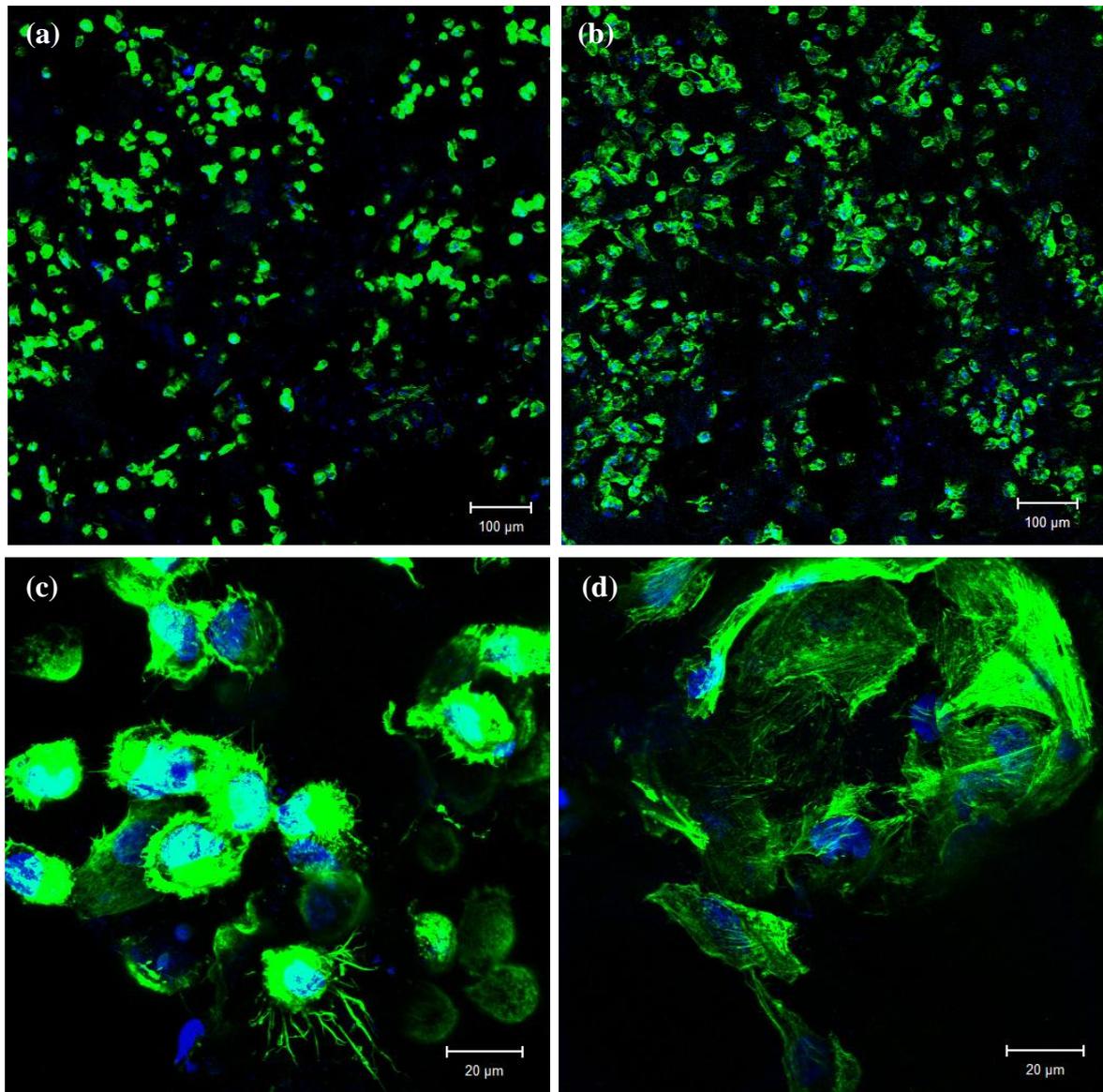


Figura 5.16 - Imagens em plano 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB_H (a, c) e PHB_{FN} (b, d), em diferentes ampliações de cultura de MG 63, após 15 h F/C₀. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.

A quantidade de células presentes no arcabouço PHB_{FN} após a imposição de fluxo não parece ter variado muito, quando comparada à quantidade celular inicialmente utilizada após 4 h de cultura estática (Figura 5.17(b) e (d)). A bioativação por FN parece ter atenuado o efeito de diminuição inicial da densidade celular, por consequência de imposição de fluxo constante, conforme foi demonstrado por SCHWARTZ *et al.* (2007) e visto, nesta pesquisa, a partir dos arcabouços PHB_H (Figura 5.16(c)). KIM *et al.*

(2011) relacionam a bioativação, que otimiza a adesão de células osteoblásticas em ambientes tridimensionais, com o aumento na resposta celular de adesão, na expressão de marcadores de diferenciação e na regeneração tecidual em até 8 dias. Todavia, o porquê da diminuição da densidade celular final após imposição de cisalhamento unidirecional, quando comparado à densidade celular inicial (cultura estática por 4 h), não pôde ser claramente explicado.

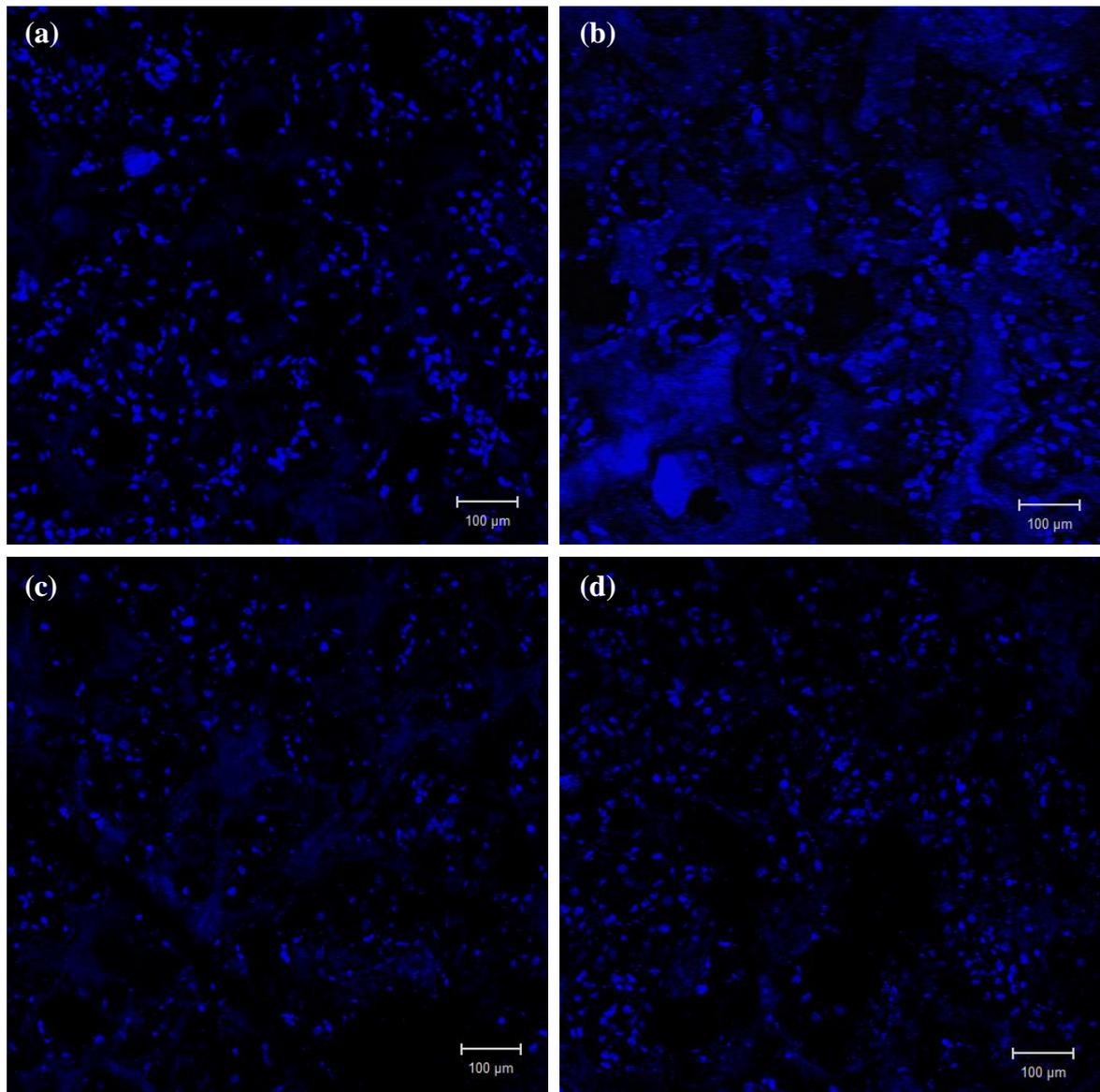


Figura 5.17 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal, mostrando os núcleos celulares de células MG 63, em arcabouços PHB_H (a, c) e PHB_{FN} (b, d), após 4 h de cultura estáticas (a, b) e 15 h F/C₀ (c, d).

Apesar de não promover a proliferação celular nas culturas tridimensionais de curto prazo, a tensão cisalhante unidirecional parece ter atuado no direcionamento da

migração e no início do processo de orientação das fibras de actina do citoesqueleto celular para dentro da rede de poros (sentido de passagem do fluxo).

A Figura 5.18 apresenta alguns ângulos de rotação dos blocos tridimensionais das culturas de MG 63 após cisalhamento unidirecional por 15 h (apresentados, em projeção 2D, nas Figuras 5.16(c) e (d)), com setas amarelas indicando o sentido preferencial de migração ou de orientação do citoesqueleto celular.

A célula indicada na Figura 5.18(a), adsorvida em região de fronteira de poro, aparece com o citoplasma bem compactado e com densa emissão de filopódios curtos para frente (direção de passagem de fluxo) e longos para trás. Esse padrão de emissão de filopódio foi descrito por RAJARAMAN *et al.* (1974) como o segundo estágio de adesão celular. Considerando-se que células osteoblástica apresentam boa interação com superfícies rugosas e regiões de borda (MASAELI *et al.*, 2012, MOLINA *et al.*, 2011, WOORDRAD *et al.*, 2007), essa grande emissão de filopódios pode ser interpretada como positiva, do ponto de vista da microestrutura do material, que, mesmo sem recobrimento proteico prévio, foi capaz de estimular, em algumas regiões de sua superfície, a estruturação desses fortes pontos de adesão. De todo modo, não é possível afirmar se a referida célula está em processo migratório (considerando-se a variação de comprimento dos filopódios) ou em processo de resistência à dessorção.

Rotações ao redor do eixo y da Figura 5.18(a) geram as Figuras 5.18(c) e (e). Nessas estão indicadas (por setas amarelas) células que também não deixam claro se estão em processo de dessorção ou de migração, com emissão de estruturas semelhantes a lamelipódios e aparente orientação na direção de passagem de fluxo.

Na rotação apresentada nas Figuras 5.18(b), (d) e (f), é possível observar células que foram cultivadas em arcabouços PHB_{FN}. A tensão cisalhante unidirecional imposta sobre tais células promoveu o redirecionamento das fibras de actina do citoplasma celular no sentido de passagem do fluxo (Figura 5.16(d)). A reorganização das fibras do citoplasma celular promoveu a retração no estiramento celular inicial, o que provocou leve diminuição do tamanho das células aderidas, mantendo-se, porém, o formato poligonal (como observado no experimento estático de 19 h (Figura 5.15(d))).

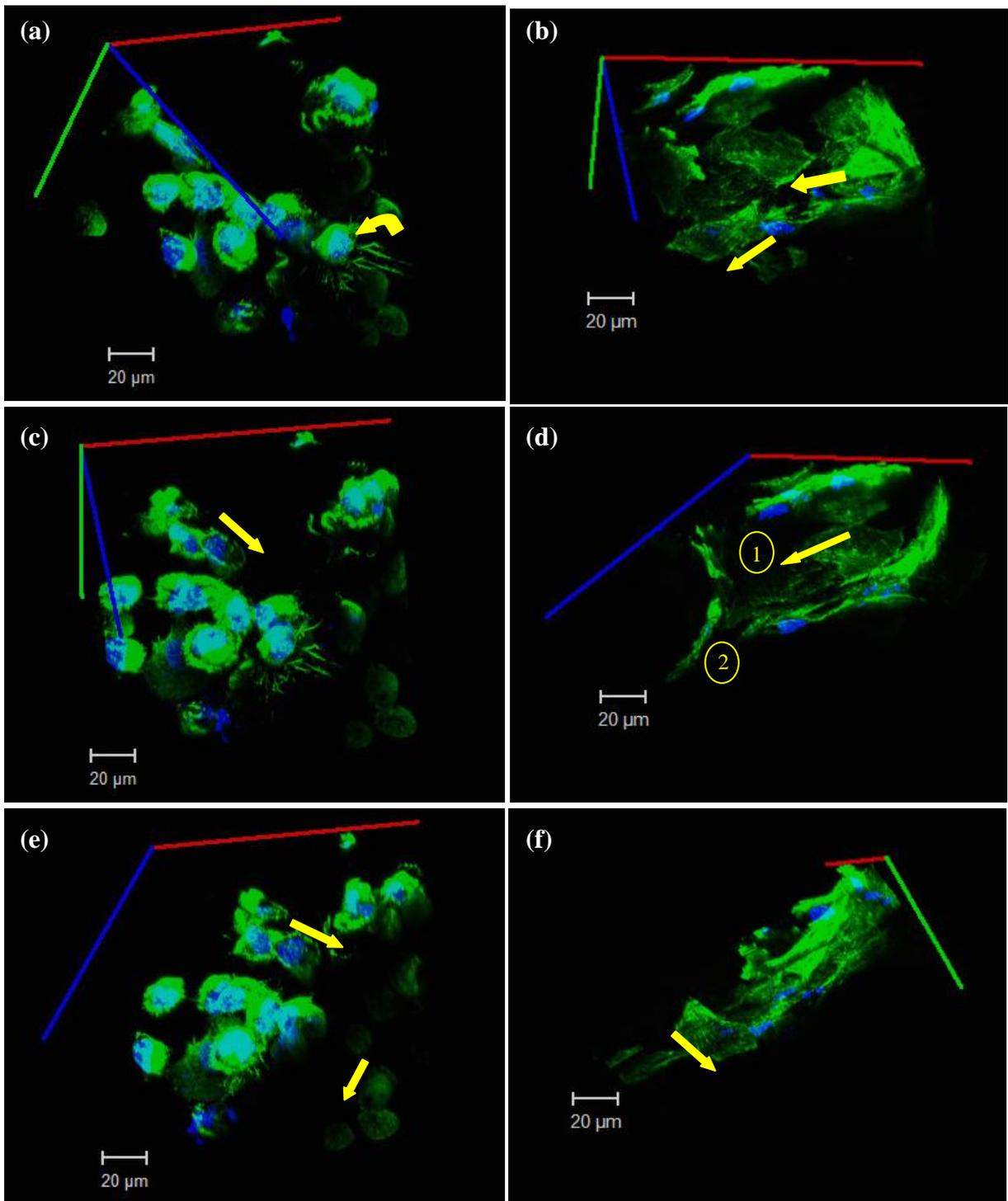


Figura 5.18 - Imagens 3D de microscopia confocal de arcabouços PHB_H (a, c, d) e PHB_{FN} (b, d, 3), com cultura de MG 63, após 15 h F/C₀. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. As setas amarelas indicam a direção de migração da célula ao seu lado.

Nas imagens sequenciais referentes à cultura em arcabouço PHB_{FN}, estão apresentadas células que aderiram dentro de cavidade de poro que apresenta, pelo

menos, dois pontos de interconexão com outros poros. Essas interconexões estão indicadas pelos números 1 e 2 no ângulo de rotação visto na Figura 5.18(d). Conhecendo tais pontos, é possível acompanhar, nas Figuras 5.18(d) e (e), o direcionamento das fibras de actina para seu interior. Esse resultado está de acordo com o descrito no trabalho de THOMPSON *et al.* (2012), que defende que a imposição de cisalhamento por fluxo de perfusão estimula a polimerização de fibras contráteis de actina, alinhadas em sua direção de passagem.

THOMPSON *et al.* (2012) afirmam que, para resistir a tensões, as células necessitam de bom nível de contato com o substrato e entre si. Conhecendo esse pressuposto e o associando aos resultados obtidos nesta pesquisa após cultura dinâmica de cisalhamento unidirecional, pode-se considerar que, para imposição de fluxo de perfusão em cultura sobre arcabouço não-bioativado, o tempo inicial de adesão estática deve ser aumentando. Assim, as células ganhariam mais tempo para secretar proteínas de matriz e estabelecer fortes pontos de adesão, aumentando sua capacidade de resposta.

A imposição de tensão de compressão foi realizada pela movimentação controlada, e pré-estabelecida, do braço mecânico do sistema de compressão do biorreator (indicado pela seta amarela na Figura 5.19(a)). Hastes de metal com extremidades irregulares (destacadas pelo círculo amarelo na Figura 5.19(b) e fixadas no referido braço mecânico) promoviam a compressão pelo fundo dos arcabouços (direção contrária à passagem do fluxo) (Esquema da Figura 4.4). No outro lado, dentro do porta-amostras, havia mais hastes de metal (fixas), também com extremidades irregulares, comprimindo o topo do arcabouço. Como consequência, ao final do experimento, os arcabouços de PHB apresentaram pequenas deformações plásticas nas superfícies externas, como esquematizado na Figura 5.19(c).

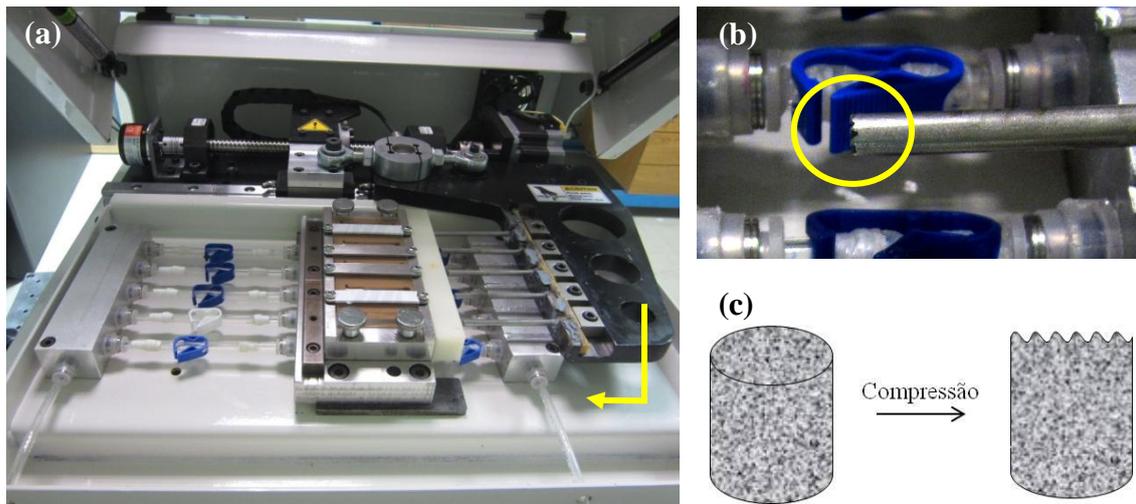


Figura 5.19 - Fotografia das extremidades onduladas das hastes metálicas que promoviam compressão sobre os arcabouços de PHB (b) e representação do arcabouço de PHB após compressão intermitente (c).

As irregularidades das hastes de metal foram importantes para promover não só a maior estabilidade das amostras durante o ensaio dinâmico, evitando-se a fricção haste - amostra, como também para gerar pequenos vincos entre a haste e a superfície do arcabouço, que permitiram acesso do meio de cultura para aporte de nutrientes às células locais.

A imposição de compressão intermitente, com tensão associada à deformação de 2,5% da altura do arcabouço, aplicada junto ao fluxo de perfusão, promoveu respostas celulares bem diferentes quando os dois arcabouços (PHB_H e PHB_{FN}) são comparados, tanto entre si, quanto com os demais experimentos.

Na Figura 5.20, estão mostradas as projeções bidimensionais das microscopias confocais realizadas após ensaio de compressão. De início, observa-se densidade celular elevada nos arcabouços PHB_{FN} , com células bastante conectadas entre si e alta concentração ao redor das fronteiras dos poros (Figura 5.20(b) e (d)). Já nos arcabouços PHB_H , também houve aumento na densidade celular após compressão intermitente, porém o efeito migratório, com preferência para áreas de bordas de poros, não foi tão evidente (Figura 5.20(a)).

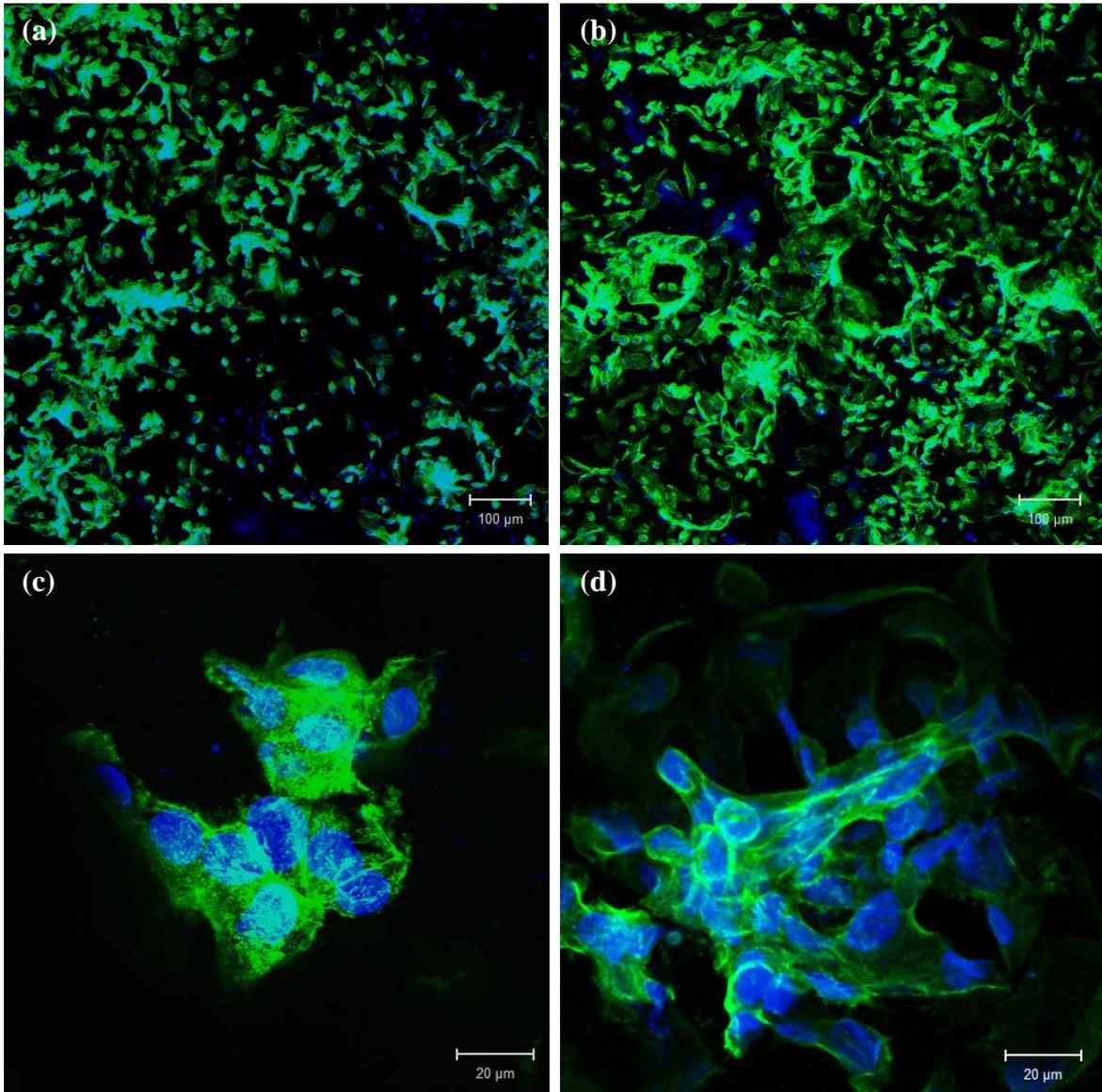


Figura 5.20 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB_H (a, c) e PHB_{FN} (b, d), em diferentes ampliações de cultura de MG 63, após 15 h F/C_{2,5}. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul.

SITTICHOCKECHAIWUT *et al.* (2009) estudaram a colonização de células de linhagem osteoblástica em arcabouços de poliuretano, com compressão intermitente direta, por 2 h diárias (1 Hz, 5% de deformação), aplicadas nos dias 5, 10 e 20 da cultura. Os autores acompanharam o processo de migração celular para as regiões de bordas de poros, iniciado no 1º dia de carregamento e desenvolvido em outros 5 para formar aglomerados ao redor dos poros.

Na pesquisa desta tese, quando analisados arcabouços sem recobrimento proteico (PHB_H), os efeito migratório também não foi observado logo após o tempo

experimental. Porém, nos arcabouço bioativados por FN, o processo de migração celular e de aglomeração nas regiões de borda de poros apareceu como efeito direto da aplicação de compressão intermitente, sendo visto logo após o carregamento de 15 h. Assim, pode-se supor que o grau de reconhecimento entre as células e a superfície de adesão influenciou diretamente na resposta migratória ao carregamento.

Alguns estudos de cultivo celular em ambiente dinâmico atribuem à proteína transmembrana integrina o papel de agente de transdução de sinais mecânicos em sinais bioquímicos, por intermediar diretamente a ligação entre proteínas adesivas da matriz extracelular e proteínas do citoesqueleto celular (PEAKE *et al.*, 2000, THOMPSON *et al.*, 2012). Estudos com grupos variados de células (ex: células endoteliais, fibroblastos, condrócitos e células ósseas) que impuseram carga mecânica diretamente sobre as proteínas integrinas (ou sobre suas subunidades) obtiveram resultados morfológicos e bioquímicos relevantes, tais como:

- Aumento de tensão no citoesqueleto celular - O aumento na concentração de proteínas transmembrana nos pontos de adesão focal estimula a polimerização de actina (PEAKE *et al.*, 2000, THOMPSON *et al.*, 2012).

- Aumento na concentração de íons Ca^{2+} livres no citoplasma celular - Esses íons atuam no estímulo à liberação de ATP (GANDINIER *et al.* (2009)) e na superexpressão do genes de proliferação e diferenciação celular (PEAKE *et al.*, 2000, RUMNEY *et al.*, 2012).

- Estimulação de proteínas cinases ativadas por mitógeno - Tais proteínas transmitem sinais extracelulares ao núcleo, para a transcrição de genes específicos, regulando a proliferação e diferenciação celular (ALBERTS *et al.*, 2010).

- Indução de fosforilação de proteínas tirosina-cinase - Grupo de proteínas que agem em cascata de reação, promovendo a regeneração de filamentos de actina (ALBERTS *et al.*, 2010).

Diferentes pesquisas já descreveram algumas repostas de natureza física e bioquímica relacionadas à compressão intermitente, quando imposta a arcabouços porosos cultivados com células ósseas, e ao fluxo oscilatório gerado durante o carregamento mecânico, tal como: transporte de massa efetivo ao longo da estrutura do arcabouço (CHUNQIU *et al.*, 2007), aumento da expressão de genes relacionados à proliferação celular (CHUNQIU *et al.*, 2007, KLEIN-NUELND *et al.*, 1986, RUMNEY *et al.*, 2012), aumento da expressão de genes relacionados à produção e à deposição de matriz extracelular (SITTICHOCKECHAIWUT *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2005),

aceleração no processo de mineralização de matriz extracelular (SITTICHOCKECHAIWUT *et al.*, 2009), maior liberação de ATP (RUMNEY *et al.*, 2012) e elevação na atividade da fosfatase alcalina e de outros marcadores típicos de diferenciação de células osteoblásticas (ex: osteopontina, osteocalcina e colágeno tipo I) (KLEIN-NUELND *et al.*, 1986, SITTICHOCKECHAIWUT *et al.*, 2009).

O efeito proliferativo, que aparece como consequência do ensaio de compressão intermitente, nos arcabouços PHB_H e PHB_{FN}, pode ser visto na Figura 5.21. Na Figura 5.21(a) e (b) estão corados, em azul, os núcleos celulares após cultura estática por 19 h, enquanto, na Figura 5.21(c) e (d), estão corados os núcleos após ensaio dinâmico compressivo.

TANAKA *et al.* (2005) aplicaram compressão intermitente em arcabouço de colágeno-hidroxiapatita (com volume total = 640 mm³), imerso em meio de cultura, promovendo tensão de cisalhamento, de natureza oscilatória, de 3 dyn/cm² (valor estimado) e elevando os níveis de produção, síntese e mineralização de matriz extracelular. Os autores mostraram a diminuição do cisalhamento provocado pelo fluxo em 1,8 vezes quando um arcabouço puro de colágeno apresentava tamanho de poros igual a 22 ± 7 µm, e em 8 vezes, quando um arcabouço puro de colágeno apresentava tamanho de poros igual a 89 ± 28 µm. A pesquisa mediu, ainda, aceleração de até 5 vezes da velocidade do fluxo nas bordas do arcabouço. Considerando-se que os arcabouços de PHB utilizados na pesquisa desta tese apresentam volume 10 vezes menor e que a compressão intermitente foi aplicada juntamente a um fluxo de perfusão (com cisalhamento estimado em 1 dyn/cm²), pode-se supor que a tensão de cisalhamento final encontrou-se dentro do intervalo de tensões cisalhantes atribuído ao tecido ósseo *in vivo* (1 - 10 dyn/cm² (WEINBAUM *et al.*, 1994)).

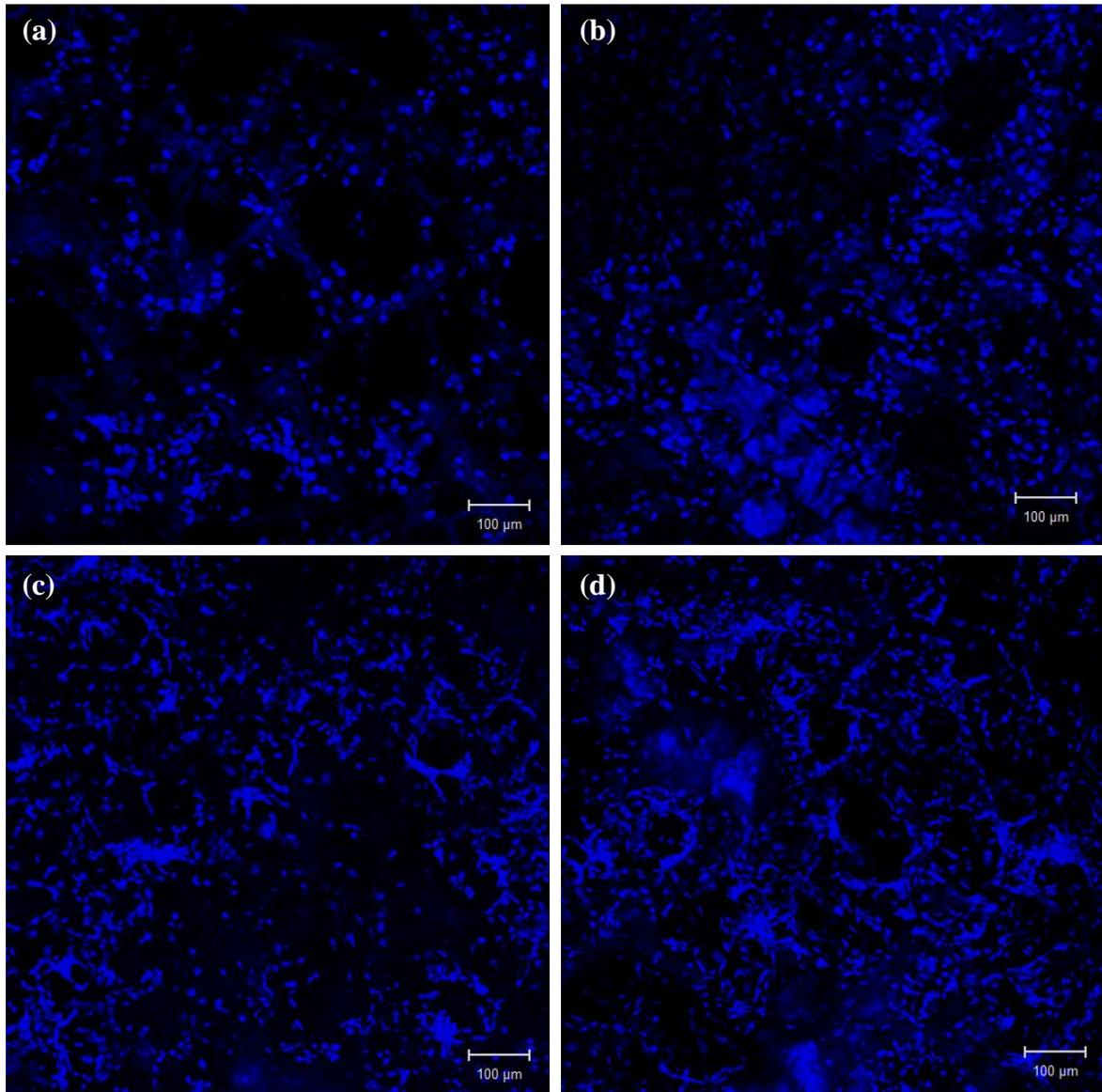


Figura 5.21 - Imagens em projeção 2D de microscopia confocal, mostrando os núcleos celulares de células MG 63, em arcabouços PHB_H (a, c) e PHB_{FN} (b, d), após 19 h de cultura estática (a, b) e 15 h F/C_{2,5} (c, d).

O efeito proliferativo, observado nos arcabouços de PHB_H, apenas nos experimentos de compressão intermitente pode ser explicado, com base na literatura, pelo efeito da tensão cisalhante de natureza oscilatória que estimula a produção e síntese de componentes de matriz extracelular (TANAKA *et al.*, 2005). Esse estímulo, provavelmente, acelerou a estruturação de revestimento bioativo, elevando o nível de reconhecimento celular e aumentando os pontos de interação integrina-arcabouço. Esse maior reconhecimento célula-substrato refletiria um maior volume de informações que chegam ao citoplasma celular na forma de sinais bioquímicos (transduzidos pela

integrina), acelerando respostas metabólicas (RUMNEY *et al.*, 2012). Na pesquisa de SITTICHOCKECHAIWUT *et al.* (2009), foi demonstrado que, mesmo com baixa interação celular à superfície de arcabouço de poliuretano não-bioativado, células de linhagem osteoblástica foram capazes de sintetizar a própria matriz extracelular e acelerar sua produção quando sob carregamento mecânico.

Assim, para o arcabouço PHB_H, o efeito da propagação da deformação imposta e da promoção de fluxo oscilatório pode ter gerado o ciclo de "síntese de proteínas de matriz / maior reconhecimento célula-superfície / aceleração de metabolismo celular / produção de proteínas de matriz", que explicaria o aumento da densidade celular final observado após o experimento F/C_{2,5}.

Nos arcabouços PHB_{FN}, por haver maior densidade de pontos de interação célula-superfície no início do carregamento mecânico (Figura 5.14(b)), os efeitos da deformação estrutural da matriz polimérica foram sentidos em maior escala pelas células.

A imagem da Figura 5.21(d) apresenta maior densidade celular, quando comparada às demais imagens mostradas na mesma Figura, e formação de aglomerados celulares ao redor das áreas de borda de poro. Nessa imagem também é possível visualizar o alongamento dos núcleos celulares, indicando alteração na morfologia celular final (tal efeito de alongamento, em menor intensidade, também pode ser visualizado nas células de borda de poros, cultivadas sobre o arcabouço PHB_H (Figura 5.21(c)).

GANDINIER *et al.* (2009) apontaram, como resposta à compressão intermitente de cultura de células de linhagem osteoblástica, a elevação de íons Ca²⁺ no citoplasma celular. Esses íons em excesso levariam, por uma série de reações citoplasmáticas, à polimerização de fibras de actina no citoesqueleto. Outras pesquisas (GANDINIER *et al.* 2009; PEAKE *et al.*, 2000, RUMNEY *et al.*, 2012) também apontaram aumento na concentração de íons Ca²⁺ livres no citoplasma celular, com superexpressão de genes atuantes na regulação da proliferação e da diferenciação celular (ANGEL e KARIN, 1990). No experimento de imposição de compressão intermitente (5% de deformação e 1 Hz) de SITTICHOCKECHAIWUT *et al.* (2009), foi mostrado que, após 2 h de carregamento e 10 h em cultura estática, células de linhagem osteoblástica aumentaram muito a expressão de osteopontina, osteocalcina e colágeno tipo I (todos marcadores típicos de diferenciação celular).

A tensão de cisalhamento imposta à culturas *in vitro* de osteoblastos, que promove a deformação das membranas celulares (com ativação de canais iônicos (DUNCAN e TURNER, 1995)), é considerada como primeiro estímulo físico sentido pelas células ósseas, no sentido de adaptação (GANDINIER *et al.*, 2009). JAGODZINSKI *et al.* (2008) afirmaram que a tensão cisalhante atua nos processos de proliferação celular, enquanto a tensão de deformação atua nos processo de diferenciação.

Na pesquisa realizada nesta tese, as células osteoblásticas, cultivadas em diferentes superfícies de arcabouços porosos de PHB, apresentaram respostas bastante diferentes quanto à morfologia após compressão intermitente. Nos arcabouços PHB_H, apesar do aumento na densidade celular (Figura 5.20(a)) e da leve alteração na morfologia do núcleo que pode ser visto de algumas células (Figura 5.21(c)), outras ainda apresentaram alta desordem das fibras de actina do citoesqueleto e morfologia não espalhada, indicando taxa de adesão lenta (Figura 5.20(c)). Tal efeito heterogêneo está relacionado ao fato de as superfícies poliméricas desse arcabouço não apresentarem recobrimento bioativo, o que leva à distribuição celular aleatória, com variações estruturais e diferentes graus de interação à superfície. Áreas de maior concentração de bordas de poros ou de maior rugosidade apresentam mais pontos físicos de interação celular, resultando em células mais estiradas e com organelas organizadas de acordo com a direção de espalhamento celular. Por ser um evento condicionado a regiões específicas da superfície polimérica, não pode ser notado em todas as células aderidas, como ilustrado nas Figura 5.20(a) e 5.21(c).

Deve-se considerar ainda que a compressão intermitente e o fluxo cisalhante não exercem a mesma tensão mecânica em toda a estrutura do arcabouço. A presença de poros de variados tamanhos e com distribuição aleatória (condição similar à encontrada no osso trabecular) provoca diferentes níveis de resistência à passagem de fluxo (cisalhamento) e à propagação da tensão de deformação. A tensão de cisalhamento é aumentada com a diminuição do tamanho dos poros (TANAKA *et al.*, 2005), enquanto a intensidade de propagação da deformação está relacionada às propriedades mecânicas do material, o qual deve permitir sua deformação estrutural em níveis suficientes para ativar a resposta celular (Figura 2.5) (ETHIER e SIMMONS, 2013) e para gerar fluxo oscilatório interno (Figura 2.6) (CHUNQIU *et al.*, 2006, DUNCAN e TURNER, 1995).

Nos arcabouços PHB_{FN}, a intensificação do efeito de migração celular para a região de borda de poros permitiu o revestimento das cavidades internas destes poros,

com elevado contato célula-célula pelos pontos de interconexão (Figura 5.20(d)). Na Figura 5.22, estão apresentadas rotações tridimensionais do arcabouço após ensaio de compressão intermitente (referente à Figura 5.20(d)).

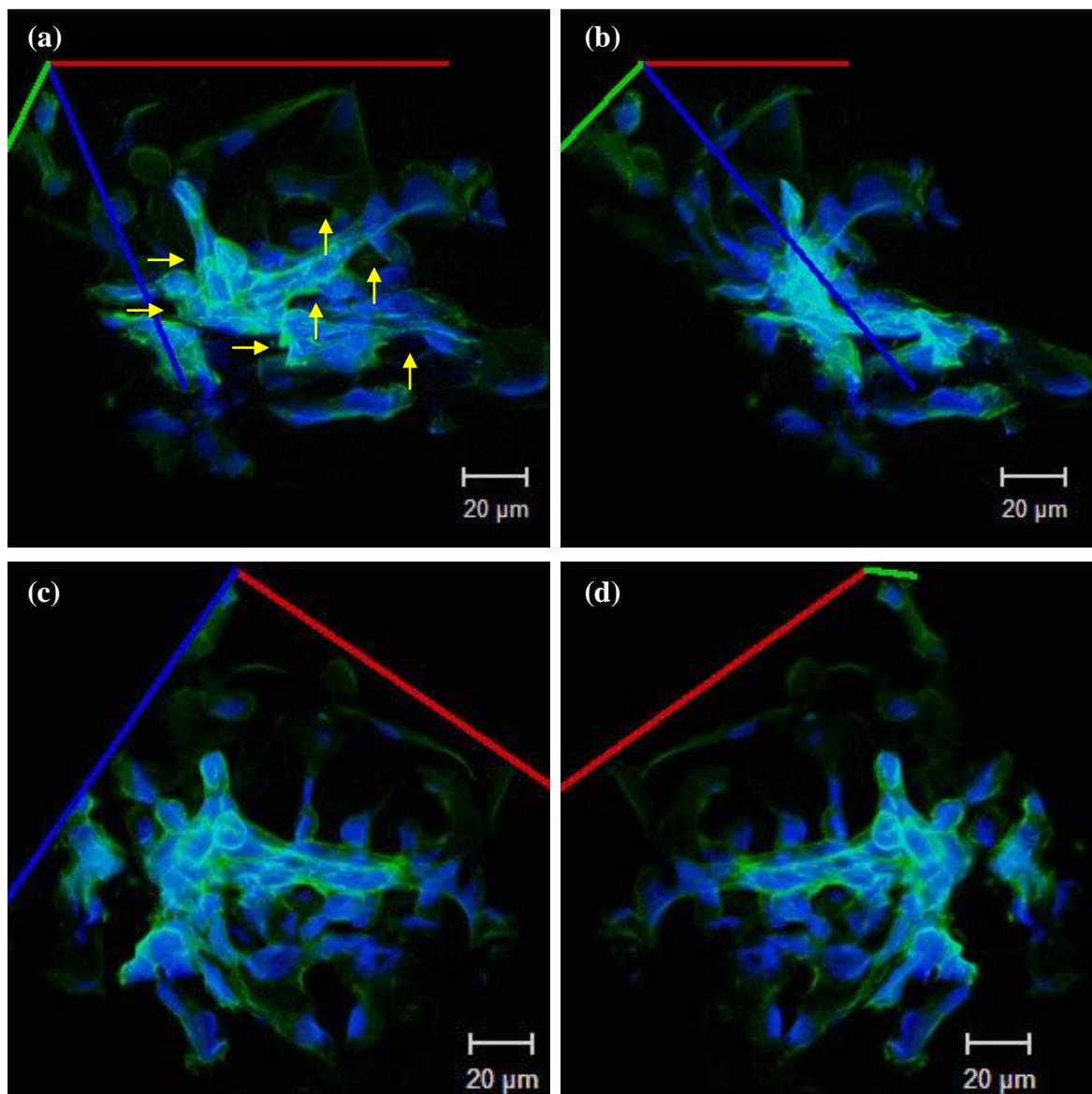


Figura 5.22 - Imagens 3D de microscopia confocal de arcabouços PHB_{FN}, com cultura de MG 63, após 15 h F/C_{2,5}. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. As setas amarelas indicam pontos de interconexão de poros.

Pelas imagens em rotação apresentadas na Figura 5.22, é possível observar o alongamento celular que segue a morfologia dos poros, recobrando concavidades e promovendo grande rede de conexões com as células vizinhas. Também é possível

perceber o direcionamento do alongamento celular, preferencialmente em sentido perpendicular ao de aplicação de tensão de deformação. Ou seja, o alongamento celular segue o sentido de expansão (efeito secundário resultante da deformação por compressão - Figura 2.5).

Ainda sobre a cultura nos arcabouços PHB_{FN}, a alteração da morfologia celular de poligonal para alongada, com aumento da área de interação da integrina com a superfície do arcabouço, e a intensificação dos contatos intercelulares (Figura 5.20(d)) são efeitos relacionados ao processo de diferenciação celular. No trabalho de PEAK *et al.* (2000), o efeito da compressão na modulação da adesão mediada por integrinas também mostrou ter ação direta no processo de diferenciação de células osteoblásticas, que foi representado pela diminuição ou inibição da síntese de DNA e alteração do potencial de membrana.

A polimerização e a orientação das fibras de actina no citoesqueleto de células submetidas à compressão foi associado pela literatura tanto aos estímulos transduzidos pela integrina aderida ao substrato (INGBER e FOLKMAN, 1989) como à sinalização oriunda de adesões intercelulares (THOMPSON *et al.*, 2012). GANDINIER *et al.* (2009) afirmaram que a polimerização e a organização das fibras de actina estimuladas por deformação intermitente podem resultar na elevação de 4 a 6 vezes do índice de rigidez do citoesqueleto de osteoblastos cultivados em monocamadas. Ainda segundo a literatura, a rigidez celular e a alta densidade de fibras de actina orientadas paralelamente conduzem à reorientação e à organização consistente de organelas citoplasmáticas (INGBER e FOLKMAN, 1989).

A transdução realizada pelas integrinas, quando sob carregamento mecânico, e a sinalização pelas adesões intercelulares podem estar relacionadas às alterações morfológicas mostradas nas Figura 5.20(d) ou 5.21(d), em que os núcleos celulares estão estendidos, seguindo sentido de alongamento celular.

Em áreas de menor densidade celular, nas superfícies do arcabouço PHB_{FN}, muitas células ainda apresentavam morfologia poligonal (característica de células da linhagem osteoblástica MG 63 não diferenciada), parecendo estar no meio de processo de alinhamento de citoesqueleto ou em fase migratória. Na Figura 5.23, está apresentada uma dessas áreas de menor densidade celular, em que aparecem diferentes estágios de resposta celular sobre um mesmo arcabouço PHB_{FN}, após experimento F/C_{2,5}.

A Figura 5.23(a) ilustra a projeção 2D, com setas indicando as diferentes orientações de alinhamento do citoesqueleto de células, ou grupo de células, identificadas por números.

Nas Figuras 5.23(a) e (b), a célula de número 3 aparece com citoesqueleto formado por alta densidade de fibras contráteis de actina, dispostas paralelamente umas às outras. Por se apresentar em estágio inicial de formação de conexões célula-célula, o direcionamento do citoesqueleto ainda não segue o padrão das células vizinhas. Pelo fato de a alta polimerização de actina enrijecer as células, provavelmente estas não se encontram mais em processo migratório. Já no grupo de células identificado pelo número 4, existe direcionamento do citoesqueleto, de forma perpendicular ao sentido de aplicação de forças, revestindo uma concavidade de poros (também visível na Figura 5.23(d)).

Na Figura 5.23(c), as células identificadas pelos número 1 apresentam morfologia arredondada, diferentemente do padrão espreado encontrado ao final do experimento. De outro modo, as células de número 2 aparecem estiradas, com orientação para dentro da conexão de poro, que passa por baixo da região onde está estruturado o grupo de número 4. Por haver baixa densidade celular nesta região (grupo celular número 2), a orientação do citoesqueleto segue o sentido de aplicação de tensão de compressão para dentro do poro, similar ao processo migratório de colonização.

O ângulo de rotação que mostra o fundo da imagem tridimensional é apresentado na Figura 5.23(d), em que estão destacados os grupos de alta densidade celular, respectivamente 4 e 5. Nesses grupos a morfologia celular final segue a morfologia da concavidade dos poros, com alongamento em direção perpendicular ao de aplicação de tensão compressiva, como mostrado nas Figura 5.20(d) e 5.22.

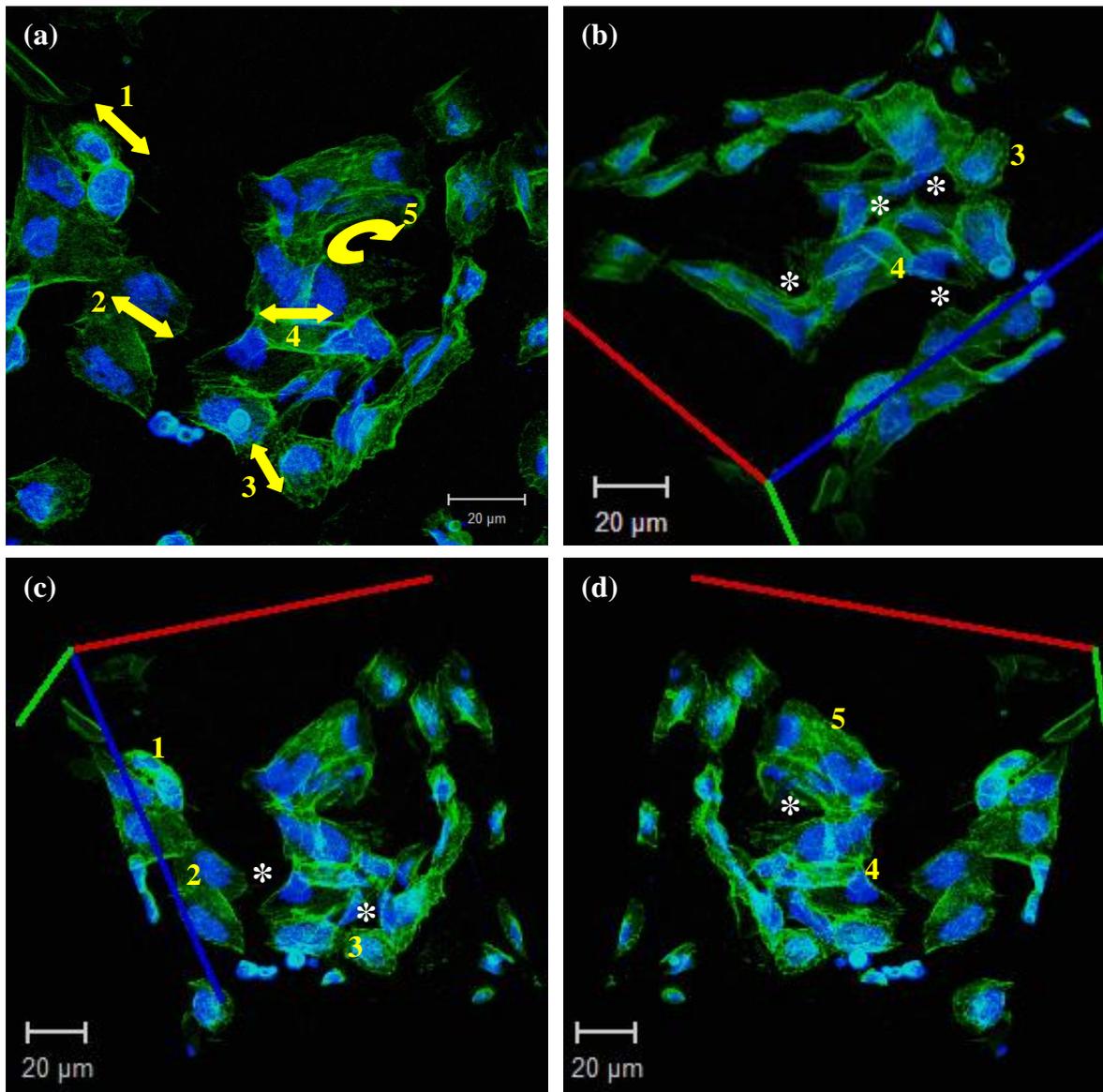


Figura 5.23 - Imagens em projeção 2D (a) e 3D (b, c, d) de microscopia confocal de arcabouços PHB_{FN}, com cultura de MG 63, após 15 h F/C_{2,5}. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. Números (1, 2, 3, 4) destacam as células a serem observadas, setas indicam a orientação do seu citoesqueleto e (*) indica área de interconexão entre poros.

SITTICHOCKECHAIWUT *et al.* (2009) consideraram a tensão de deformação de 5%, aplicada em arcabouço poliméricos, como sendo o nível ótimo para formação óssea. Por outro lado, a utilização desse mesmo índice de deformação nas culturas de MG 63 sobre arcabouços PHB_{FN}, resultou em morte celular. Nas imagens da Figura 5.24(a) e (b), é possível observar algumas poucas células que permaneceram vivas após o experimento dinâmico, e, indicado por setas amarelas, se encontram alguns

aglomerados de cromossomos, expostos após a morte celular e destruição do envoltório nuclear.

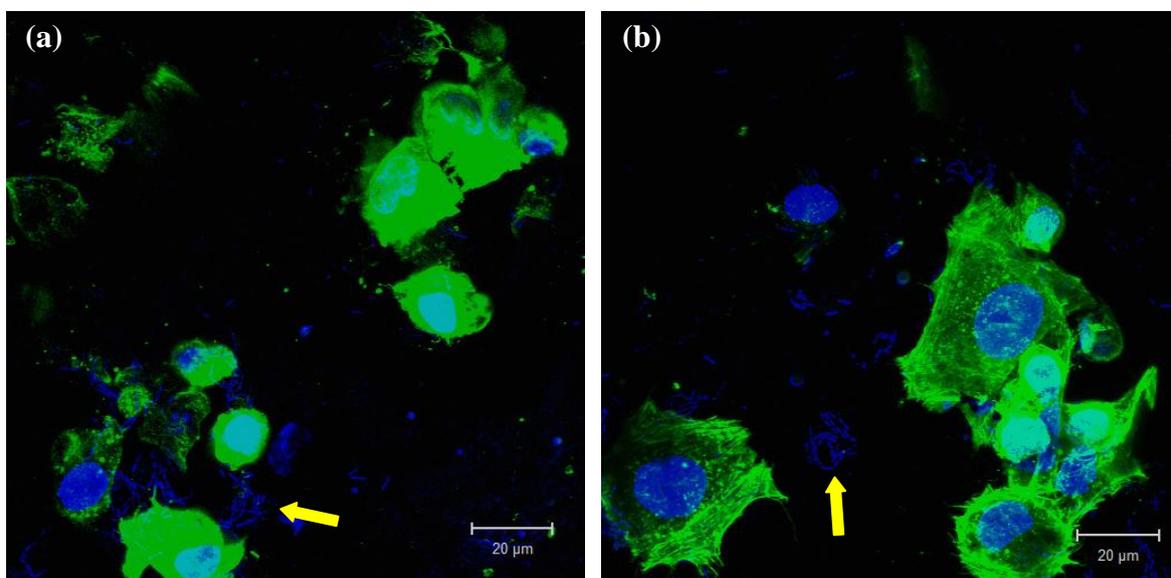


Figura 5.24 - Imagens projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB_{FN}, com cultura de MG 63, após 15 h F/C₅. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares (ou cromossomos), em azul. As setas amarelas indicam aglomerações de cromossomos.

O último experimento proposto foi devido ao fato de que, após 15 h de compressão intermitente com 2,5% de deformação, era possível observar modificações na disposição e na morfologia da linhagem osteoblástica MG 63, possivelmente iniciando o processo de diferenciação celular. Os resultados morfológicos obtidos em tais experimentos seguiram a mesma linha dos resultados metabólicos e moleculares apresentados pela literatura. Apesar das evidências apontarem para a indução de diferenciação em osteócito, a morfologia característica dessas células ainda não está visível.

Quando o arcabouço PHB_{FN} após experimento F/C_{2,5} foi recolocado em cultura estática por mais 9 h, foi possível visualizar algumas células com morfologia bastante diferenciada do padrão poligonal. Na Figura 5.25, estão indicadas, por setas brancas, algumas células com essa alteração morfológica, apresentando formato estrelado e com muitas projeções.

A alteração morfológica observada no experimento F/C_{2,5} + 9 h de cultura estática foi similar ao obtido por BLASSIO *et al.* (2005) em um experimento de indução

metabólica de diferenciação. Os autores induziram a diferenciação de células MG 63 em osteócitos, a partir de processos de ativação e desativação proteica, por cascatas de reações citoplasmáticas. A indução à diferenciação gerou alteração drástica da morfologia celular, do padrão poligonal para o estrelado, com longas projeções citoplasmáticas e muitas conexões célula-célula (observadas por microscopia eletrônica de varredura). Porém, 72 h após cessar os estímulos bioquímicos, os efeitos de alteração morfológica retrocederam, devolvendo o formato poligonal que é característico das células MG 63.

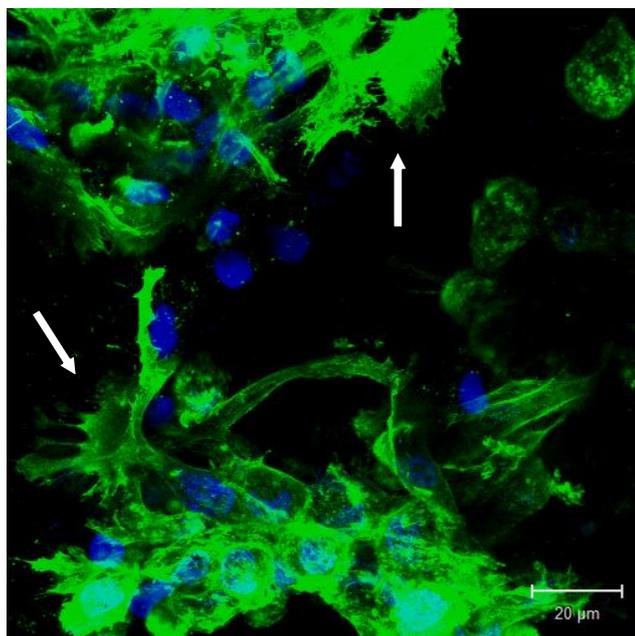


Figura 5.25 - Imagem projeção 2D de microscopia confocal de arcabouços PHB_{FN}, com cultura de MG 63, após 15 h F/C_{2,5} + 9 h de cultura estática. O citoesqueleto de actina está corado em verde e os núcleos celulares, em azul. As setas brancas indicam células com grande alteração morfológica.

Como o experimento F/C_{2,5} + 9 h de cultura estática foi realizado em apenas um arcabouço, não é possível afirmar que esse seja o padrão de resposta osteoblástica. De outra parte, pode-se sugerir que, de acordo com a análise morfológica realizada na pesquisa desta tese e com a revisão fornecida pela literatura a respeito das reações bioquímicas, os padrões experimentais adotados (ex: microestrutura do arcabouço, bioativação, natureza de tensão, tempo de ensaio e intensidade de aplicação) tenham

sido capazes de induzir, em linhagem osteoblástica MG 63, diferenciação morfológica em osteócito.

5.4.2. Análise da morfologia e da distribuição celular nas superfícies (MEV)

A partir de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), é possível analisar a disposição das células nas superfícies porosas dos arcabouços e a sua morfologia ao final de cada experimento.

As micrografias da Figura 5.26(a) e (c) são referentes a arcabouços após 4 h de cultura estática, ou seja, o estado em que as células se encontravam no início do carregamento mecânico. Pela imagem de menor aumento, é possível observar variação no estágio de adesão celular, com células mais e menos espreiadas e conexões célula-célula estabelecidas. Como descrito por RAJARAMAN *et al.* (1974), nos estágios iniciais de adesão celular, designados pelos autores como estágios de crescimento 2 (células globulares com alta emissão de filopódios) e 3 (início de espreiamento por emissão de lamelipódios), há alta atividade metabólica, com projeções membranares de estrutura de forma globular. Tais estruturas globulares podem ser vistas em algumas células presentes nas superfícies PHB_{FN} após 4 h de cultura estática, como demonstrado (por seta vermelha) na Figura 5.26(d).

Após 19 h de cultivo estático, a densidade celular nas superfícies poliméricas foi bastante aumentada (Figura 5.26(b)). Todavia, o crescimento celular não seguiu a topografia do arcabouço, resultando no recobrimento de boa parte dos poros. Esse bloqueio das áreas de poros tem grande impacto na difusão de meio de cultura por dentro da rede, gerando baixo aporte de nutrientes e oxigênio para as células aderidas em áreas mais internas e acúmulo de excretas. Tal barreira física formada pelas células de superfície leva as células aderidas no interior da rede de poro à morte. A Figura 5.26(d) mostra, em detalhe, o processo de fechamento de cavidade de poro por crescimento celular desorientado (indicado por "*" vermelho). Nessa mesma micrografia, também observa-se uma célula (indicada por seta vermelha) em início de espreiamento sobre uma região de depressão, ou de poro de baixo diâmetro, não seguindo a morfologia da superfície e recobrando uma área de depressão.

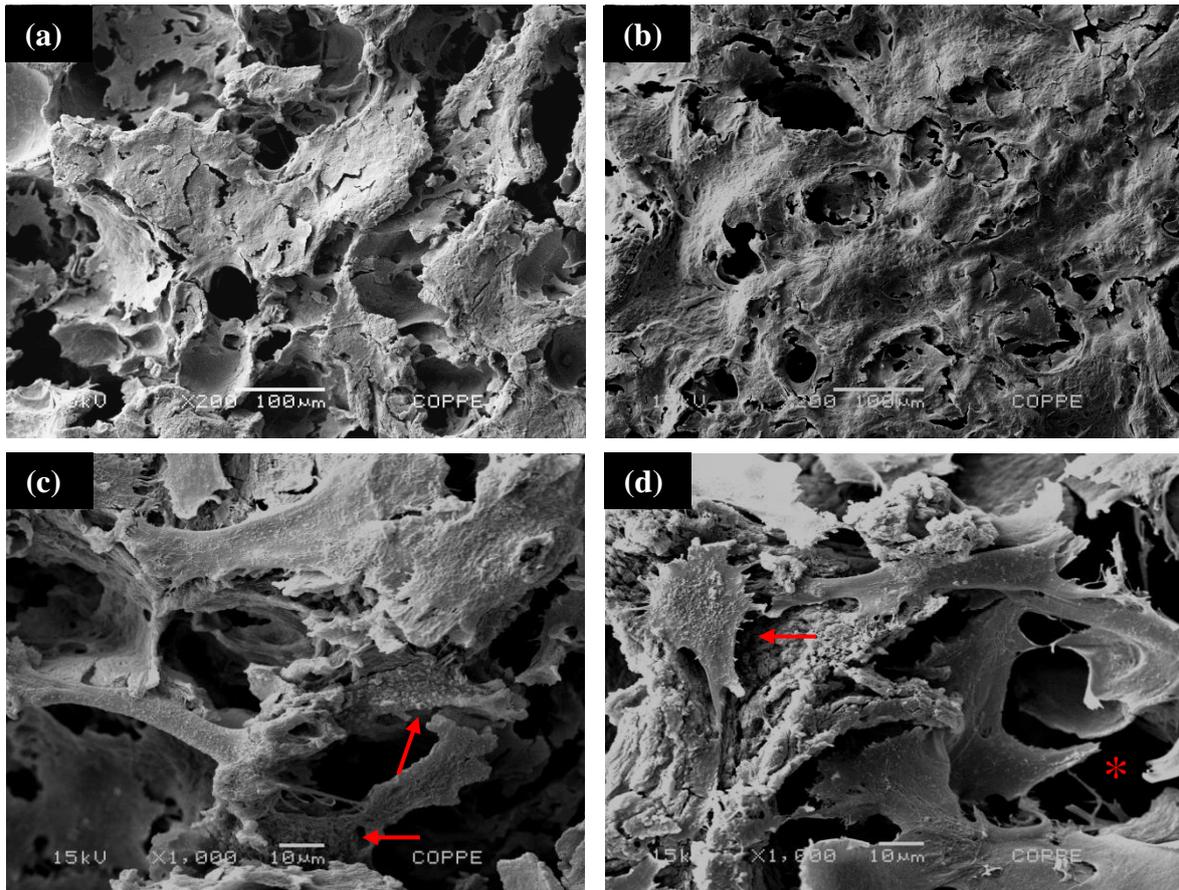


Figura 5.26 - Imagem de MEV de arcabouços PHB_{FN} após cultura estática de MG 63 por 4 h (a, c) e por 19 h (b, d).

Pelas micrografias de ensaio dinâmico de fluxo contínuo unidirecional (Figuras 5.27(a) e (c)), não é possível reafirmar o efeito de manutenção do número celular inicial (após 4 h de adesão estática), observado nas análises de confocal. Contudo, parece ter havido diminuição do metabolismo celular de síntese proteica, com suavização das membranas. A passagem de fluxo não sugere ter afetado muito a disposição celular na estrutura do arcabouço, uma vez que ainda é possível visualizar grande área da rede de poros bloqueada. Uma imagem detalhada de células que sofreram cisalhamento unidirecional está apresentada na Figura 5.28(a). Nessa imagem, é possível observar células com morfologia pouco espreada ou oval e com grande retração de filopódios, em processo de recompactação da densa massa membranar que já havia sido emitida. Alguns desses filopódios se romperam, não podendo a afirmação de que foi efeito da recompactação ou da metodologia de fixação adotadas.

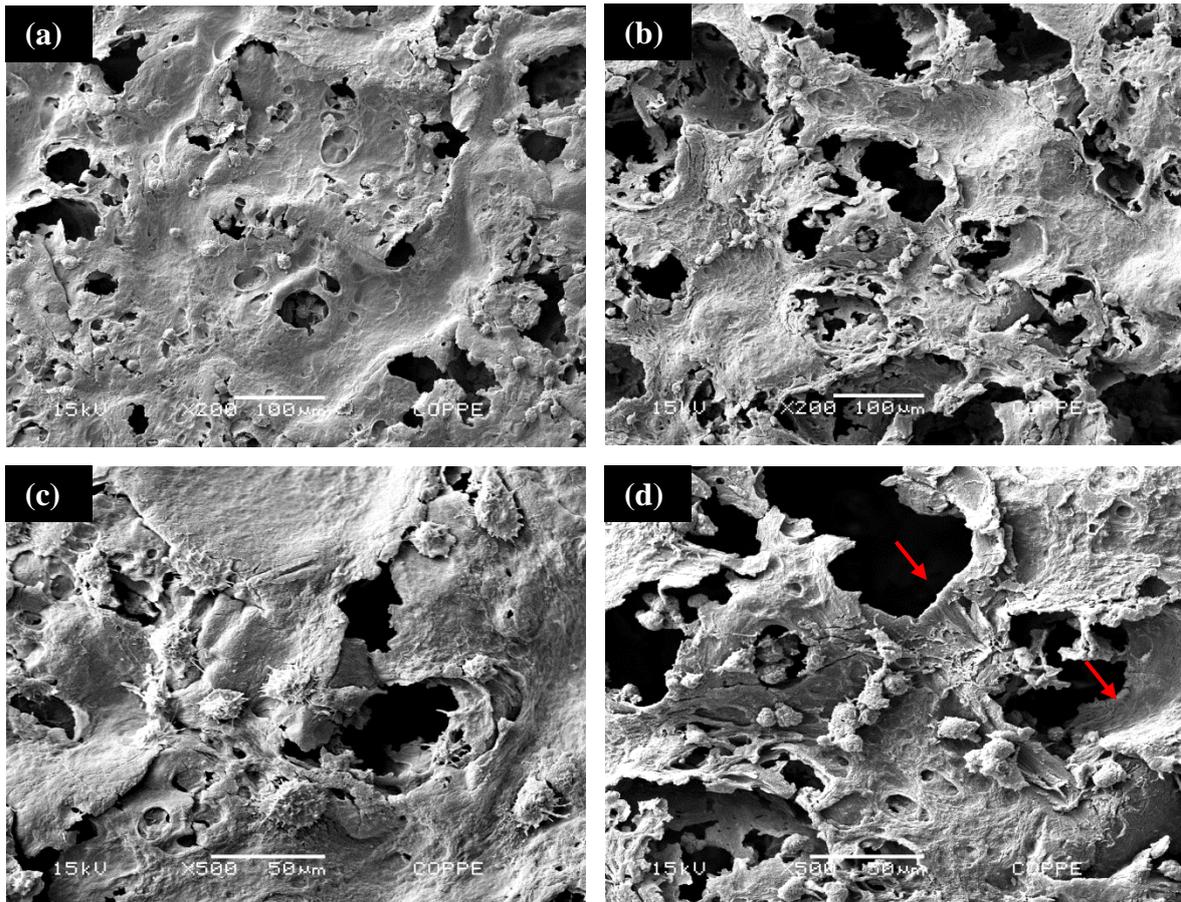


Figura 5.27 - Imagem de MEV de arcabouços PHB_{FN} após cultura dinâmica de MG 63 por 15 h F/C₀ (a, c) e por 15 h F/C_{2,5} (b, d).

Nos arcabouços que sofreram compressão intermitente e, conseqüentemente, fluxo oscilatório, houve diferença bastante evidente na distribuição celular sobre a estrutura (Figuras 5.27(a) e (d)). O bloqueio da rede de poros provocado pelo crescimento celular já não foi mais tão evidente. A imposição de tensão mecânica compressiva reorganizou a disposição celular, de forma a seguir a morfologia da superfície, revestindo bordas e cavidades dos poros, como destacado (por seta vermelha) na Figura 5.27(d).

Ainda no ensaio dinâmico de compressão, é possível observar alta densidade de células jovens, ainda nos estágios iniciais de adesão celular, apresentando morfologia arredondada e algumas já com emissão de lamelipódios (Figura 5.27(b)). A membrana dessas células apresenta elevada densidade de projeções na forma de bolhas (Figura 5.28(b)). Tais projeções também foram observadas em algumas células após 4 h de adesão estática (Figura 5.26(c)), caracterizando alta atividade metabólica.

PAYER *et al.* (2010) cultivaram osteoblastos humanos *in vitro*, em superfícies de alta rugosidade e sob fluxo multidirecional. Os autores obtiveram, após 48 h de ensaio, projeções membranares em forma de bolha e expressão marcadores de diferenciação celular.

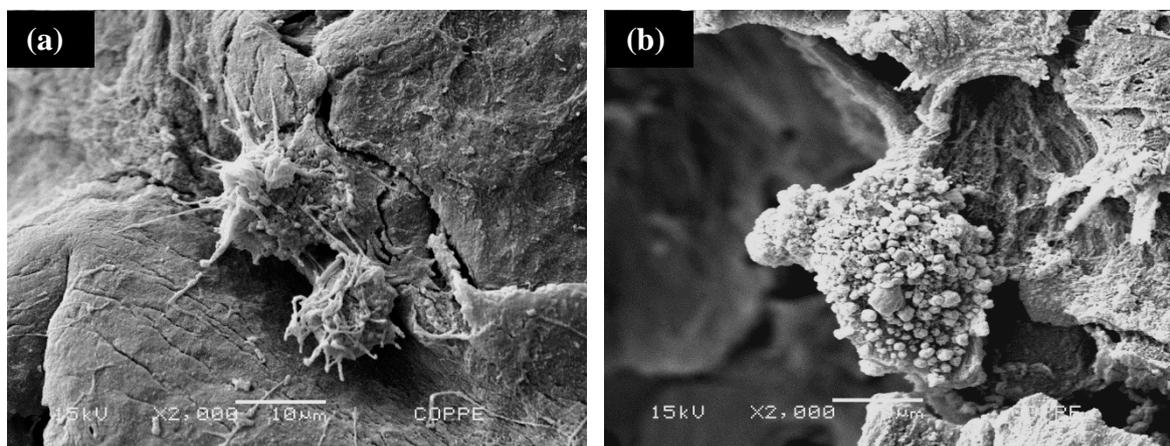


Figura 5.28 - Imagens de MEV mostrando detalhamento da superfície de células MG 63 após cultura dinâmica por 15 h F/C₀ (a) e por 15 h F/C_{2,5} (b).

5.4.3. Análise migratória (Cortes histológicos)

A capacidade de invasão celular à rede de poros do arcabouço PHB_{FN}, quando sob diferentes estímulos, foi avaliada pela análise de cortes histológicos longitudinais dos arcabouços, após os tempos de cultura estática e dinâmica. As imagens da Figura 5.29 apresentam alguns destes cortes.

Iniciando as análises pelos experimentos estáticos, após 4 h de adesão (Figuras 5.29(a) e (b)), os cortes apresentam boa densidade celular e heterogeneidade de migração para dentro da rede de poros. A maior densidade de células é encontrada a até 200 - 350 µm a partir da superfície onde é realizada a cultura. Por outro lado, podem ser encontradas células a um limite de, aproximadamente, 600 µm em alguns cortes. Essa grande profundidade encontrada para algumas células durante o experimento de adesão inicial é indicativo dos efeitos positivos no processo de colonização, quando o arcabouço apresenta porosidade, tamanho de poros e interconexão apropriados para permitir que células alcancem áreas mais internas (dados apresentados na Tabela 5.1). Trata-se de resultado importante para a cultura tridimensional de células ósseas, tendo em vista que o intervalo de tamanho de poros predominante nesses arcabouços varia de

60 a 140 μm , abaixo do intervalo apontado pela literatura como ideal para a migração de células ósseas (120 -325 μm (MURPHY *et al.*, 2010)).

Nos arcabouços após 19 h de cultura estática (Figuras 5.29(c) e (d)), há alta densidade celular nas camadas superficiais da rede de poros. A maioria das células podem ser encontradas a um limite de até 250 μm . Abaixo desse limite o interior do arcabouço está, praticamente, não colonizado. Essa ausência de células em regiões mais internas da rede de poros pode ser explicada pela formação, em alguns pontos da superfície mais externa do arcabouço, de monocamada celular que recobre a abertura de alguns poros (indicado por seta vermelha nas Figuras 5.29(c) e (d)) e, em áreas mais internas, pelo bloqueio de poros e seus pontos de conexões, devido ao crescimento celular desorientado (indicado por seta preta nas Figuras 5.29(c) e (d)). Por esses dois mecanismos, há diminuição da difusão de nutrientes para áreas mais internas, levando à morte celular.

Os cortes realizados após cultura dinâmica (Figuras 5.29(e - h)) apresentaram mudanças no comportamento migratório celular, dependendo do estímulo imposto. A força cisalhante unidirecional (F/C_0) aplicada sobre a cultura celular (Figuras 5.29(e) e (f)) parece ter provocado efeito migratório heterogêneo nas diferentes regiões da superfície do arcabouço. A maioria das células são encontradas a até 250 μm de profundidade e também há formação, em alguns pontos, de monocamada celular sobre os poros (indicado por seta vermelha na Figura 5.29(e)). Porém a capacidade celular de migração para dentro da rede de poros é muito maior do que quando observados os cortes referente à cultura estática de 19 h, sendo possível encontrar células a uma profundidade de até 500 μm . Essa alta profundidade alcançada pela migração celular foi observada somente nos cortes realizados nas regiões centrais da amostra, apresentando, porém, muito baixa densidade celular em tais áreas.

Nos arcabouços após ensaio de compressão intermitente ($F/C_{2,5}$) (Figuras 5.29(g) e (h)), a densidade celular (por corte) é consideravelmente mais alta do que nos ensaios de somente fluxo unidirecional, com migração mais homogênea para dentro da rede de poros. A maior concentração de células é encontrada a até 400 μm da superfície de cultura, com boa concentração e distribuição celular nessa área. Alguns grupos de células que migraram mais podem ser encontrados a até 600 μm , porém em baixa densidade celular.

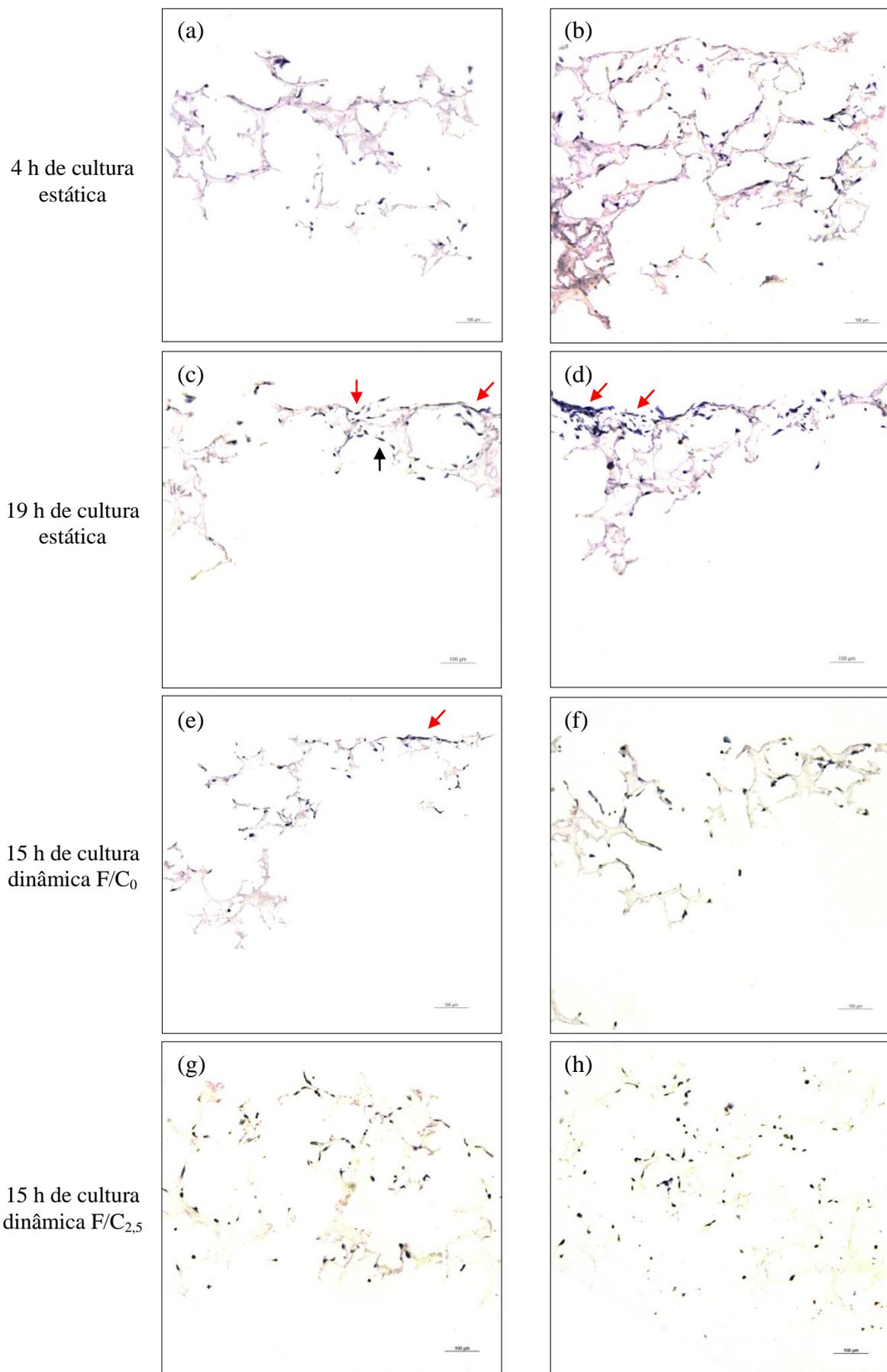


Figura 5.29 - Cortes histológicos longitudinais de arcabouços PHB_{FN} após ensaios estáticos de 4h (a, b) e 19h (c, d) e dinâmicos F/C₀ (e, f) e F/C_{2,5} (g, h).

5.5. Considerações finais

Ao final das análises dos experimentos realizados nesta pesquisa, foram obtidos os seguintes resultados:

- O arcabouço de PHB produzido por lixiviação de particulado se manteve dentro da porosidade estimada para a técnica, considerando-se o tamanho de grau utilizado como agente porogênico. O tratamento de hidrólise revelou-se de grande importância para o aumento da conectividade entre poros e da área polimérica superficial exposta para a cultura celular. A análise dos cortes histológicos demonstrou a grande importância da boa interconectividade obtida entre os poros no processo de colonização, uma vez que permite que as células alcancem grandes profundidades a partir da superfície de adesão (aproximadamente 600 μm).

- A microestrutura obtida pelos arcabouços hidrolisados se mostrou eficiente no cultivo celular. Mesmo na ausência da bioativação por recobrimento proteico, as células (tanto endoteliais, quanto osteoblásticas) foram capazes de aderir e espriar sobre as superfícies poliméricas, ainda que com baixa velocidade.

- Quando em cultivo de células endoteliais (BCE-HT⁺), o recobrimento por FN não só aumentou o reconhecimento celular à superfície, promovendo a colonização quase total das primeiras camadas do arcabouço após 7 dias de cultivo, como também estimulou a incursão celular, com organização de camadas sobrepostas de formato circular, que podem ser indiciais para o início da formação de um tubo.

- Após as modificações realizadas no projeto inicial do biorreator, este se tornou promissor equipamento para o cultivo dinâmico de células ósseas. O biorreator (LAB-DC3A) representa um avanço em relação aos biorreatores comerciais para o cultivo de células ósseas, uma vez é capaz de impor à culturas *in vitro* forças mecânicas similares às encontradas no ambiente *in vivo* do osso trabecular.

- Quando em cultivo estático de células osteoblásticas (MG 63), a superfície bioativada se mostrou de grande importância na indução à polimerização e à orientação intracelular das fibras de actina.

- A tensão cisalhante unidirecional imposta de forma isolada (F/C_0) promoveu a morte e a lixiviação de muitas células MG 63 que estavam aderidas aos arcabouços PHB_H em estágio inicial de espraiamento. As células que permaneceram nesses arcabouços, após o tempo experimental, apresentavam uma morfologia arredondada, semelhante à observada em estágios iniciais de adesão. De outra parte, nos arcabouços PHB_{FN} , a tensão cisalhante unidirecional promoveu reorganização das fibras de actina, orientando-as, no sentido de passagem do fluxo, para dentro das conexões de poros, não alterando a morfologia celular poligonal (apesar da leve diminuição do espraiamento). Assim, é possível afirmar que o nível de espraiamento e de rigidez celular em que a cultura se encontra no início do experimento dinâmico é de extrema importância para o sucesso da aplicação de tensão cisalhante unidirecional.

- A imposição de compressão intermitente com tensão associada a 2,5% da deformação ($F/C_{2,5}$) produziu, nas culturas de células MG 63 associadas a ambos os arcabouços (PHB_H e PHB_{FN}), melhores resultados do que os obtidos no experimento F/C_0 , quando considerada a colonização celular às superfícies poliméricas. Nos arcabouços PHB_H , além da maior quantidade de células obtidas ao final do experimento, também foi possível observar início de processo migratório, com pequeno acúmulo nas regiões de bordas de poros, e início da alteração morfológica, pelo estiramento de alguns núcleos celulares, nas referidas áreas de bordas. Nos arcabouços PHB_{FN} houve migração imediata para as bordas de poros, gerando grande acúmulo celular nestas regiões. Houve ainda significativo estímulo à proliferação, com crescimento celular seguindo a morfologia das superfícies poliméricas (resultado que pode ser visto nas imagens de MEV) e alterando a morfologia de poligonal para estirada.

- O experimento que utilizou 5% de deformação associada à compressão intermitente (F/C_5) ultrapassou o limite de deformação suportado pelas células MG 63, quando cultivadas em arcabouço PHB_{FN} . Tal excesso de tensão aplicada provocou a morte da maioria das células presentes nessas superfícies.

- O experimento de compressão intermitente ($F/C_{2,5}$) em arcabouços PHB_{FN} estimulou a migração e o crescimento celular seguindo a morfologia do arcabouço, o que permitiu que os poros não fossem bloqueados, mantendo-se a difusão de meio de cultura para áreas mais internas. Por tal motivo, foi possível, através de cortes histológicos realizados nos arcabouços PHB_{FN} após todos os tempos experimentais (4 e

19 h estático, F/C₀ e F/C_{2,5}), comprovar a eficiência da compressão intermitente aplicada na distribuição celular na rede de poros.

- Os resultados encontrados nesta pesquisa parecem estar de acordo com os indicados pela literatura, que apontam a tensão cisalhante como primeiro estímulo sentido pelas células com efeito de indução de proliferação e migração; a tensão compressiva é entendida como indutora de diferenciação.

- Com os parâmetros aplicados no experimento de compressão intermitente (2,5% de deformação, 1 Hz e 15 h), foi possível obter respostas celulares positivas, de curto prazo, no processo de colonização de arcabouço PHB_{FN} para regeneração óssea.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

- A imposição de compressão intermitente ($F/C_{2,5}$), com geração de fluxo oscilatório, promoveu, na cultura em arcabouço PHB_H: estímulo à proliferação celular, início da migração para regiões de borda de poros e início de diferenciação morfológica para padrão estirado. De outra parte, na cultura em arcabouços funcionalizados PHB_{FN}, gerou-se: grande índice de proliferação celular, migração imediata para regiões de borda de poros, alteração morfológica com estiramento celular (aumento de pontos de adesão focal) e aumento da densidade de conexões célula-célula para dentro da rede de poros.

- A velocidade da resposta celular à deformação do substrato e ao fluxo oscilatório parece estar relacionada não só às conexões células-substrato, em que as integrinas sentem as variações mecânicas e iniciam a transdução de sinais, como também às conexões célula-célula, que podem: estimular a migração direcionada para as bordas de poros ou estimular a diferenciação, com alongamento celular no sentido (preferencialmente) perpendicular ao de aplicação de tensão compressiva.

- O aumento da tensão cisalhante provocado pela aceleração do fluxo, quando combinado com compressão intermitente, estimulou a migração celular para dentro da rede de poros dos arcabouços PHB_{FN}, promovendo boa distribuição e alcançando grandes profundidades.

- A tensão cisalhante unidirecional imposta isoladamente não promoveu grande efeito no processo de migração celular para dentro da rede de poros dos arcabouços PHB_{FN}. Essa tensão também não foi capaz de impedir a formação de monocamada celular sobre a rede de poros durante a cultura.

- A tensão cisalhante oscilatória produzida por compressão intermitente afetou mais a modulação da cultura celular do que a tensão cisalhante unidirecional produzida por fluxo de perfusão.

CAPÍTULO VII

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Mapear a distribuição de FN imobilizada na rede de poros do arcabouço.
- Estudar tempos mais curtos de aplicação de compressão intermitente, para avaliar em que momento as células começam a responder aos estímulos dinâmicos.
- Medir a expressão de genes e marcadores de diferenciação nos diferentes estágio de resposta celular quando sobre estimulação dinâmica.
- Avaliar tanto a produção de matriz extracelular quanto sua distribuição, disposição e interação com as células em cultura.
- Estudar a alteração morfológica celular, com possível diferenciação em osteócito, produzida pela compressão intermitente que apareceu no único experimento de descanso pós compressão.
- Promover experimento de somente fluxo oscilatório em arcabouço PHB_{FN}, a fim de avaliar o quanto da resposta celular está relacionada a cada parâmetro.
- Testar a resposta celular à frequências menores que 1 Hz, com vista a evitar o risco de fratura do arcabouço em experimentos mais longos.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELME, K., 2000; "Osteoblast adhesion on biomaterials" *Biomaterials*, v. 21, pp. 667-681.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., *et al.*, 2010, *Biologia molecular da célula*. 5 ed, Porto Alegre, Editora Artmed.

ALBREKTSSON, T., JOHANSSON, C., 2001, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration" *European Spine Journal*, v. 10, pp. 96–101.

ANGEL, P., KARIN, M., 1991, "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation" *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1072, pp. 129-157.

ATALA, A., 2007, "Engineering tissue, organs and cells" *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.1, pp. 83-96.

BACABAC, R.G., SMIT, T.H., COWIN, S.C., *et al.*, 2005, "Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers" *Journal of Biomechanics*, v. 38, pp.159-167.

BANNISTER, S.R., LOHMANN, C.H., LIU, Y., *et al.*, 2002, "Shear force modulates osteoblast response to surface roughness" *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 60, n. 1, pp.167-174.

BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A.C., DUEK, E.A.R., 2005, "Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia tecidual" *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 1, pp. 13-21.

BASSO, N., HEERSCHE, J.N.M., 2002, "Characteristics of In Vitro Osteoblastic Cell Loading Models" *Bone*, v. 30, n. 2, pp. 347–351.

BAUER, M.E., JECKEL-NETO, E.A., 2002, *Avanços em Biologia Celular*. 1 ed, Porto Alegre, EDIPUCRS.

BAUJARD-LAMOTTE, L., NOINVILLE, S., GOUBARD, F., *et al.*, 2008, “Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 63, pp. 129–137.

BIZIOS, R., DEE, K.C., PULEO, D.A., 2002, *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. 1 ed, Nova Jersey, John Wiley & Sons.

BJERRE, L., BUNGER, C.E, KASSEM, M., *et al.*, 2008, “Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds” *Biomaterials*, v. 29, pp. 2616-2627.

BLASIOA, A.DE, MESSINAB, C., SANTULLIB, A., *et al.*, 2005, "Differentiative pathway activated by 3-aminobenzamide, an inhibitor of PARP, in human osteosarcoma MG-63 cells" *Federation of European Biochemical Societies*, v. 579, pp. 615-620.

BORETOS, J.W., EDEN, M., 1984, *Contemporary biomaterials, material and host response, clinical applications, new technology and legal aspects*. 1 ed, Park Ridge, NJ, Noyes Publications.

BRANDÃO, M.L., ESPOSTI, T.B.D., BISOGNIN, E.D., *et al.*, 2010; “Superfície dos Implantes Osseointegrados x Resposta Biológica” *Revista ImplantNews*, v. 7, n. 1, pp. 95-101.

BRÅNEMARK, P.I., HANSSON, B.O., ADELL, R., *et al.*, 1977, “Osseointegrated titanium implants in the treatment of the edentulous jaw” *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 11, pp. 161–175.

BROWN, T.D., 2010, "Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review" *Journal of Biomechanics*, v. 33, pp. 3-14.

BUSER, R., MONTESANO, R., GARCIA, I., *et al.*, 2006, "Bovine microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase" *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 98, pp. 267–286.

CARANO, R.A., FILVAROFF, E.H., 2003, "Angiogenesis and bone repair" *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 21, pp. 980-989.

CARDOSO, F.A., CAMPOS, E.R., MATTOS, E.C., *et al.*, 1994, "Endotélio vascular. Parte I: função e propriedades" *Revista de Ciências Médicas*, PUCCAMP, Campinas, v. 3, n. 3, pp. 76-84.

CHOI, J.S., PARK, W.H., 2004, "Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate)" *Polymer Testing*, v. 23, pp. 455–460.

CHUNQIU, Z., XIN, D., HAN, W., *et al.*, 2008, "Perfusion-compression bioreactor as the optimum choice for growing large-sized engineered bone constructs in vitro" *Bioscience Hypotheses*, v. 1, pp. 319-323.

CHUNQIU, Z., XIZHENG, Z., HAN, W., *et al.*, 2006, " Direct compression as an appropriately mechanical environment in bone tissue reconstruction in vitro" *Medical Hypotheses*, v. 67, pp. 1414–1418.

CHUNQIU, Z., XIZHENG, Z., XIN, D., *et al.*, 2007; "Bone modeling adaptation as a method for promoting development of bone tissue engineered construct in vitro" *Medical Hypotheses*, v. 69, pp. 178–181.

DA SILVA, H.M., MATEESCU, M., DAMIA, C., *et al.*, 2010; "Importance of dynamic culture for evaluating osteoblast activity on dense silicon-substituted hydroxyapatite" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 80, pp.138-144.

DAVID, V., GUIGNANDON, A., MARTIN, A., *et al.*, 2008, "Ex vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain" *Tissue Engineering Part A*, v. 14, pp. 117-126.

DÅNMARK, S., FINNE-WISTRAND, A., ALBERTSSON, A-C., *et al.*, 2012; "Integrin-mediated adhesion of human mesenchymal stem cells to extracellular matrix proteins adsorbed to polymer surfaces" *Biomedical Materials*, v. 7, 035011.

DERMENOUDIS, S., MISSIRLIS, Y.F., 2010, "Bioreactors in tissue engineering" *Advanced Engineering Materials*, v. 12. n. 11, pp. 592-608.

DUNCAN, R.L., TURNER, C.H., 1995, "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain" *Calcified Tissue International*, v. 57, pp. 344-358.

ETHIER, C.R., SIMMONS, C.A., 2013, *Introductory biomechanics - from cells to organisms* 1 ed., 8 reimpr., United Kingdom, Cambridge University Press.

FELDKAMP, L.A, DAVIS, L.C., KRESS, J.W., 1984, "Practical cone beam algorithm" *Journal of the Optical Society of America A*, v. 1, pp. 612–619.

FOLKMAN, J., HOCHBERG. M., 1973, "Self-regulation of growth in three dimensions" *The Journal Of Experimental Medicine*, v. 138, pp. 745-753.

FREED LE, VUNJAK-NOVAKOVIC G, "Tissue Engineering Bioreactors". In: Lanza, R.P., Langer, R., Chick, W.L., *Principles of tissue engineering*. 2 ed, cap 13, Austin - Texas, USA: R.G. Landes Co, 1997.

FREIER, T., KUNZE, C., NISCHAN, C., *et al.*, 2002, "In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patchbased on poly(3-hydroxybutyrate)" *Biomaterials*, v. 23, pp. 2649–2657.

GARDINIER, J.D., MAJUMDAR, S., DUNCAN, R.L., *et al.*, 2009, "Cyclic Hydraulic Pressure and Fluid Flow Differentially Modulate Cytoskeleton Re-Organization in MC3T3 Osteoblasts" *Cellular and Molecular Bioengineering*, v. 2, n. 1, pp. 133–143.

GRIFFITH, L.G., 2000, "Polymeric biomaterials" *Acta mater.*, v. 48, pp. 26-277.

GROSSKINSKY, U., 2006, "Biomaterial regulations for tissue engineering" *Desalination*, v. 199, pp. 265–267.

HARDIN-YOUNG, J., TEUMER, J., KEMP, P.D., *et al.*, "Approaches to Transplanting Engineered Cells and Tissues". In: Lanza, R.P., Langer, R., Chick, W.L., *Principles of tissue engineering*. 2 ed, cap 23, Austin – Texas , USA: R.G. Landes Co., 1997.

HAZER, D.B., KILIÇAY, E., HAZER, B., 2012, "Poly(3-hydroxyalkanoate)s- Diversification and biomedical applications- A state of the art review" *Material Science Engineering Part C*, v. 32, pp. 637–647.

HENCH, L.L., PEREIRA, M.M., ORÉFICE, R.L., *et al.*, " Biocompatibilidade, bioatividade e engenharia de tecidos". In: Oréfice, R.L., Pereira, M.M., Mansur, H.S., *Biomateriais – fundamentos e aplicações*. 1 ed, 1 reimpr, cap 16, Rio de Janeiro, Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2012.

HILBORN, J., BJURSTEN, L., 2007, "A new and evolving paradigm for biocompatibility" *Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine*, v. 1, pp. 110-119.

HILDEBRAND, K.A., GALLANT-BEHM, C.L., KYDD, A.S., *et al.*, 2005, "The basic of soft tissue healing and general factors that influence such healing" *Sports Medicine & Arthroscopy Review*, v. 13, pp. 136-144.

HOLLINGER, J.O., BATTISTONE, G.C., 1986, "Biodegradable bone repair materials - synthetic-polymers and ceramics" *Clinical Orthopaedics And Related Research*, v. 207, pp. 290-305.

http://www.3bscientific.com.br/shop/brasil/posters-grandes/estrutura-do-osso-v2050u,p16_61_0_0_2128_image_full.html. Acesso em: Nov de 2008.

HUTMACHER, D.W., 2000, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage" *Biomaterials*, v. 21, pp. 2529-2543.

INGBER, D.E., FOLKMAN, J. "Tension and compression as basic determinants of cell form and function: Utilization of a cellular tensegrity mechanism" In: Stein, W.D., Bronner, F., *Cell Shape: Determinants, Regulation and Regulatory Role*. 1 ed, cap 1, San Diego, Academic Press, 1989.

JAGODZINSKIA, M., BREITBARTA, A., WEHMEIERB, M., *et al.*, 2008, "Influence of perfusion and cyclic compression on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in 3-dimensional culture" *Journal of Biomechanics*, v. 41, pp. 1885–1891.

KARURI, N.W., LIN, Z., RYE, H.S., *et al.*, 2009, "Probing the Conformation of the Fibronectin III1–2 Domain by Fluorescence Resonance Energy Transfer" *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284 , n. 6, pp. 3445-3452.

KIM, K., DEAN, D., LU, A., *et al.*, 2011, "Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds" *Acta Biomaterialia*, v. 7, pp. 1249-1264.

KIM, T.G., SHIN, H., LIM, D.W., 2012, "Biomimetic scaffolds for tissue engineering" *Advanced Functional Materials*, v. 22, pp. 2446–2468.

KLEIN-NULEND, J., VELDHUIJZEN, J., BURGER, E., 1986, "Increased calcification of growth plate cartilage as a result of compressive force in vitro" *Arthritis & Rheumatology*, v. 29, pp.1002–1009.

KOCH, M.A., VRIJ, E.J., ENGEL, E., *et al.*, 2010, "Perfusion cell seeding on large porous PLA/calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters" *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 95, pp. 1011-1018.

KRAMMER, A., LU, H., ISRALEWITZ, B., *et al.*, 1999, "Force unfolding of fibronectin type III module reveals a tensile molecular recognition switch" *Biophysics*, v. 96, pp. 1351-1356.

KUNZE, C., EDGAR BERND, H., ANDROSCH, R., *et al.*, 2006, "In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material" *Biomaterials*, v. 27, pp. 192–201.

LANGER, R., VACANTI, J.P., 1993, "Tissue Engineering" *Science*, v. 260, pp. 920-926.

LASCHKE, M.W., HARDER, Y., AMON, M., *et al.*, 2006, "Angiogenesis in Tissue Engineering: Breathing Life into Constructed Tissue Substitutes" *Tissue Engineering*, v. 12, n. 8, pp. 2093–2104.

LEAHY, D.J., 1997, "Implications of atomic-resolution structures for cell adhesion" *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 13, pp. 363–393.

LEE, K.Y., MOONEY, D.J., 2001, "Hydrogels for Tissue Engineering" *Chemical Reviews*, v. 101, n. 7, pp. 1869-1879.

LENZ, R.W., MARCHESSAULT, R.H., 2005, "Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology" *Biomacromolecules*, v. 6, n 1, pp. 1-8.

LIU, L., RATNER, B.D., SAGE, E.H., *et al.*, 2007, "Endothelial Cell Migration on Surface-Density Gradients of Fibronectin, VEGF, or Both Proteins" *Langmuir*, v. 23, pp. 11168-11173.

LORENSEN, W.E., CLINE, H.E., 1987, " Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm" *Compututers & graphics*, v. 21, n. 4, pp. 163-169.

MA, Z., MAO, Z., GAO, C., 2007, "Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 60, pp. 137–157.

MAGNUSSON, M.K., MOSHER, D.F., 1998, "Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications" *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 18, pp. 1363-1370.

MARTINO, M.M., MOCHIZUKI, M., ROTHENFLUH, *et al.*, 2009, "Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability" *Biomaterials*, v. 30, n. 6, pp. 1089-1097.

MASAEI, E., MORSHED, M., RASEKHIAN, P., *et al.*, 2012, "Does the tissue engineering architecture of poly(3-hydroxybutyrate) scaffold affects cell-material interactions?" *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 100A, n. 7, pp. 1907–1918.

MATSUGAKI, A., FUJIWARA, N., NAKANO, T., 2013, "Continuous cyclic stretch induces osteoblast alignment and formation of anisotropic collagen fiber matrix" *Acta Biomaterialia*, v. 9, pp. 7227–7235.

MEIGA, T.O., 2010, "Avaliação de metodologias para imobilização covalente de fibronectina em arcabouços de poli(3-hidroxibutirato)" Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MENDONÇA, G., MENDONÇA, D.B.S, ARAGÃO, F.J.L., *et al.*, 2008, “Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography” *Biomaterials*, v. 29, pp. 3822–3835.

MENDONÇA, R.H., 2008, “Imobilização de fibronectina na superfície de suportes porosos de PHB para aplicação em engenharia óssea” Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MENDONÇA, R.H., THIRÉ, R.M.S.M., COSTA, M.F., *et al.*, 2009, "Adsorção de Fibronectina a Arcabouços de Polihidroxibutirato Aplicáveis à Engenharia Óssea" *Polímeros*, v. 19, n. 2, pp. 143-148.

MEYER, U., WIESMANN, H.P., 2006, *Bone and cartilage engineering*. 1 ed, Berlim, Editora Springer-Verlang Berlin Heidelberg.

MESSIAS, A.D., MARTINS, K.F., MOTTA, A.C., *et al.*, “Arcabouços de poli(l-co-d,l ácido láctico-co-trimetileno carbonato) para crescimento de células osteoblásticas”. In: *Anais 11º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Campos de Jordão, SP, Brasil, Out. 2011.

MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J., 2000, “Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices” *Biomaterials*, v. 21, pp. 2335-2346.

MISRA, S.K., VALAPPIL, S.P., ROY, I., *et al.*, 2006; “Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications” *Biomacromolecules*, v. 7, pp 2249-2258.

MISRA, S.K., ANSARI, T.I., VALAPPIL, S.P., *et al.*, 2010, "Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications" *Biomaterials*, v. 31, pp. 2806–2815.

MOLINA, M.P., MORENO, P.G., BARBEROC, J.E.F., *et al.*, 2011, "Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces" *Acta Biomaterialia*, v. 7, n. 2, pp. 771–778.

MOON, J.J., WEST, J.L., 2008, "Vascularization of Engineered Tissues: Approaches to Promote Angiogenesis in Biomaterials" *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 8, pp. 300-310.

MOYANO, J.V., CARNEMOLLA, B., DOMÍNGUEZ-JIMÉNEZ, C., *et al.*, 1997; "Fibronectin Type III5 Repeat Contains a Novel Cell Adhesion Sequence, KLDAPT, Which Binds Activated $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$ Integrins" *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 40, pp. 24832-24836.

MULLENDER, M.G., HUISKES, R., 1995, "Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law" *Journal of Orthopaedic Research*, v. 13, pp. 503-512.

MURPHY, C.M., HAUGH, M.G., O'BRIEN, F.J., 2010, "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials*, v. 31, pp. 461–466.

NADERI, H., MATIN, M.M., BAHRAMI, A.R., 2011, "Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems" *Journal of Biomaterials Applications*, v. 26, pp. 383-417.

NAING, M.W., WILLIAMS, D.J., 2011, "Three-dimensional culture and bioreactors for cellular therapies" *Cytotherapy*, v. 13, pp. 391–399

NEBE, B., FORSTER, C., POMMERENKE, H., *et al.*, 2001, "Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on poly- β -hydroxy butyric acid" *Biomaterials*, v. 22, pp. 2425-2434.

OH, S.H., LEE, J.H., 2013, "Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility" *Biomedical Materials*, v. 8, 14101.

O'BRIEN, F.J., 2011, "Biomaterial & scaffolds for tissue engineering" *Materials Today*, v. 14, n. 3, pp. 88-95.

PEAKE, M.A., COOLING, L.M., MAGNAY, J.L., *et al.*, 2000, "Selected Contribution: Regulatory pathways involved in mechanical induction of c-fos gene expression in bone cells" *Journal of Applied Physiology*, v. 89, pp. 2498-2507.

PEYRIN, F., 2011, "Evaluation of bone scaffolds by micro-CT" *Osteoporosis International*, v. 22, pp. 2043–2048.

RAJARAMAN, R., ROUNDS, D.E., YEN, S.P.S., *et al.*, 1974, "A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro" *Experimental Cell Research*, v. 88, n. 2, pp. 327–339.

RENTSCH, C., RENTSCH, B., BREIER, A., *et al.*, 2010, "Evaluation of the osteogenic potential and vascularization of 3D poly(3)hydroxybutyrate scaffolds subcutaneously implanted in nude rats" *Journal of Biomedical Material Research Part A*, v. 92, n. 1, pp.185-95.

ROELOFSEN, J., KLEIN-NULEND, J., BURGER, E.H., 1995, "Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro" *Journal of Biomechanics*, v. 28, n. 12, pp. 1493-1503.

ROUWKEMA, J., RIVRON, N.C., VAN BLITTERSWIJK, C.A., 2008, "Vascularization in tissue engineering" *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 8, pp. 434-41.

RUMNEY, R.M.H., SUNTERS, A., REILLY, G.C., *et al.*, 2012, "Application of multiple forms of mechanical loading to human osteoblasts reveals increased ATP

release in response to fluid flow in 3D cultures and differential regulation of immediate early genes" *Journal of Biomechanics*, v. 45, pp. 549-554.

RUOSLAHTI, E., 1988, "Fibronectin and its receptors" *Annual Review of Biochemistry*, v. 57, pp. 375-413.

SAGNELLA, S., ANDERSON, E., SANABRIA, N., *et al.*, 2005, "Human Endothelial Cell Interaction with Biomimetic Surfactant Polymers Containing Peptide Ligands from the Heparin Binding Domain of Fibronectin" *Tissue Engineering*, v. 11, n. 1-2, pp. 226-236.

SCHWARTZ, Z., DENISON, T.A., BANNISTER, S.R., *et al.*, 2007, "Osteoblast response to fluid induced shear depends on substrate microarchitecture and varies with time" *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 83A, n. 1, pp. 20-32.

SEAL, B.L., OTERO, T.C., PANITCH, A., 2001, "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration" *Materials Science and Engineering*, v. 34, pp. 147-230.

SHIN, H., JO, S., MIKOS, A.G., 2003, "Biomimetic materials for tissue engineering" *Biomaterials*, v. 24, pp. 4353-4364.

SIKAVITSAS, V.I., BANCROFT, G.N., HOLTORF, H.L., *et al.*, 2003, "Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces" *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100, pp.14683-14688.

SILVESTRE, J., LÉVY, B.I., TEDGUI, A., 2008, "Mechanisms of angiogenesis and remodeling of the microvasculature" *Cardiovascular Research*, v. 78, pp. 201-202.

SITTICHOCKECHAIWUT, A., SCUTT, A.M., RYAN, A.J., *et al.*, 2009, "Use of rapidly mineralising osteoblasts and short periods of mechanical loading to accelerate matrix maturation in 3D scaffolds" *Bone*, v. 44, n.5, pp. 822-829.

SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y., 2000, "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters" *Progress in Polymer Science*, v. 25, pp. 1503-1555.

SUMPIO, B.E., RILEY, J.T., DARDIK, A., 2002, "Cells in focus: endothelial cell" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, pp. 1508–1512.

TEIXEIRA, B.N., 2013, "Investigação da resposta celular a arcabouços de poli (3-hidroxi-butilato) funcionalizados com fibronectina" Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

THIRÉ, R.M.S.M., MEIGA, T.O., ANDRADE, L.R., "Effect of surface treatment on the biocompatibility of phb films" In: Anais do 4º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Caxambu, MG, Brasil, Ago. 2006.

THIRÉ, R.M.S.M., MEIGA, T.O., DICK, S., *et al.*, 2007, "Functionalization of Biodegradable Polyester for Tissue Engineering Applications" *Macromolecular Symposia*, v. 258, n. 1, pp. 38-44.

THOMPSON, W.R., RUBIN, C.T., RUBIN, J., 2012, "Mechanical regulation of signaling pathways in bone" *Gene*, v. 503, pp. 179–193.

TORTORA, G.J., GRABOWSKI, S.R., 2000, *Princípios de anatomia e fisiologia*. 9 ed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.

ULMER, J., GEIGER, B., SPATZ, J.P., 2008, "Force-induced fibronectin fibrillogenesis in vitro" *Soft Matter*, v. 4, n. 10, pp. 1925–2112.

VALLIÈRES, K., CHEVALLIER, P., SARRA-BOURNET, C., *et al.*, 2007, "AFM imaging of immobilized fibronectin: Does the surface conjugation scheme affect the protein orientation/conformation?" *Langmuir*, v. 23, n. 19, pp. 9745-9751

VERT, M., 2007, "Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future" *Progress in Polymer Science*, v.32, pp. 755–761.

VEITONMAKI, N., FUXE, J., HULTDIN, M., *et al.*, 2003, "Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb" *The FASEB Journal*, v. 17, n. 6, pp. 764-766.

VIEIRA, J.G.H., 1999, "Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática" *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 43, n. 6, pp. 415-422.

WEINBAUM, S., COWIN, S.C., ZENG, Y., 1994, "A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses" *Journal of Biomechanics*, v. 27, pp. 339–360.

WILSON, C.J., CLEGG, R.E., LEAVESLEY, D.I., *et al.*, 2005, "Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins: a review" *Tissue Engineering*, v. 11, pp. 1–18.

WOODARD, J.R., HILLDORE, A.J., LAN, S.K., *et al.*, 2007, "The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity" *Biomaterials*, v. 28, pp. 45–54.

WOODS, A., MCCARTHY, J.B., FURCHT, L.T., *et al.*, 1993, "A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation" *Molecular Biology of the Cell*, v. 4, n. 6, pp. 605-613.

YANG, Y., PORTÉ, M., MARMEY, P., *et al.*, 2003, "Covalent bonding of collagen on poly(L-lactic acid) by gamma irradiation" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 207, pp. 165–174.

ZARB, G., ALBREKTSSON, T., 1991, "Osseointegration – a requiem for the periodontal ligament? – An editorial" *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, v. 11, pp. 88–91.

ZELTINGER, J., SHERWOOD, J.K., GRAHAM, D.A., *et al.*, 2001; "Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition" *Tissue Engineering*, v. 7, n. 5, pp. 557-572.

ZHANG, Y., CHAI, C., JIANG, X.S., *et al.*, 2007, "Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET" *Material Science Engineering Part C*, v. 27, pp. 213–219.