

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E**  
**IMUNOLOGIA**

**Alessandra Arcoverde Cavalcanti Zonari**

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E**  
**DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL DE CÉLULAS-TRONCO**  
**HUMANAS CULTIVADAS EM NANOFIBRAS DE**  
**POLIHIDROXIBUTIRATO**

Belo Horizonte-MG

2010

**Alessandra Arcoverde Cavalcanti Zonari**

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E  
DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL DE CÉLULAS-TRONCO  
HUMANAS CULTIVADAS EM NANOFIBRAS DE  
POLIHIDROXIBUTIRATO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes

Belo Horizonte-MG

2010



Universidade Federal de Minas Gerais -  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICBAUFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615




**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ALESSANDRA ARCOVERDE CAVALCANTI ZONARI.** Aos cinco dias do mês de fevereiro de 2010 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Avaliação da adesão, proliferação e diferenciação endotelial de células-tronco humanas cultivadas em nanofibras de polihidroxibutirato” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Alfredo Miranda de Góes da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Rogéria Serakides da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Patricia Valério da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 5 de fevereiro de 2010.

  
 Dra. Rogéria Serakides – UFMG

  
 Dra. Patricia Valério – UFMG

  
 Dr. Alfredo Miranda de Góes – orientador - UFMG

  
 Prof. Paulo Sérgio Lacerda Britão  
 Coordenador "pro tempore" do Curso  
 de Pós Graduação em  
 Bioquímica - Imunologia  
 ICB - UFMG

*À minha família, Daddy, Mãe, Bominha e Sylvia, por não medirem esforços para tornarem os meus sonhos realidades. Pelo amor incondicional e por me ensinarem que com determinação e disciplina podemos alcançar todos os nossos objetivos.*

## *Agradecimentos*

---

***Agradeço imensamente a todos que dedicaram uma parte de suas vidas para a realização do meu sonho. Sem vocês essa conquista não seria possível. MUITO OBRIGADA!!!***

Ao Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes pela orientação, confiança e por contribuir imensamente na minha formação científica. Obrigada por acreditar no meu esforço e sempre me apoiar e me incentivar.

À PHB Industrial S.A. pelo fornecimento dos polímeros.

Ao Grupo de Pesquisa do Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa em Portugal, coordenado pelo Pr. Dr. Rui Reis pela confecção das membranas de nanofibras.

Ao Dr. Lamana e aos doadores do Núcleo de Cirurgia Plástica pela colaboração na coleta dos produtos de lipoaspiração.

À Dra. Silviene Novikoff por toda dedicação e contribuição para a realização desse projeto e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Dawidson Gomes por todos os ensinamentos e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Adriana, Ana Carolina, Carolina Reis, Caryne, Cíntia, Cris, Daniela Rolim, Dane Valério, Estefânia, Elis, Juliana Barbosa, Juliana Lott, Lílian, Luiza, Marina, Mário, Michele, Natássia, Paula, Patrícia Valério, Patrícia Rabelo, Peu, Rafaela, Suzana, Tércio, Viviane Cristina e Viviane Gomide, em especial Naira e Natália que contribuíram imensamente na realização desse trabalho.

À Betinha pelo amor, carinho e cuidado com todos do LICM.

Ao Laboratório de Biologia de Linfócitos: Érika e Tatiana pelos ensinamentos de citometria de fluxo.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária: Profa. Dra. Rogéria Serakides, Jankerle e Fátima.

Ao Laboratório de Biologia do Desenvolvimento: Profa. Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva e aos técnicos Francisco e Maristane pelo auxílio na inclusão e na confecção das lâminas histológicas.

Ao CDTN, em especial à Perpétua por ajudar tão prontamente com a irradiação das membranas.

Ao CEMEL: Prof. Hélio Chiarini e a técnica Ivete, pelo auxílio com a MEV.

Ao Departamento de Metalurgia da Escola de Engenharia da UFMG, em especial a técnica Patrícia.

À Capes, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, todos os professores e funcionários.

Aos amigos de bases por toda assistência durante o curso.

Aos amigos biólogos da PUC-Minas especialmente a Josiely, Flávia Viana, Flávia Siqueira e Marcela, à Tramontina e à todos os meus amigos, por sempre me apoiarem e fazerem a minha vida mais feliz.

À todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 ENGENHARIA DE TECIDOS.....	16
1.2 BIOMATERIAIS.....	17
1.3 POLIHIDROXIALCANOATOS.....	21
1.4 PROPRIEDADES DO POLIHIDROXIBUTIRATO E POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO).....	25
1.5 FONTES DE CÉLULAS-TRONCO PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS.....	27
1.6 VASCULARIZAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS.....	32
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1. CONFECÇÃO DA MEMBRANA DE NANOFIBRAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELECTROSPINNING.....	41
3.1.1 Esterilização dos biomateriais.....	42
3.2 ESTUDOS BÁSICOS EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO.....	43
3.2.1. Meio de cultura basal.....	43
3.2.2. Meio de cultura para diferenciação endotelial.....	43
3.2.3 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano.....	43
3.2.3.1 Caracterização das células-tronco de tecido adiposo humano por citometria de fluxo.....	45
3.2.3.2. Marcação celular com anticorpos primário e secundário.....	45
3.2.3.3. Leitura no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA).....	46
3.3 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MEMBRANA DE NANOFIBRAS DE PHB/PHB-HV COLONIZADAS COM hASC.....	47
3.3.1 Colonização <i>in vitro</i> da membrana de nanofibras por células hASC.....	47
3.3.2 Análise da adesão e morfologia celular através de imunofluorescência.....	47
3.3.3 Análise morfológica da membrana de nanofibras e das células aderidas através de MEV e EDS.....	48

3.3.4 Viabilidade e proliferação celular – MTT.....	49
3.3.5 Produção da Fosfatase Alcalina.....	51
3.4. AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DA MEMBRANA DE NANOFIBRAS.....	52
3.4.1 Procedimento Cirúrgico.....	52
3.4.2 Avaliação dos implantes <i>in vivo</i> .....	53
3.5 DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL.....	54
3.5.1 Avaliação da proliferação celular durante a diferenciação endotelial.....	54
3.5.2 Avaliação da produção da fosfatase alcalina durante a diferenciação endotelial.....	54
3.5.3 Avaliação da presença de marcadores de células endoteliais através de imunofluorescência.....	55
3.5.4. Comprovação da Diferenciação Endotelial Através de PCR.....	56
3.5.4.1 Extração de RNA.....	56
3.5.4.2 Síntese de cDNA.....	57
3.5.4.3. PCR.....	57
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOFIBRAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	60
4.2 EXTRAÇÃO E CULTIVO DAS hASC.....	60
4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	61
4.4 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MEMBRANA DE NANOFIBRAS DE PHB/PHB-HV COLONIZADAS COM hASC.....	63
4.4.1 Avaliação morfológica das hASC cultivadas na membrana de PHB/PHB-HV.....	63
4.4.2 Caracterização das hASC aderidas na membrana de PHB/PHB-HV – MEV e EDS.....	64
4.4.3 Avaliação da capacidade de metabolização do MTT pelas hASC cultivadas na membrana de nanofibras.....	69
4.4.4 Avaliação da produção da fosfatase alcalina nas hASC cultivadas na membrana de nanofibras.....	71
4.5 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MEMBRANA DE NANOFIBRAS DE PHB/PHB-HV COLONIZADAS COM hASC.....	73
4.6 DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL.....	76
4.6.1 Avaliação da proliferação celular durante a diferenciação endotelial.....	77
4.6.2 Avaliação da produção da fosfatase alcalina durante a diferenciação endotelial.....	77
4.6.3 Análise de marcadores de células endoteliais durante a diferenciação endotelial através de imunofluorescência.....	78



4.6.4 Avaliação da diferenciação endotelial através de PCR.....	80
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>

## *Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos*

---

%	Porcentagem
µg, ng	Micrograma, nanograma
Acetil-coA	Acetil-coenzimaA
ANG1	Angiopietina 1
ASC	Célula-tronco derivada do tecido adiposo
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
BSA	Albumina do Soro Bovino
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEMEL	Cento de Microscopia Eletrônica
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm, mm, µm, nm	Centímetro, milímetro, micrômetro, nanômetro
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DEMET	Departamento de Metalurgia
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EDTA	Ácido Tetracético Etilenodiamidina
GAPDH	Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase
hASC	Células-tronco derivadas do tecido adiposo humano
HV	Hidroxivalerato
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Kg	Quilograma
Kgy	Kilo gray
M, mM	Molar, milimolar
M.O.	Microscópio óptico
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL, µl	Mililitro, microlitro
MTT	Tetrazólio3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBT	nitroblue tetrazólio clorídrico
°C	Grau Celsius
P4HB	Poli 4-hidroxibutirato
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGA	Poli(ácido glicólico)
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PHBHHx	Poli(3-hidroxibutirato-3-hidroxihexanoato)
PHB-HV	Poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato
PHO	Polihidroxi octanoato
PLA	Poli(ácido láctico)
PLACL	Poli(ácido láctico)-co-poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PLG	Poli(láctico-co-glicólico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PP	Polipropileno
PVPI	Iodopovidona
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCP	Fosfato tricálcico
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR2	Receptor 2 do VEGF
vWF	Fator de Von Willebrand

## *Lista de Figuras*

---

<b>Figura 1:</b> Via metabólica do PHA.....	22
<b>Figura 2:</b> Estrutura genérica do PHA.....	23
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do PHB.....	25
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do PHB-HV.....	26
<b>Figura 5:</b> Esquema do implante proposto pelo grupo.....	37
<b>Figura 6:</b> Representação do equipamento necessário para a técnica de <i>electrospinning</i> .....	41
<b>Figura 7:</b> Gráfico de tamanho versus granulosidade.....	47
<b>Figura 8:</b> Representação do procedimento cirúrgico para implantes subcutâneos. ....	53
<b>Figura 9:</b> Avaliação estrutural da membrana de PHB/PHB-HV.....	60
<b>Figura 10:</b> Aspectos morfológicos das células extraídas do tecido adiposo humano.....	61
<b>Figura 11:</b> Análise fenotípica através de citometria de fluxo.....	62
<b>Figura 12:</b> Microscopia Confocal das hASC aderidas na membrana de PHB/PHB-HV.....	63
<b>Figura 13:</b> Imagens da microscopia eletrônica de varredura das membranas de PHB/PHB-HV colonizadas pelas hASC.....	64
<b>Figura 14:</b> Imagens da microscopia eletrônica de varredura mostrando as células interconectadas através de prolongamentos citoplasmáticos.....	65
<b>Figura 15:</b> Imagens da microscopia eletrônica de varredura mostrando a adesão celular às fibras da membrana através de prolongamentos citoplasmáticos.....	65
<b>Figura 16:</b> Campos selecionados para análise por EDS.....	66
<b>Figura 17:</b> Análise EDS da fibra da membrana de PHB/PHB-HV.....	67
<b>Figura 18:</b> Análise EDS da superfície celular aderida a membrana de PHB/PHB-HV.....	68
<b>Figura 19:</b> Avaliação macroscópica das membranas de PHB/PHB-HV durante o ensaio de MTT.....	69
<b>Figura 20:</b> Visualização dos cristais de formazan no ensaio de MTT.....	70

<b>Figura 21:</b> Representação gráfica da proliferação celular das hASC cultivadas em placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV.....	71
<b>Figura 22:</b> Avaliação macroscópica das membranas de PHB/PHB-HV durante o ensaio de produção de fosfatase alcalina.....	72
<b>Figura 23:</b> Visualização do precipitado púrpura no ensaio de produção da fosfatase alcalina.....	72
<b>Figura 24:</b> Representação Gráfica da detecção da atividade da fosfatase alcalina nas hASC cultivadas em placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV.....	73
<b>Figura 25:</b> Região do implante no momento da retirada.....	74
<b>Figura 26:</b> Visão panorâmica da região dos implantes.....	74
<b>Figura 27:</b> Análise histológica da região do implante após 4 semanas.....	75
<b>Figura 28:</b> Análise histológica da região do implante após 8 semanas.....	76
<b>Figura 29:</b> Representação gráfica da proliferação celular durante a diferenciação endotelial.....	77
<b>Figura 30:</b> Representação gráfica da produção da fosfatase alcalina durante a diferenciação endotelial.....	78
<b>Figura 31:</b> Análise de imunofluorescência para a proteína VE-Caderina.....	79
<b>Figura 32:</b> Análise de imunofluorescência para a proteína vWF.....	80
<b>Figura 33:</b> Detecção do VEGFR2 através de PCR.....	81

## *Lista de Tabelas*

---

<b>Tabela 1:</b> Aspectos Principais Ligados à Produção de Matrizes Porosas.....	19
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros utilizados para o <i>Electrospinning</i> .....	42
<b>Tabela 3:</b> Anticorpos primários utilizados para Citometria de Fluxo.....	46
<b>Tabela 4:</b> Anticorpos primários utilizados para Imunofluorescência.....	56
<b>Tabela 5:</b> Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....	57

A engenharia de tecidos é um campo da medicina regenerativa que se baseia no cultivo de células em matrizes estruturais associadas à incorporação de moléculas sinalizadoras, visando a regeneração tecidual. Apesar do enorme potencial, essa estratégia enfrenta um grande desafio para a manutenção da viabilidade celular após a implantação desses constructos. A falta de uma vascularização no interior do implante compromete a nutrição e a remoção de metabólitos pelas células, o que pode levar a falência do implante. Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa pretende criar uma nova abordagem visando solucionar o problema da falta de vascularização no produto da engenharia de tecido, em especial para reparo de tecido ósseo. Dessa forma, a primeira etapa desse projeto visa estabelecer o cultivo de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hASC), avaliar a biocompatibilidade de membranas derivadas do polihidroxibutirato (PHB) e do seu co-polímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHB-HV) e promover a diferenciação dessas células-tronco em células endoteliais. Através de análises *in vitro* foi possível demonstrar que a membrana de nanofibras baseada em PHB/PHB-HV apresenta biocompatibilidade com as células-tronco isoladas do tecido adiposo humano, favorecendo a adesão, a viabilidade e a proliferação dessas células. Ao serem implantadas *in vivo*, a membrana de PHB/PHB-HV não induziu uma resposta inflamatória intensa e não afetou a função dos tecidos adjacentes ao implante, possibilitando sua utilização *in vivo*. Além disso, quando induzidas a diferenciação endotelial, as hASC passaram a expressar marcadores específicos de células endoteliais, tornando possível a utilização dessas células diferenciadas, juntamente com a membrana de PHB/PHB-HV, para auxiliar a vascularização de matrizes tridimensionais.

**Palavras chave:** células-tronco, polihidroxibutirato, vascularização, engenharia de tecidos.

Tissue engineering is a field of regenerative medicine based on the association of cell culture in structural matrices and the incorporation of signaling molecules, targeting tissue regeneration. Despite its enormous potential, this strategy faces a major challenge concerning the maintenance of cell viability after the implantation of the constructs. The lack of a functional vasculature within the implant compromises the nutrition and removal of metabolites by cells, which can lead to implant failure. In this context, our research group is trying to create a new strategy for enhancing vascularization in tissue engineering, especially for bone tissue. The aim of this project is to establish a culture of human adipose tissue derived stem cells (hASC) in order to evaluate the biocompatibility of nanofiber meshes derived from polyhydroxybutyrate (PHB) and its copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-HV), and to promote the differentiation of stem cells into endothelial cells. Through *in vitro* assays, it was demonstrated that PHB/PHB-HV nanofiber meshes is biocompatible with stem cells isolated from human adipose tissue, and that it promotes cell adhesion, cell viability and proliferation. When implanted *in vivo*, the PHB/PHB-HV nanofiber meshes did not induce a high inflammatory response and did not affect the function of tissues in the region of the implant. Moreover, when cultured with endothelial differentiation medium, the hASC expressed endothelial markers. Taken together, the data presented above allow to suggest that it would be possible to use hASC derived differentiated cells cultured in PHB/PHB-HV nanofiber meshes to enhance the vascularization of tissue-engineered grafts.

Keywords: stem cells, polyhydroxybutyrate, vascularization, tissue engineering.



## *1. Introdução*

---

## 1.1 Engenharia de tecidos

A medicina regenerativa é uma área de pesquisa emergente com a qual se pretende auxiliar a regeneração de tecidos e órgãos lesados por trauma, doenças degenerativas ou senescência (Arosarena, 2005).

A perda de um tecido ou órgão é um dos problemas mais frequentes e mais onerosos na saúde humana. Quando isso ocorre, é necessária a realização de transplante com órgãos de doadores ou a substituição por órgãos artificiais. No entanto, esses tratamentos cirúrgicos apresentam algumas barreiras. Apesar dos avanços na engenharia biomédica, os órgãos artificiais ainda apresentam falhas na biocompatibilidade e na biofuncionalidade. Já o transplante de órgãos enfrenta problemas atuais que incluem a escassez de doadores e a rejeição imunológica (Ikada, 2006). Dessa forma, espera-se que o desenvolvimento de métodos para regenerar tecidos ou reconstruir órgãos inteiros através da engenharia de tecidos possa beneficiar milhares de pessoas (Laschke, Harder *et al.*, 2006).

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia e das ciências da vida no desenvolvimento de substitutos biológicos com o intuito de restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido (Langer e Vacanti, 1993).

Na engenharia de tecidos, a presença de um material que age como uma superfície de adesão e promoção do crescimento celular é essencial, pois permite a sinalização entre as células, a produção de moléculas bioativas e a formação de matriz extracelular, favorecendo assim, a regeneração tecidual (Andersson e Van Den Berg, 2004). Através da fabricação de matrizes estruturais, da inclusão de células e da incorporação de moléculas indutoras, acredita-se que se possa facilitar o mecanismo de regeneração.

As matrizes estruturais utilizadas são produzidas a partir de diferentes tipos de biomateriais e devem possuir propriedades adequadas para o tecido que se deseja substituir (Cheung, Lau *et al.*, 2007).

As células utilizadas na engenharia de tecidos podem ser células especializadas ou células-tronco. No entanto, existem dificuldades na obtenção, no cultivo e na expansão de algumas células especializadas. Dessa forma, as células-

tronco são uma fonte atraente de células para a engenharia tecidual, uma vez que possuem auto-renovação e quando devidamente estimuladas podem se diferenciar em diversos tipos celulares (Arosarena, 2005).

A engenharia de tecidos ainda enfrenta muitos desafios, incluindo o isolamento e expansão de tipos apropriados de células, o arranjo das células em matrizes estruturais com correta organização espacial e a criação do microambiente ideal para o crescimento e diferenciação (Jain, Au *et al.*, 2005)

## 1.2 Biomateriais

O termo biomaterial compreende qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada ao organismo por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (Williams, 1987).

A utilização dos biomateriais para o reparo de tecidos vivos tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas, devido ao desenvolvimento de novos materiais e a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na sua interação com os organismos vivos (Huebsch e Mooney, 2009).

De acordo com Cheung (2007), os biomateriais podem ser classificados como:

- (i) naturais: colágeno, alginato, polissacarídeos, quitosana, amido de milho, seda;
- (ii) sintéticos: cerâmicas, metais e polímeros sintéticos;
- (iii) compósitos: composto por mais de um tipo de material.

Na engenharia de tecido, os biomateriais devem funcionar como uma matriz extracelular (MEC) artificial e possuir as funções mecânicas e biológicas da MEC encontrada no tecido ao qual se deseja regenerar. A MEC é responsável pela adesão, proliferação e regulação do fenótipo celular, pela estrutura do tecido e pela organogênese. Sendo assim, o biomaterial deve promover a adesão celular e auxiliar na inserção de células e/ou moléculas bioativas no local da lesão podendo

ser processado em estruturas tridimensionais que facilitam a formação do novo tecido (Kim e Mooney, 1998).

Dessa forma, os materiais utilizados em engenharia de tecidos funcionam tanto como suporte físico quanto como substrato para adesão celular durante a cultura *in vitro* e subsequente implantação (Zhao, Deng *et al.*, 2003).

Para ser utilizado com sucesso na engenharia de tecidos, o biomaterial deve ser biocompatível, promover a interação celular e o desenvolvimento do novo tecido, e possuir propriedades físicas e mecânicas ideais. Além disso, deve ser biodegradável e biofuncional (Kim, Baez *et al.*, 2000).

A biocompatibilidade se refere à capacidade de um biomaterial de desempenhar a sua função desejada sem suscitar quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis possibilitando a resposta celular e tecidual mais adequada para uma aplicação específica (Williams, 2008).

Os biomateriais devem possuir propriedades mecânicas adequadas para a regeneração de um determinado tecido. Eles devem fornecer um suporte mecânico temporário suficiente para resistir às forças exercidas *in vivo* pelos tecidos circundantes e manter um espaço potencial para o desenvolvimento do novo tecido. O suporte mecânico fornecido pelo biomaterial deve ser mantido até que o tecido formado possua integridade suficiente para se sustentar. Isto pode ser conseguido através da escolha adequada do biomaterial e do seu processamento (Kim, Baez *et al.*, 2000).

A biodegradação é outro fator importante na escolha do biomaterial. Consiste no fenômeno em que o biomaterial é degradado ou solubilizado em água para desaparecer do local no qual foi implantado. O biomaterial pode ser degradado por hidrólise ou digestão enzimática. Os produtos da degradação não devem provocar inflamação ou toxicidade e devem ser removidos através de vias metabólicas (Tabata, 2009).

A cinética da degradação é crucial e dependente do tecido que se deseja regenerar. Por exemplo, para a regeneração de tecido ósseo é necessário utilizar um biomaterial que possua uma taxa de degradação lenta, uma vez que se deve manter a resistência mecânica até que o novo tecido esteja estruturado. Já para engenharia de tecido de pele, a matriz formada pelo biomaterial não precisa ser

mantida por mais de um mês. A permanência do biomaterial por períodos além do necessário pode prejudicar a regeneração tecidual ao invés de promovê-la. Sendo assim, a cinética da degradação do biomaterial utilizado também influencia no sucesso da regeneração tecidual (Andersson e Van Den Berg, 2004).

A matriz tridimensional produzida a partir de um biomaterial deve possuir poros interconectados, permitindo a adesão e migração das células para o seu interior. Além disso, a presença de poros permite a formação de vasos sanguíneos, importantes para a nutrição e remoção de metabólitos e, conseqüentemente, para a sobrevivência das células. O tamanho ideal de poros deve estar entre 100 e 500 $\mu$ m (Ikada, 2006).

Existem várias formas de se processar os biomateriais para se obter estruturas com diferentes características. Os tipos do biomaterial e do processamento vão determinar o formato, o tamanho, o grau de porosidade e as propriedades físicas e mecânicas da matriz estrutural.

Vários tipos diferentes de processamento são capazes de produzir matrizes porosas: lixiviação de partículas de sal, liofilização, extrusão com agente expensor, colagem de fibras e plotagem em 3D (Sachlos e Czernuszka, 2003; Salgado, Coutinho *et al.*, 2004). A Tabela 1 compara alguns dos métodos de produção de matrizes porosas.

**Tabela 1:** Aspectos Principais Ligados à Produção de Matrizes Porosas

Método de Fabricação	Diâmetro dos poros ( $\mu$ m)	Porosidade (%)	Características
Lixiviação de partículas de sal	30-300	20-60	Poros esféricos com baixa conectividade
Liofilização	<200	<97	Macroporos interconectados e microporosidade presente
Extrusão com agente expensor	20-500	<60	Poros não totalmente interconectados
Colagem de fibras	20-100	<95	Baixas propriedades mecânicas
Plotagem em 3D	45-100	<60	Poros totalmente interconectados

(adaptado de Oréfice, RL 2005)

Recentemente, uma nova técnica de processamento de biomateriais, *electrospinning*, tem atraído a atenção de vários pesquisadores. Isto porque, a partir dessa técnica é possível produzir estruturas de nanofibras semelhantes à estrutura da MEC de vários tecidos (Martins, Araujo *et al.*, 2007; Araujo, Martins *et al.*, 2008; Pinho, Martins *et al.*, 2009). Fibras que variam de 50 a 1000nm ou mais, são produzidas através da aplicação de um potencial elétrico a uma solução polimérica (Vasita e Katti, 2006).

O processamento por *electrospinning* consiste em se colocar uma solução polimérica em uma seringa ligada a uma agulha e aplicar a essa, um potencial elétrico. Quando a força eletrostática ultrapassa a tensão superficial da solução polimérica, é criada uma instabilidade que produz jatos de fibras que são coletadas em um coletor. A formação das fibras ocorre quando as propriedades intrínsecas da solução polimérica e os parâmetros de processamento são otimizados (McCullen, Stevens *et al.*, 2007).

O peso molecular do polímero influencia a taxa de degradação das nanofibras e as propriedades da solução polimérica como, viscosidade, tensão superficial e condutividade, determinam o diâmetro das nanofibras e reduzem a possibilidade de formação de gotas. Parâmetros relacionados ao sistema, como o diâmetro do orifício da agulha, a taxa de fluxo da solução polimérica, e o valor do potencial elétrico também influenciam no diâmetro das fibras. A distância entre o capilar e o coletor determina o grau de evaporação do solvente e o padrão de deposição das nanofibras no coletor. A variação desses parâmetros possibilita criar diferentes estruturas de nanofibras apropriadas para uma utilização específica (Vasita e Katti, 2006).

Vários polímeros, naturais e sintéticos, já foram utilizados para produzir nanofibras pela técnica de *electrospinning*, dentre eles: colágeno (Matthews, Wnek *et al.*, 2002; Shields, Beckman *et al.*, 2004), gelatina (Songchotikunpan, Tattiyakul *et al.*, 2008), quitosana (Li e Hsieh, 2006; Pinho, Martins *et al.*, 2009), poli(ácido láctico) (PLA) (McCullen, Stevens *et al.*, 2007), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (Martins, Araujo *et al.*, 2007; Soliman, Pagliari *et al.*, 2009), polihidroxibutirato (PHB) (Suwantong, Waleetorncheepsawat *et al.*, 2007) e poli(ácido láctico)-co-poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PLACL) (Gupta, Venugopal *et al.*, 2009).

De acordo com vários estudos, os biomateriais poliméricos são os que possuem propriedades químicas e mecânicas que mais se aproximam das propriedades da maioria dos tecidos biológicos (Seal, Otero *et al.*, 2001). Além disso, a possibilidade de alterar grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular das cadeias dos polímeros pode auxiliar na fabricação de materiais que induzam interações específicas entre o biomaterial e o tecido hospedeiro (Oréfice, RL. 2005). Alguns fatores aceleram a degradação do polímero, como por exemplo:

- (i) Cadeia principal mais susceptível à hidrólise;
- (ii) Grupos finais mais hidrofílicos;
- (iii) Grupos mais sujeitos à hidrólise, mais reativos na cadeia principal;
- (iv) Menor cristalinidade;
- (v) Maior porosidade.

Exemplos de polímeros biodegradáveis utilizados em engenharia de tecidos são: poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) policaprolactona (PCL) e polihidroxiálcanoato (PHA) (Lavik e Langer, 2004).

### 1.3 Polihidroxiálcanoatos

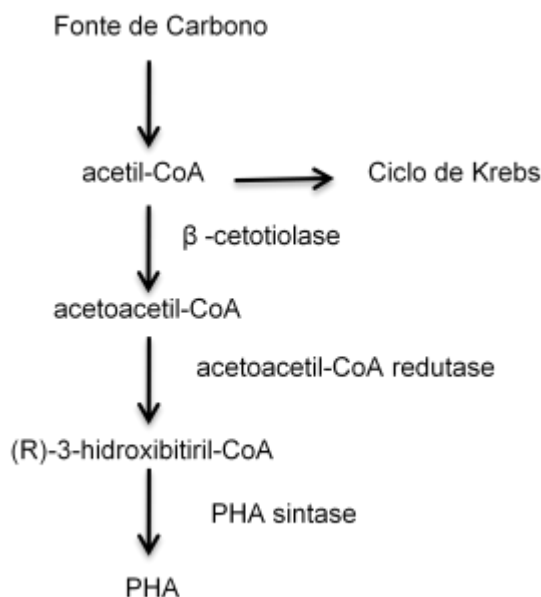
Uma família de polímeros bastante atrativa é a família dos Polihidroxiálcanoatos (PHA), pois além de biodegradáveis, esses polímeros também são biocompatíveis, podendo ser utilizados em diversas aplicações na área médica (Chen e Wu, 2005).

Os Polihidroxiálcanoatos (PHA) constituem uma família de poliésteres produzidos por microrganismos sob condições de crescimento não balanceadas, como por exemplo, grandes quantidades de fontes de carbono e quantidades limitadas de nitrogênio, fósforo ou oxigênio. Esses polímeros são acumulados em grânulos intracelulares de 0,2-0,5µm de diâmetro e sua função se assemelha ao glicogênio sintetizado e estocado pelos mamíferos (Lee, 1996).

A ocorrência de PHA em bactérias é conhecida desde a década de 1920, mas apenas recentemente essa família de biopolímeros vem sendo estudada para

aplicações na engenharia de tecidos (Zhao, Deng *et al.*, 2003; Verlinden, Hill *et al.*, 2007). Cerca de 90 gêneros de bactérias, incluindo gram-positivas e gram-negativas, já foram relatados como produtores de PHA (Mitomo, Takahashi *et al.*, 1999; Zinn, Witholt *et al.*, 2001; Elbahloul e Steinbuchel, 2009; Singh, Patel *et al.*, 2009).

O processo de biossíntese do PHA em bactérias consiste na conversão da acetil-coenzimaA (acetil-CoA) em PHA por três enzimas. Em linhas gerais, primeiramente ocorre a metabolização da fonte de carbono no substrato acetil-CoA. A enzima  $\beta$ -cetotiolase combina duas moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. A acetoacetil-CoA redutase, reduz por NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) o acetoacetil-CoA em (R)-3-hidroxitiril-CoA. O (R)-3-hidroxitiril-CoA é então polimerizado em PHA pela PHA sintase, liberando a coenzimaA (Fig. 1).



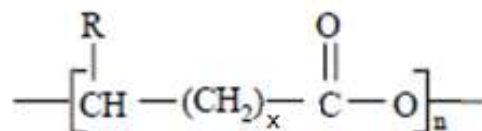
**Figura 1:** Via metabólica do PHA. Adaptado de Verlinden (2007).

Quando o suprimento dos nutrientes é restaurado, o PHA armazenado pode ser degradado pela PHA depolimerase intracelular e, posteriormente metabolizado como fonte de carbono e energia (Lee, 1996).

Membros da família PHA, podem existir como homopolímeros de ácidos hidroxialcanóicos (Figura 2), bem como copolímeros formados por dois ou mais ácidos hidroxialcanóicos. A composição dos monômeros de PHA é variável e pode



ser manipulada por meio da fonte de carbono utilizada e da alteração das condições de crescimento das bactérias.



**Figura 2:** Estrutura genérica do PHA. Adaptado de Chen (2005).

O tamanho da cadeia polimérica pode variar de 100 a 30000 repetições fornecendo um grande número de PHAs com propriedades físicas e propriedades mecânicas variadas. Na estrutura genérica acima, R pode ser hidrogênio ou cadeias hidrocarbônicas com comprimentos de até 13 átomos de carbono, e x pode ser um ou até três átomos de carbono. Variações em R e x têm efeito sobre a hidrofobicidade, temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e no grau de cristalinidade (Verlinden, Hill *et al.*, 2007).

Mais de 100 diferentes tipos de monômeros de PHA, com diferentes estruturas já foram relatados (Misra, Valappil *et al.*, 2006). No entanto, somente alguns PHAs como, por exemplo, o polihidroxi butirato (PHB), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHB-HV), poli 4-hidroxi butirato (P4HB), poli(3-hidroxi butirato-3-hidroxi hexanoato) (PHBHHx) e polihidroxi octanoato (PHO) são disponíveis em quantidades suficientes para aplicações em pesquisa (Chen e Wu, 2005).

Os PHA são considerados biocompatíveis por serem produtos do metabolismo celular e também, pelo fato de que seu produto de degradação, o ácido 3-hidroxi butírico, é encontrado normalmente no plasma sanguíneo em concentrações entre 0,3 – 1,3mM. Essa característica possibilita a utilização do PHA para várias aplicações médicas como confecção de fios de suturas cirúrgicas, curativos, sistema de liberação de drogas e matrizes estruturais para engenharia de tecidos (Chen e Wu, 2005). No entanto, é necessário que os PHA passem por técnicas avançadas de extração e purificação para que não ocorra contaminação com endotoxinas bacterianas (Sevastianov, Perova *et al.*, 2003).

No processo de produção, após a fermentação, as bactérias são separadas do meio de cultura através de centrifugação. Os métodos de extração e purificação mais utilizados envolvem o uso de solventes orgânicos como acetona, clorofórmio,

cloreto de metileno, dicloroetano e dimetilformamida. Como alternativa para esse método, tem sido proposto tratamento com amônia (Page e Cornish, 1993), digestão com hipoclorito de sódios e surfactantes (Choi e Lee, 1999) e tratamento enzimático (Kapritchkoff, Viotti *et al.*, 2006). Para aplicações médicas, a extração por solventes é bastante vantajosa devido ao elevado grau de pureza dos PHA recuperados (Verlinden, Hill *et al.*, 2007).

Além da aplicabilidade do PHA na área médica, esses polímeros possuem características ideais para aplicação no setor industrial. Vários microrganismos na natureza são capazes de degradar o PHA através da PHA depolimerase extracelular, gerando dióxido de carbono e água. A taxa de degradação do PHA varia de meses a poucos anos. A biodegradabilidade e o fato de existirem PHA com características semelhantes ao plástico convencional, produzido a partir de polipropileno (PP), fazem do PHA uma atraente alternativa para criação de plásticos biodegradáveis (Jendrossek e Handrick, 2002). Além disso, a produção de PHA se baseia na utilização de recursos renováveis no lugar de combustíveis fósseis. Sendo assim, os PHA são considerados bons substitutos para os polímeros petroquímicos (Gavrilescu e Chisti, 2005).

No Brasil, no início da década de 90, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas, juntamente com a cooperativa dos produtores de cana-de-açúcar e álcool do Estado de São Paulo, iniciaram a produção de dois membros da família PHA, o PHB e o PHB-HV, a partir da fermentação do xarope da cana de açúcar por bactérias do gênero *Alcaligenes*. A produção de PHB e PHB-HV, integrada à produção de açúcar e álcool em usinas de processamento de cana-de-açúcar representa uma grande oportunidade para produção de polímeros a baixo custo e expansão da indústria de cana. Neste caso, a energia necessária aos processos de produção provém da queima do bagaço de cana, os efluentes do processo e a biomassa resultante após extração do polímero são utilizados como fertilizantes na plantação da cana. Os solventes utilizados na purificação do polímero são derivados da fermentação alcoólica, fechando-se o ciclo de produção sem representar impacto ambiental.

A única produção industrial de PHB e PHB-HV a partir de cana-de-açúcar, utilizando essa produção integrada em usina sucroalcooleira, está sendo realizada pela indústria brasileira PHB Industrial S.A. Os custos de produção da PHB Industrial

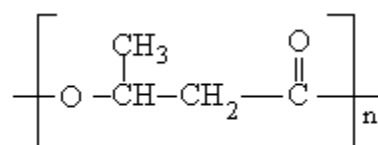
são os menores do mundo. Enquanto na Europa o polímero é produzido a US\$ 10-20/kg, no Brasil esses custos estão entre US\$ 2,5 – 5/kg (Squio e Aragão, 2004)

Atualmente as principais aplicações estudadas para o PHB e PHB-HV produzidos no Brasil são:

- (i) Tecnologia de Injeção;
- (ii) Tecnologia de Extrusão / Termoformagem
- (iii) Substituto de Polímeros Olefínicos em embalagens
- (iv) Embalagens de Cosméticos
- (v) Embalagens de Alimentos
- (vi) Embalagens de Defensivos Agrícolas
- (vii) Utilização na Área Médica

#### 1.4 Propriedades do Polihidroxiacetato e Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

Quando na fórmula genérica dos PHA, o R é o grupo metil (CH<sub>3</sub>) e x = 1, o polímero é o PHB (Figura 3). O PHB foi primeiramente isolado e caracterizado entre 1923 e 1926 pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne. O PHB possui unidades repetidas de 3- hidroxiacetato e é o mais comum e o mais produzido entre os PHA (Lee, 1996).



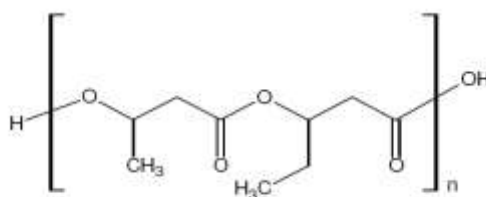
**Figura 3:** Estrutura química do PHB. Adaptado de Lee (1996).

O PHB isolado de bactérias possui cristalinidade entre 55-80% ao passo que no interior da bactéria se encontra no estado amorfo como inclusões insolúveis em água. O PHB forma cristais lamelares extremamente finos que são organizados em cristais simples e alongados quando crescem a partir de soluções diluídas ou esferulitos quando crescem a partir do estado fundido. A deformação na fratura para

o PHB é de aproximadamente 5%. Esse comportamento é responsável pelo PHB ser um material duro e quebradiço (Misra, Valappil *et al.*, 2006).

O PHB é um polímero termoplástico cristalino com a temperatura de transição vítrea em torno de 5°C. A temperatura de fusão em torno de 180°C, próxima ao ponto de degradação térmica, aproximadamente 200°C, faz com que o PHB seja termicamente instável. O PHB possui propriedades mecânicas como resistência mecânica e módulo de elasticidade, semelhantes aos polímeros sintéticos. Entretanto, a elevada fragilidade cristalina e a instabilidade térmica são desvantagens para a sua utilização (Lee, 1996).

Através da incorporação de subunidades de 3-hidroxi-valerato (HV) ao PHB, formando o copolímero PHB-HV (figura 4), é possível aumentar a flexibilidade e melhorar as propriedades mecânicas desse polímero.



**Figura 4:** Estrutura química do PHB-HV. Adaptado de Lee (1996).

O polímero se torna mais resistente (aumenta o impacto de resistência) e mais flexível (diminuição no módulo de elasticidade) à medida que se aumenta a porcentagem de HV. Além disso, a diminuição da temperatura de fusão sem interferir na temperatura de degradação, permite o processamento térmico por fusão sem a ocorrência de degradação do polímero. (Misra, Valappil *et al.*, 2006; Verlinden, Hill *et al.*, 2007).

As propriedades como flexibilidade, resistência ao impacto e taxa de degradação do PHB-HV podem ser controladas pela adição da fração HV durante a fermentação. Isso é possível incorporando ácido propiônico ou ácido valérico à fonte de carbono no processo de fermentação das bactérias (Khanna e Srivastava, 2007; Lee, Loo *et al.*, 2008).

O PHB e o PHB-HV podem ser utilizados associados a outros biomateriais, naturais ou sintéticos, formando compósitos para a construção de matrizes estruturais com diferentes propriedades. Ambos os polímeros já vêm sendo

utilizados na construção de matrizes estruturais para engenharia de tecidos demonstrando biocompatibilidade com várias linhagens celulares como fibroblastos (Rathbone, Furrer *et al.*, 2009), condrócitos (Zhao, Deng *et al.*, 2003), células de Schwann (Suwantong, Waleetorncheepsawat *et al.*, 2007) e osteoblastos (Kose, Kenar *et al.*, 2003; Kumarasuriyar, Jackson *et al.*, 2005). No entanto, existem poucos estudos avaliando a biocompatibilidade desses polímeros com as células-tronco.

Tang e Wu (2006) analisaram a adesão celular e a citotoxicidade de matrizes compostas por blendas de PHB-HV e Polibutileno succinato em diferentes concentrações utilizando células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de coelho. Seus resultados mostraram que as blendas compostas de 50:50 (p/p) PHB-HV/Polibutileno succinato obtiveram a melhor aderência e proliferação celular, propondo sua utilização na engenharia de tecido vascular.

O trabalho desenvolvido por Rentsch (2010) avaliou o potencial osteogênico de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana utilizando matrizes de PHB revestidas com colágeno. As matrizes de PHB obtidas forneceram suporte tridimensional com poros interconectados que garantiram a migração, proliferação e diferenciação *in vitro*. Além disso, as células-tronco semeadas na matriz de PHB e implantadas no subcutâneo de ratos atímicos foram capazes de sobreviver após seis semanas e foi detectada a presença de marcadores da linhagem osteogênica.

Recentemente, foi desenvolvido o primeiro estudo utilizando como suporte blendas de PHB/PHBHHx para a formação de cartilagem *in vivo*, através da diferenciação de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano. Foi demonstrado que as células diferenciadas no PHB/PHBHHx implantadas no dorso de camundongos *nude*, formaram um tecido similar ao cartilaginoso após 12 e 24 semanas do implante, sugerindo que o PHB/PHBHHx seja um material adequado para a engenharia de tecido cartilaginoso (Ye, Hu *et al.*, 2009).

## 1.5 Fontes de Células-tronco para aplicação na Engenharia de tecidos

À medida que a utilização de produtos da engenharia de tecidos se aproxima das aplicações clínicas, um grande desafio se estabelece para a obtenção de

quantidades suficientes de células para o uso clínico. Uma célula ideal deve possuir algumas características como: estar disponível em quantidades suficientes, ser capaz de exercer a função destinada a ela, ser isolada com mínima morbidade da área doadora e ser compatível com o sistema imunológico do receptor (Jain, Au *et al.*, 2005).

Dessa forma, a fonte de células tem uma enorme influência sobre o sucesso da engenharia de tecidos.

As células aplicáveis à engenharia de tecidos podem ser classificadas como autólogas (do próprio paciente), alogênicas (célula humana de outro paciente) e xenogênica (origem animal) As células autólogas são as mais apropriadas para a engenharia de tecidos uma vez que, as células alogênicas e xenogênicas são imunogênicas tornando-se necessária a utilização de terapias com imunossuppressores. Nesse contexto, um tipo bastante atraente de células para a engenharia de tecidos são as células-tronco (Ikada, 2006).

As células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em diferentes tipos celulares (Gepstein, 2002). As células-tronco estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto. Podem ser classificadas pelo potencial de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

O ovócito fecundado e as células do blastômero são considerados células-tronco totipotentes porque possuem a capacidade de gerar um organismo completo, incluindo os anexos embrionários. (Lo, Chuang *et al.*, 2003).

As células-tronco embrionárias são extraídas da massa interna do blastocisto e possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular derivado dos três folhetos embrionários. Por isso, são consideradas células pluripotentes. As células-tronco embrionárias produzem os fatores de transcrição Oct-4, Nanog e Sox2 responsáveis pela manutenção do estado de pluripotência (Gokhale e Andrews, 2009).

O isolamento de linhagens de células-tronco pluripotentes humanas alimentou a imaginação e a esperança da comunidade científica e médica (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998). No entanto, essas células exibem um potencial de formação de teratomas quando introduzidas em camundongos imundeficientes. Dessa forma,

limita-se a sua utilização em humanos até que se conheçam métodos eficientes de diferenciação e seleção (Nussbaum, Minami *et al.*, 2007). Além disso, sua obtenção e utilização geram questionamentos éticos, políticos e religiosos (Fischbach e Fischbach, 2004).

No Brasil, a utilização de células-tronco embrionárias é permitida de acordo com a Lei de Biossegurança (Lei 11.105), de 24 de março de 2005 (Pereira, L.V. 2008).

Uma fonte alternativa às células-tronco embrionárias bastante promissora é a fonte de células-tronco de pluripotência induzida. Takahashi e Yamanaka (2006) demonstraram que através de manipulações genéticas, é possível reverter o processo de diferenciação de uma célula adulta, ou seja, induzindo a expressão de fatores como Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, células diferenciadas podem retornar ao estado de pluripotência semelhante às células-tronco embrionárias. Embora vários aspectos sobre a indução, cultivo e manutenção dessas células ainda devam ser esclarecidos, elas demonstram ser uma fonte promissora de células autólogas para utilização na medicina regenerativa.

Outra alternativa às células-tronco embrionárias são as células-tronco adultas. Essas células são consideradas multipotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares, mas não em todos derivados dos três folhetos embrionários. Podem ser isoladas de tecidos fetais, placenta, cordão umbilical e vários tecidos do indivíduo adulto (Fauza, 2004; Da Silva Meirelles, Chagastelles *et al.*, 2006; De Coppi, Bartsch *et al.*, 2007).

Inicialmente, acreditava-se que as células-tronco adultas só se diferenciavam em linhagens celulares do tecido ao qual residem. No entanto, sob condições especiais, estas células podem se transdiferenciar, ou seja, uma célula-tronco de um tecido pode gerar um tipo celular especializado de outro tecido ou de outro folheto germinativo (Ringe, Kaps *et al.*, 2002).

As células-tronco adultas mais bem estudadas e caracterizadas são as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (Hipp e Atala, 2008).

As células-tronco hematopoiéticas são responsáveis pela renovação das células sanguíneas e do sistema imune. Em resposta a fatores de crescimento

humoral e citocinas específicas, essas células se comprometem com uma das duas linhagens distintas de células precursoras: mielóide ou linfóide (Kawamoto e Katsura, 2009).

As células-tronco hematopoiéticas são encontradas na medula óssea, sangue periférico, e mais recentemente, no sangue do cordão umbilical (Schlechta, Wiedemann *et al.*, 2009).

Essas células já são utilizadas em transplantes para regeneração do sistema hematopoiético desde 1956 (Hipp e Atala, 2008). Mas, apenas recentemente, tem sido demonstrado o potencial dessas células em se diferenciarem em outros tipos celulares como hepatócitos (Lagasse, Connors *et al.*, 2000) e células da glia (Eglitis e Mezey, 1997; Hess, Abe *et al.*, 2004).

As células-tronco hematopoiéticas expressam a molécula de superfície CD34, diferentemente das células-tronco mesenquimais, sendo o marcador de superfície mais utilizado para caracterizar e isolar essas células. O CD34 é uma glicofosfoproteína responsável pelo ancoramento das células-tronco hematopoiéticas ao estroma medular (Krause, Fackler *et al.*, 1996).

As células-tronco mesenquimais foram primeiramente descritas como a porção de células aderentes extraídas da medula óssea, denominadas células formadoras de colônias fibroblásticas (Friedenstein, Chailakhjan *et al.*, 1970).

Mais adiante, Caplan *et al.* (2001) denominou como células-tronco mesenquimais uma população de células presentes no estroma da medula óssea, capazes de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares de origem mesodérmica como osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

Atualmente, células com características semelhantes às células-tronco mesenquimais da medula óssea foram isoladas de diversos tecidos como tecido adiposo (Zuk, Zhu *et al.*, 2001), pele (Toma, Akhavan *et al.*, 2001), pulmões (Sabatini, Petecchia *et al.*, 2005) e líquido amniótico (De Coppi, Bartsch *et al.*, 2007).

Devido ao grande número de estudos descrevendo a presença de células-tronco mesenquimais em diferentes tecidos, a sociedade internacional para terapia celular propôs critérios mínimos para a definição de células-tronco mesenquimais (Dominici, Le Blanc *et al.*, 2006):



- (i) serem aderentes a superfícies de plástico quando mantidas em condições de cultivo padronizadas;
- (ii) expressarem os antígenos de superfície CD73, CD90, CD105 e não expressarem os antígenos CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR;
- (iii) quando estimuladas *in vitro*, diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

A porcentagem de células-tronco existente em tecidos adultos é bastante baixa e, dependendo do tecido, isolar essas células para a utilização na medicina regenerativa se torna bastante complicado. Sendo assim, as células-tronco adultas mais utilizadas para estudos nessa área são as células extraídas da medula óssea e do tecido adiposo (Romanov, Darevskaya *et al.*, 2005).

O tecido adiposo apresenta algumas vantagens em relação à medula óssea. Esse tecido pode ser facilmente extraído em grandes quantidades através da lipoaspiração. Além disso, a frequência e a taxa de proliferação das células-tronco no tecido adiposo são maiores do que na medula óssea (frequência: 2% para tecido adiposo enquanto que 0,002% para medula óssea), sendo considerado a fonte mais abundante e acessível de células-tronco adultas (Strem, Hicok *et al.*, 2005; Mizuno, 2009).

As células-tronco do tecido adiposo humano (hASC – *human adipose stem cells*) foram primeiramente isoladas por Zuk e colaboradores em 2001. Esse grupo isolou células a partir da fração estromal do tecido adiposo capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos, e com características semelhantes às células-tronco mesenquimais da medula óssea.

Recentemente já foi demonstrado o potencial de diferenciação dessas células em células endoteliais (Planat-Benard, Silvestre *et al.*, 2004), cardiomiócitos (Strem, Zhu *et al.*, 2005), células pancreáticas (Timper, Seboek *et al.*, 2006), neurônios (Anghileri, Marconi *et al.*, 2008) e hepatócitos (Aurich, Sgodda *et al.*, 2009).

Diante das várias vantagens das células-tronco do tecido adiposo humano, estas se tornaram uma atraente fonte de células para a engenharia de tecidos.

Na engenharia de tecido ósseo, estudos têm demonstrado que as ASC derivadas de murinos e humanos exibem boas propriedades de adesão a vários tipos de biomateriais mantendo a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos

quando semeadas nessas matrizes. A diferenciação osteogênica de ASC já foi promovida em matrizes de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA (Cowan, Shi *et al.*, 2004), colágeno (Gabbay, Heller *et al.*, 2006), beta-fosfato tricálcico (TCP) (Hattori, Masuoka *et al.*, 2006), e Poli(ácido láctico)-PLA/beta TCP, PLA/ vidro bioativo (Haimi, Suuriniemi *et al.*, 2009).

O potencial de diferenciação condrogênica das ASC utilizando matrizes tridimensionais para engenharia de tecido cartilaginoso, também foi demonstrado utilizando diferentes tipos de biomateriais como gelatina (Awad, Wickham *et al.*, 2004), sulfato de condroitina (Wei, Hu *et al.*, 2008), PCL (Moutos e Guilak, 2009) e PHB/PHBHHx (Ye, Hu *et al.*, 2009).

A diferenciação adipogênica foi demonstrada pelas ASC semeadas em diferentes matrizes como colágeno (Von Heimbürg, Zachariah *et al.*, 2001), PLGA (Choi, Cha *et al.*, 2006) e cola de fibrina (Mizuno, Itoi *et al.*, 2008).

Vários outros tipos de biomateriais estão sendo utilizados em associação com as ASC na perspectiva de se regenerar diversos tecidos além dos já anteriormente citados (Flynn, Prestwich *et al.*, 2008; Heydarkhan-Hagvall, Schenke-Layland *et al.*, 2008; Mizuno, 2009).

## 1.6 Vascularização na Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos tem sido uma área ativa de pesquisa nas últimas décadas. No entanto, a quantidade de aplicações clínicas no campo da engenharia de tecidos ainda é limitada. Um obstáculo crítico da engenharia de tecido baseada em cultivo *in vitro* de constructos células/matrizes, anterior a implantação, é a capacidade dessas células manterem-se viáveis após a transferência desses constructos para o hospedeiro (Nomi, Atala *et al.*, 2002).

*In vivo*, a maioria das células está a menos de 100 µm de distância de uma zona de capilaridade. Esses capilares fornecem oxigênio e nutrientes, além de remover os resíduos e transportar sinais bioquímicos (Vunjak-Novakovic e Freed, 1998).

No caso de implantes na engenharia de tecidos, o fornecimento de oxigênio e nutrientes é muitas vezes limitado ao processo de difusão que só pode suprir células

distantes a 100-200µm do próximo capilar. Sendo assim, para que enxertos de células/matrizes de tamanhos maiores possam sobreviver, é necessário que ocorra a vascularização desse implante (Cassell, Hofer *et al.*, 2002).

Após a implantação do constructo célula/matrizes, os vasos sanguíneos do hospedeiro, geralmente começam a penetrar no implante para formação de uma rede de capilares. Isso ocorre como uma resposta à reação inflamatória causada pelo procedimento cirúrgico e, também, devido ao fato de que no interior do implante é gerado um estado de hipóxia, o que faz com que as células do local secretem fatores angiogênicos (Laschke, Harder *et al.*, 2006). No entanto, essa infiltração é limitada a alguns décimos de micrômetros por dia, o que significa, que o tempo necessário para a vascularização completa de um implante de vários milímetros é da ordem de semanas. Durante esse período, a vascularização insuficiente resulta na morte celular por hipóxia e consequente insucesso do implante (Rouwkema, Rivron *et al.*, 2008).

No caso de enxertos ósseos, a falta de uma boa vascularização é considerada um dos principais fatores responsáveis pelo fracasso do implante. No tecido ósseo, a angiogênese é um processo fundamental para o reparo e formação de um novo tecido. A formação de novos vasos está intimamente envolvida com a osteogênese (intramembranosa e endocondrial). Na formação óssea intramembranosa, uma extensa vascularização é observada durante a transição de pré-osteoblastos para osteoblastos (Deckers, Van Bezooijen *et al.*, 2002). Durante a ossificação endocondral, um modelo de cartilagem avascular é substituído por tecido ósseo altamente vascularizado (Maes, Carmeliet *et al.*, 2002). No reparo de fraturas a formação de calos fibrosos está acompanhada por uma forte atividade angiogênica (Carano e Filvaroff, 2003). Além disso, a vascularização é essencial para a sobrevivência das células implantadas.

Sendo assim, estratégias que favoreçam a angiogênese são essenciais para se garantir o desenvolvimento de novos tecidos a partir da engenharia de tecidos. Várias abordagens têm surgido para tentar solucionar a falta de vascularização, tais como a moldagem da matriz estrutural, inclusão de fatores angiogênicos, pré-vascularização *in vivo* e pré-vascularização *in vitro* (Rouwkema, Rivron *et al.*, 2008).

A moldagem da matriz estrutural tem um profundo efeito no grau de vascularização após a implantação. O tamanho do poro é um determinante crítico para a penetração de vasos sanguíneos. Poros acima de 250  $\mu\text{m}$  favorecem a vascularização (Druecke, Langer *et al.*, 2004). No entanto, não é apenas o tamanho dos poros que é importante, a interconectividade desses é essencial para a migração dos vasos. Mesmo com tamanhos de poros ideais, se não houver interconectividade entre eles, a vascularização não será eficiente (Yang, Leong *et al.*, 2001).

Embora o tamanho dos poros e a interconectividade auxiliem na vascularização, ainda assim, levar-se-iam dias a semanas para que o interior do implante fosse vascularizado. Nesse contexto, outra abordagem está relacionada à liberação de fatores angiogênicos. É bem conhecido que a adição de fatores angiogênicos em constructos na engenharia de tecidos pode aumentar a vascularização após o implante. Diversas estratégias para a entrega de fatores angiogênicos têm sido desenvolvidas e, incluem a adição de proteínas e genes recombinantes aos biomateriais e a utilização de células geneticamente modificadas para expressarem os fatores de interesse (Zisch, Lutolf *et al.*, 2003).

Fatores angiogênicos podem ser utilizados para estimular diferentes estágios de formação de vasos sanguíneos, como por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), os quais estimulam o recrutamento de células progenitoras e endoteliais e, portanto, aceleram o início da angiogênese. Embora a presença desses fatores resulte no aumento da angiogênese, muitas vezes os vasos formados são desorganizados, possuem rupturas e são hemorrágicos (Levenberg, 2005). Além disso, a quantidade do fator administrado deve ser controlada, pois foi demonstrado que altos níveis de VEGF podem causar extravasamento vascular com formação de edemas e hipotensão (Horowitz, Rivard *et al.*, 1997; Vajanto, Rissanen *et al.*, 2002; Santos e Reis, 2009).

É importante que os vasos recém formados sejam estáveis. Exceto para pequenos capilares, a maturação e a estabilidade dos novos vasos envolvem a migração de células musculares lisas e periócitos e a produção de lâmina basal. Fatores de crescimento que são importantes nessa etapa incluem o fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e angiopoietina 1 (ANG1). Dessa forma, a utilização conjunta de fatores que estimulem a formação e a maturação de novos vasos pode ser necessária para melhorar a vascularização de constructos para engenharia de tecidos (Rouwkema, Rivron *et al.*, 2008). De fato, foi demonstrado que a associação de VEGF e PDGF em matrizes de poli(láctico-co-glicólico) PLG resultou na formação de maior número de vasos maduros, em modelo de camundongos com isquemia do membro posterior (Chen, Silva *et al.*, 2007).

A utilização da liberação de fatores angiogênicos é bastante promissora, no entanto, os principais obstáculos dessa terapia consistem em encontrar o número mínimo de moléculas necessárias e uma forma de liberação ótima que favoreça o desenvolvimento de novos vasos (Jain, Au *et al.*, 2005; Jain, Jain *et al.*, 2005; Santos e Reis, 2009).

Outra estratégia consiste na pré-vascularização *in vivo*. Este método envolve duas fases distintas. Na primeira fase, o constructo é implantado em um local de rica vascularização, como o músculo, ou envolvido por uma artéria. Dessa forma, em algumas semanas, uma rede de capilares é formada. Após esta etapa inicial, o constructo é retirado com a rede de capilares e, em seguida, reimplantado no local do defeito. A rede de capilares é então conectada a vascularização local através de micro cirurgia vascular. A vantagem desta técnica é que após a implantação no local final, o constructo torna-se imediatamente vascularizado devido à anastomose cirúrgica (Kneser, Schaefer *et al.*, 2006). Contudo, suas desvantagens consistem na necessidade de duas cirurgias separadas e na remoção de um eixo vascular no local da implantação inicial. Além disso, as células deverão ser semeadas nas matrizes antes do construto ser implantado no local do defeito, pois limitações de nutrientes ainda ocorrem durante o período de vascularização no sítio de implantação inicial (Rouwkema, Rivron *et al.*, 2008).

Recentemente, uma estratégia que ganhou interesse dos pesquisadores foi a pré-vascularização *in vitro*. Essa estratégia é baseada na observação de que células endoteliais são capazes de formar estruturas vasculares *in vitro* quando cultivadas em condições adequadas. Dessa forma, células endoteliais são incluídas no tecido que está sendo formado *in vitro* resultando na formação de uma rede vascular. Após

a implantação, essa rede pode se conectar espontaneamente com a rede vascular adjacente ao implante. O interior do constructo já estará com uma rede de capilares estabelecida e os vasos adjacentes só precisarão penetrar na região mais externa do constructo, reduzindo assim, o tempo necessário para a vascularização completa (Rouwkema, Rivron *et al.*, 2008).

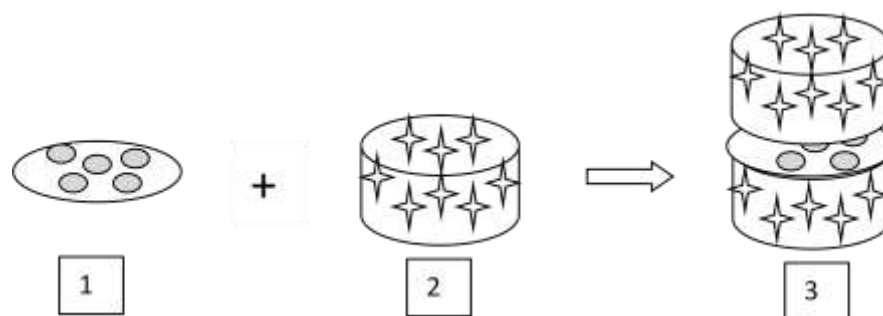
De um modo geral, a pré-vascularização *in vitro* combina células endoteliais com outros tipos de células para a formação de um tecido precursor juntamente com uma rede vascular.

Um aspecto crucial dessa técnica é a origem das células endoteliais que serão utilizadas para a formação da rede de capilares. Células endoteliais podem ser isoladas de vários tecidos como pele, cordão umbilical e veia safena. No entanto, a baixa disponibilidade e capacidade proliferativa são os principais inconvenientes para utilização dessas células. Além disso, essas células apresentam-se em estado senescente o que diminui o potencial de formação de novos vasos para fins terapêuticos (Levenberg, 2005; Santos e Reis, 2009). Sendo assim, células progenitoras e células-tronco se apresentam como fontes de células mais atraentes para a pré-vascularização *in vitro*.

É importante desenvolver condições de cultura que são adequadas tanto para a organização da rede vascular, como para o desenvolvimento do tecido que está sendo projetado. Dessa maneira, a utilização de fatores de crescimento angiogênicos deve ser controlada para não influenciar negativamente na formação do tecido de interesse. Na engenharia de tecido ósseo, por exemplo, o uso de VEGF pode resultar na diferenciação endotelial de células-tronco no lugar da diferenciação osteogênica (Oswald, Boxberger *et al.*, 2004; Rouwkema, Rivron *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o nosso grupo de pesquisa pretende criar uma nova abordagem para tentar solucionar o problema da falta de vascularização na engenharia de tecido, em especial para o reparo de tecido ósseo. Essa abordagem implica na utilização de uma única fonte de células autólogas, as hASC cultivadas em dois tipos de matrizes processados a partir do mesmo biomaterial, o PHB e o PHB-HV. Dessa forma, a diferenciação endotelial e osteogênica seriam induzidas separadamente evitando que um tipo de diferenciação se sobressaia em relação ao outro. Sendo assim, o implante consistirá de duas matrizes contendo células

endoteliais e osteoblastos e espera-se que a combinação dessas células auxilie na formação mais rápida da rede vascular e do tecido ósseo (figura 5).



- 1 – Membrana de nanofibras contendo células-tronco diferenciadas em células endoteliais
- 2 – Matriz tridimensional contendo células-tronco diferenciadas em osteoblastos
- 3 – Constructo com as duas matrizes e respectivas células

**Figura 5:** Esquema do implante proposto pelo grupo.

## *2. Objetivos*

---



## 2.1 Objetivo Geral

Estabelecer o cultivo de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo e promover a diferenciação em células endoteliais com o auxílio de membranas derivadas do polihidroxibutirato e do seu co-polímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o cultivo primário de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hASC);
- Caracterizar fenotipicamente as hASC obtidas;
- Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* das membranas de PHB/PHB-HV utilizando as hASC;
- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* da membrana de PHB/PHB-HV através de implantes subcutâneos em ratos;
- Promover a diferenciação das hASC em células endoteliais na presença da membrana de PHB/PHB-HV;

### *3. Materiais e Métodos*

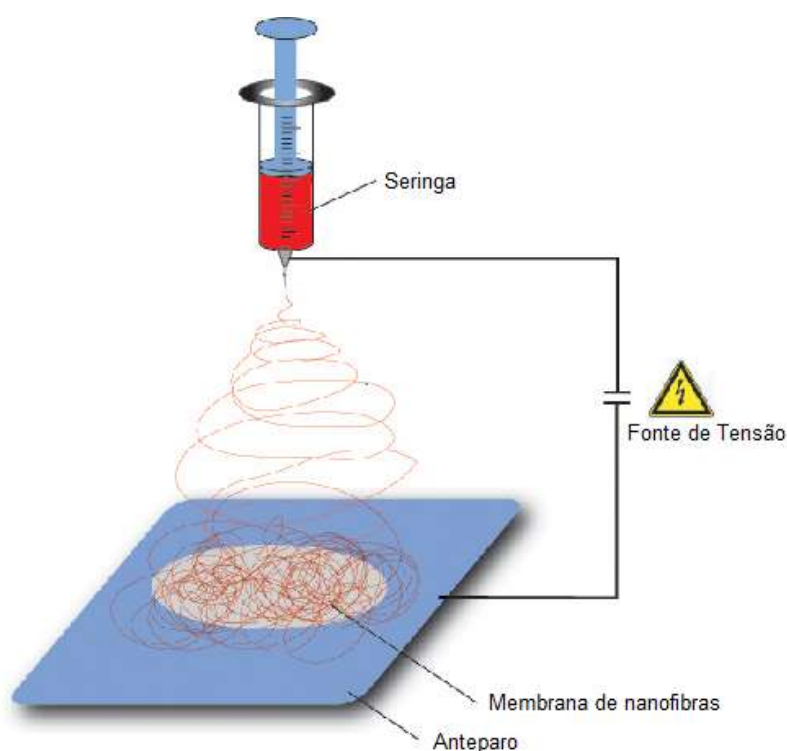
---

### 3.1. Confeção da membrana de nanofibras através da técnica de *electrospinning*

A membrana de nanofibras desenvolvida foi baseada no polímero PHB e seu co-polímero PHB-HV obtidos a partir da fermentação da cana-de-açúcar por bactérias do gênero *Alcaligenes*. Esses polímeros biodegradáveis foram produzidos e fornecidos pela PHB Industrial S.A. (PHBISA), Usina da Pedra, Serrana-SP, Brasil.

As membranas foram confeccionadas pelo Grupo “3B’s Research Group in Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics”- Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecido e Medicina Regenerativa em Portugal.

Para a confecção de uma membrana de nanopartículas foi utilizada a técnica de *electrospinning*. Nessa técnica, uma solução polimérica é submetida a um campo elétrico de alta tensão. Para isso, são necessários: um equipamento que consiste em uma fonte de alta tensão, uma bomba de seringa e um anteparo metálico, como representado na Figura 6 (Martins, Araujo *et al.*, 2007; Araujo, Martins *et al.*, 2008).



**Figura 6:** Representação do equipamento necessário para a técnica de *electrospinning*.

Para o preparo da solução polimérica, um volume de PHB (30%) e PHB-HV (70%) foi dissolvido em dimetilformamida (5%). A dimetilformamida foi removida a 35 °C sob vácuo – *overnight* – para obtenção de uma suspensão proporcional. Essa solução foi centrifugada a 1000rpm por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e as partículas com tamanhos aproximados de 200 a 350 nm foram suspensas a 5% em água destilada. O processo de centrifugação e lavagem das partículas foi repetido 3 vezes.

A solução polimérica obtida foi colocada em uma seringa de 5 ml adaptada a um dispositivo denominado *Syringe Pump* (KDS100, KD Scientific) para o controle do fluxo.

Um eletrodo positivo foi colocado em contato com a seringa. Em seguida foi aplicada uma força de voltagem para gerar o campo elétrico e uma folha de papel alumínio foi utilizada como coletor. Os parâmetros utilizados nessa etapa estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Parâmetros utilizados para o *Electrospinning*

Tensão de Trabalho (kV)	9
Diâmetro interno da agulha (mm)	0,8
Distância entre a agulha e o anteparo (cm)	15
Fluxo de material (mL/h)	1

As condições para o procedimento de confecção por *electrospinning* foram otimizadas para obtenção de um processo contínuo e uma morfologia reprodutível das fibras.

### 3.1.1 Esterilização dos biomateriais

Todas as membranas produzidas foram esterilizadas por irradiação, a 15 KGy, por 30 minutos. A irradiação foi feita no CDTN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - UFMG).

## **3.2 Estudos básicos em cultura de células-tronco**

### **3.2.1. Meio de cultura basal**

D-MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio (Merck), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/mL e 0,25µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco).

O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22µm (Millipore).

### **3.2.2. Meio de cultura para diferenciação endotelial**

D-MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de Sódio (Merck), 2% de soro fetal bovino (Gibco), 50ng/mL de VEGF (Invitrogen), 10ng/mL de bFGF (Invitrogen), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/mL e 0,25µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco) (Cao, Sun *et al.*, 2005).

O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22µm (Millipore).

### **3.2.3 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano**

As células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) foram obtidas do produto de lipoaspiração de pacientes submetidos à cirurgia de lipoaspiração na Clínica de Cirurgia Plástica coordenada pelo Dr. Luiz Lamana dos Santos em Belo Horizonte, Minas Gerais. O fornecimento do produto de lipoaspiração estava de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer: ETIC 344/07).

O isolamento e o cultivo das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo foram realizados conforme descrito por Zuk *et al.*, 2001.

O produto de lipoaspiração de diferentes partes do corpo (flancos esquerdo e direito, regiões supra e infra umbilical) foi acondicionado em quatro seringas de 20 mL estéreis e encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular - UFMG.

Em capela de fluxo laminar, esse conteúdo foi transferido para tubos de polietileno de 50 mL para lavagem com PBS (tampão fosfato de sódio 0,15M pH 7,2) e posterior centrifugação por 10 minutos a 1400rpm e 10° C. Após a centrifugação formou-se uma solução bifásica, cuja fase inferior continha hemácias enquanto a fase superior, o tecido adiposo. A fração adipocitária foi aspirada, transferida para um novo tubo de polietileno de 50 mL e tratada com colagenase D (0,15% em PBS) na proporção de 1:1 por 2 horas, em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. No decorrer deste período, a cada 15 minutos, os tubos foram vigorosamente agitados. Após as duas horas, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1400rpm e 10° C, para separar a fração adipocitária e a fração estromal vascular do tecido adiposo. A fração superior adipocitária foi desprezada e a fração estromal vascular foi suspensa em meio de cultura basal, distribuída em frascos de cultura T-25 e mantida em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após dois dias, o conteúdo dos frascos T-25 foi transferido para tubos de polietileno e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O precipitado formado foi novamente suspenso em meio basal e acondicionado em novos frascos de cultura, enquanto que o sobrenadante foi descartado.

A cada dois dias o meio de cultura foi trocado e as células foram lavadas com PBS, para a remoção das células não aderentes. Quando as células atingiram a confluência, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e tratadas com 1,5 mL de 0,05% tripsina-EDTA (Gibco) por 10 minutos. A ação da tripsina foi inativada com 8mL de meio basal e essa suspensão foi dividida em dois novos frascos de cultura. As células foram utilizadas para a realização dos experimentos a partir da 4ª passagem.

### **3.2.3.1 Caracterização das células-tronco de tecido adiposo humano por citometria de fluxo**

As hASC foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise da presença das moléculas de superfície celular CD29, CD44 e CD73, que são marcadores expressos em células-tronco mesenquimais. Para verificar a existência de contaminações da cultura de células-tronco mesenquimais com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34 e CD45, que são marcadores expressos em células-tronco hematopoiéticas. As células foram também caracterizadas em relação à expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II, HLA-ABC e HLA-DR, respectivamente (Aust, Devlin *et al.*, 2004).

### **3.2.3.2. Marcação celular com anticorpos primário e secundário**

As hASC na densidade de  $5 \times 10^5$  células foram incubadas com 0.4µg de anticorpos primários, Tabela 3, em uma placa de 96 poços (placa fundo em U) por 30 minutos a 4°C.. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 0.4µg do anticorpo secundário policlonal de cabra anti IgG de camundongo conjugado com FITC (fluoresceína isotiocianato) (Calbiochen) por 30 minutos a 4°C. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. As células foram novamente lavadas com PBS e depois fixadas em formaldeído 2%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer a população a ser analisada.

**Tabela 3:** Anticorpos primários utilizados para Citometria de Fluxo.

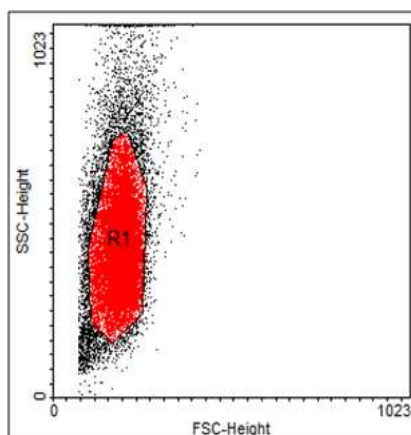
<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
<b>CD29</b>	monoclonal	Camundongo	-	Santa Cruz	1:25
<b>CD34</b>	monoclonal	Camundongo	-	Abcam	1:16
<b>CD44</b>	monoclonal	Camundongo	-	Santa Cruz	1;16
<b>CD45</b>	monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:25
<b>CD73</b>	monoclonal	Camundongo	PE	BD Biosciences	1:10
<b>HLA-ABC</b>	monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10
<b>HLA-DR</b>	monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10

### **3.2.3.3 Leitura no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA)**

A obtenção dos dados foi realizada utilizando-se o programa CELLQuest. Foram adquiridos 20.000 eventos e os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8.

Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada a partir do gráfico de tamanho versus granulosidade, gerado pela análise das células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação (Fig.7). Posteriormente, um gráfico de histograma foi criado para delimitar a região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. A partir da definição destes parâmetros foram realizadas as análises das células marcadas com os anticorpos primários e secundários (Zuk, Zhu *et al.*, 2001).





**Figura 7:** Gráfico de tamanho versus granulosidade, R1 é a população escolhida para análise dos marcadores.

### 3.3 Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* da membrana de nanofibras de PHB/PHBV colonizadas com hASC

Para avaliar o efeito da membrana de PHB/PHB-HV sobre as hASC foram realizados ensaios de adesão, morfologia, proliferação, viabilidade e secreção celular.

#### 3.3.1 Colonização *in vitro* da membrana de nanofibras por células hASC

As membranas de PHB/PHB-HV foram distribuídas em placas de 24 poços, sendo colocada uma membrana por poço. Em seguida,  $1 \times 10^5$  células foram semeadas sobre a membrana. A placa foi incubada por 1 hora em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e  $5\%\text{CO}_2$ , para que ocorresse a adesão celular na membrana. Após a incubação, acrescentou-se a cada poço, 1mL de meio de cultura basal (Araujo, Martins *et al.*, 2008).

#### 3.3.2 Análise da adesão e morfologia celular através de imunofluorescência

Para verificar a adesão e morfologia das hASC à membrana de PHB/PHB-HV foi realizado o ensaio de imunofluorescência utilizando-se a sonda Faloidina

(Mollecular Probes) que se liga aos filamentos de actina e a sonda Hoechst (Mollecular Probes) que se liga ao núcleo.

Após a colonização da membrana por células h-ASC, essas foram mantidas em cultivo com meio de cultura basal por 3 dias. As células sobre a membrana foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Logo após, foram realizadas três lavagens com PBS e foi feita a permeabilização da membrana celular, utilizando-se 0,1% PBS/Triton-100X, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min). As células sobre a membrana foram incubadas com as sondas Faloidina, 0,2 µg/mL, e Hoechst, 0,2 µg/mL, por 30 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS (3 vezes/10min). As membranas foram colocadas em lâmina e a montagem foi feita com *Hydromount* e lamínulas.

As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas através do Microscópio Confocal (Zeiss LSM 510 Meta) do CEMEL (Cento de Microscopia Eletrônica) do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510©*.

### **3.3.3 Análise morfológica da membrana de nanofibras e das células aderidas através de MEV e EDS**

Para a análise micro estrutural da membrana e das células aderidas à sua superfície foram utilizadas a microscopia eletrônica de varredura, MEV, e espectroscopia de energia dispersiva por Raios-X através da sonda EDS.

Após colonização das células na membrana, em placas de 24 poços, esta foi mantida em cultivo com meio de cultura basal por 7 dias em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida foi feito o preparo das amostras para análise por MEV e EDS.

A primeira etapa do processamento consiste no processo de fixação das células. Cada poço contendo a membrana teve o meio de cultura removido e foi delicadamente lavado três vezes com PBS à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5 % em tampão Cacodilato de sódio 0,1M por um período de 2 horas à temperatura ambiente. O volume adicionado a

cada poço foi o suficiente para cobrir completamente as amostras. Após este período, os poços foram lavados com tampão Cacodilato de Sódio 0,1M duas vezes. Em seguida, foi adicionado Tetróxido de Ósmio a 1% por 2 horas à 4°C, sempre protegidos da luz. Ao término deste período, os poços foram lavados 5 vezes com água destilada.

Terminado o processo de fixação iniciou-se o processo de desidratação através de imersão em álcool etílico em diferentes concentrações (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) por 15 minutos cada, e álcool absoluto por 1 hora.

Finalizada a desidratação, os espécimes permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>. A secagem em ponto crítico é o processo pelo qual o álcool é substituído pelo CO<sub>2</sub>, evitando dano à célula causado pela tensão superficial durante o processo da evaporação natural. O material foi seco no aparelho de ponto crítico de Balzers, modelo CPD-020 do CEMEL. As amostras foram montadas em suporte de alumínio padrão e submetidas ao processo de metalização em ouro. A metalização e a obtenção das imagens foram realizadas no serviço de microscopia eletrônica do Departamento de Metalurgia, DEMET, da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

As micrografias foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura/ JEOL/JSM- 6360LV, do DEMET-UFMG. A Voltagem utilizada foi de 15KV. A microanálise química foi obtida através de espectroscopia de energia EDS. Este método foi selecionado com o objetivo de caracterizar as amostras e confirmar a presença celular. As informações qualitativas e semi quantitativas sobre os elementos presentes são obtidas através da captação de raios-X característicos resultantes da interação do feixe primário de elétrons com a amostra. O equipamento utilizado foi o Espectrômetro de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)/ Thermo Noram/ Quest (Machado, Ventura *et al.*, 2007; Mccullen, Stevens *et al.*, 2007).

### **3.3.4 Viabilidade e proliferação celular – MTT**

O ensaio de MTT (Mosmann, 1983) é um método colorimétrico sensível que mensura a viabilidade e proliferação celular. Este ensaio baseia-se na capacidade

de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide (MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade ótica pode ser determinada pelo espectrofotômetro a 595 nm.

As hASC foram semeadas em placas de 24 poços (NUNC) na densidade de  $1 \times 10^5$  células/ mL/ poços em dois grupos: 1- células cultivadas na placa de cultura e 2- células cultivadas na membrana de PHB/PHB-HV.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 3, 5 e 10 dias. Após cada período, o meio de cultura foi retirado e 210µL de meio de cultura basal foram adicionados. Em seguida, foram acrescentados 170 µL da solução de MTT (Sigma), 5 mg/mL, e a placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub> . Após este período, as células foram observadas em microscópio óptico, para a visualização dos cristais de formazan. Os cristais de formazan foram solubilizados através da adição a cada poço de 210µL de SDS10%-HCl e incubação em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 18 horas. Após esse período, retirou-se 100µL de cada poço e a leitura dos valores de absorbância da solução resultante foi realizada no espectrofotômetro a 595 nm. As leituras foram feitas em triplicatas.

Como controle da interferência da membrana no processo de colorimetria do MTT, as membranas foram incubadas em meio de cultura basal, sem células, pelos mesmos períodos de 3, 5 e 10 dias e todos os processos repetidos nas mesmas condições experimentais.

Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade com o objetivo de proteger a sua reatividade.

Os resultados obtidos foram plotados em uma representação gráfica, utilizando-se o programa GraphPad Prism© 5.

### 3.3.5 Produção da Fosfatase Alcalina

A produção de fosfatase alcalina foi avaliada através do ensaio de BCIP-NBT (Gibco). Este ensaio é baseado na reação cromogênica iniciada pela clivagem do grupamento fosfato presente no BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina) pela fosfatase alcalina presente nas células. A reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico) e forma um precipitado insolúvel de cor púrpura (Valerio, Pereira *et al.*, 2004).

As hASC foram semeadas em placas de 24 poços (NUNC) na densidade de  $1 \times 10^5$  células/ mL/ poços em dois grupos: 1- células cultivadas na placa de cultura e 2- células cultivadas na membrana de PHB/PHB-HV. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 3, 5 e 10 dias.

Após cada período, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas por 2 horas, com 200µL da solução BCIP-NBT, preparada de acordo com as instruções do fabricante (Gibco). Em seguida observou-se a formação dos precipitados púrpura através do microscópio óptico. Foram adicionados 210µL de SDS 10%-HCl para a solubilização dos precipitados púrpura. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 18 horas. Após a solubilização, 100µL de cada poço foram colocados em uma placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi medida no espectrofotômetro a 595 nm. As leituras foram feitas em triplicatas.

Da mesma forma como no ensaio de MTT, como controle da interferência da membrana no processo de colorimetria do NBT/BCIP, os membranas foram incubadas em meio de cultura basal, sem células, pelos mesmos períodos de 3, 5 e 10 dias e todos os processos repetidos nas mesmas condições experimentais.

Durante o experimento todos os passos envolvendo os reagentes foram executados em condições de mínima luminosidade com o objetivo de proteger a sua reatividade.

Os resultados obtidos foram plotados em uma representação gráfica, utilizando-se o programa GraphPad Prism© 5.

### 3.4. Avaliação da Biocompatibilidade *in vivo* da Membrana de Nanofibras

Para a avaliação da biocompatibilidade da membrana de nanofibras *in vivo*, foram feitos implantes subcutâneos em *rattus novegicus albinus* da linhagem Wistar fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG. Este trabalho seguiu os princípios que regem o Código de Ética Experimental e as Leis de Proteção aos Animais, Protocolo 242/08.

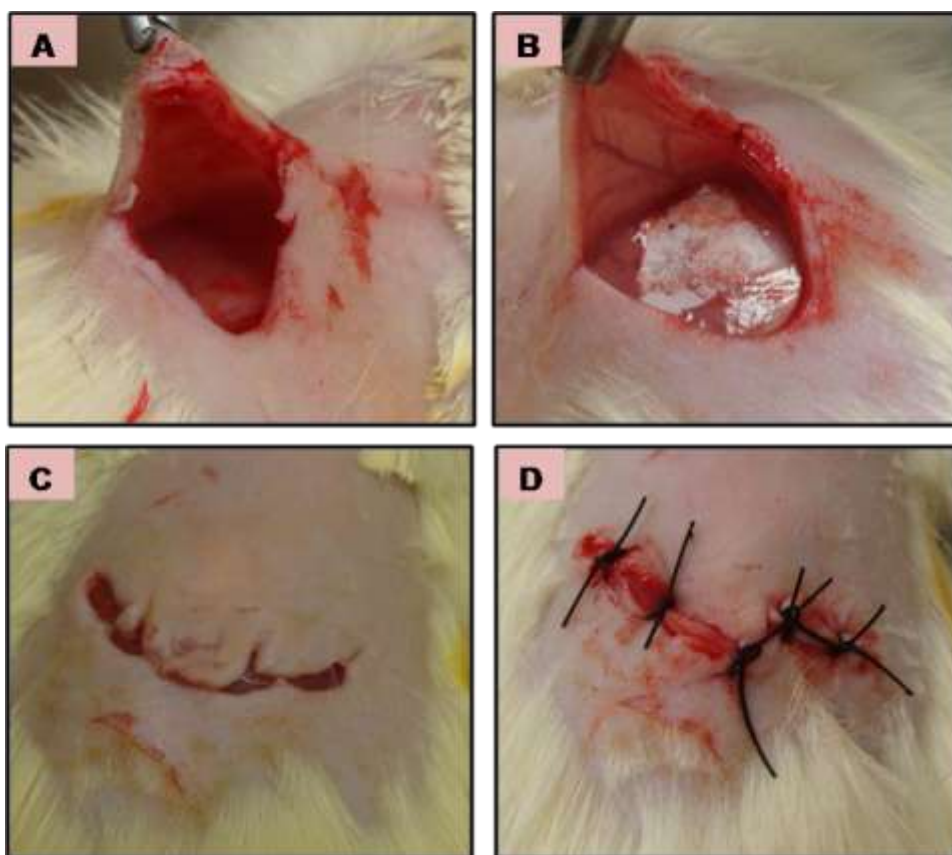
Para a realização do estudo foram utilizados 6 ratos Wistar, fêmeas, com idade variando entre 60 e 75 dias, pesando em média 250 gramas na data do experimento inicial.

Os animais foram mantidos antes e durante o experimento, no biotério, dentro de gaiolas individuais de policarbonato autoclaváveis, de 30 a 50 cm de tamanho, com maravalha autoclavada (121°C/30min), recebendo alimentação sólida balanceada (20 grs/ dia) e água filtrada.

Os animais foram submetidos a implante subcutâneo da membrana de PHB/PHB-HV.

#### 3.4.1 Procedimento Cirúrgico

Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com solução de Ketamina (Francootar) para anestesia e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) para relaxamento muscular e potencializador anestésico na proporção 1:1 e na dose 0,10 ml/100 gramas de massa corporal, via intramuscular. Foi realizada a tricotomia da região e assepsia com PVPI (solução de iodo a 10%). Posicionado em decúbito ventral e com o auxílio de bisturi, uma incisão longitudinal mediana na pele que recobre o dorso do animal experimental foi realizada. Foi feito o implante subcutâneo com a membrana de PHB/PHB-HV. A pele foi repostada e suturada com fio de sutura de algodão 4.0. O procedimento cirúrgico está ilustrado na Figura 8.



**Figura 8:** Representação do procedimento cirúrgico para implantes subcutâneos. (A) Tricotomia com incisão longitudinal mediana. (B) Implante da membrana de PHB/PHBHV. (C) Reposição da pele. (D) Sutura da incisão.

### 3.4.2 Avaliação dos implantes *in vivo*

Após 4 e 8 semanas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e as regiões do implante foram removidas e fotografadas para documentar macroscopicamente a presença de sinais de rejeição ao implante e o comportamento da membrana quanto a sua integração ao tecido local. O implante extraído foi fixado em formaldeído 10% e incluído em parafina para análises histológicas, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Foram feitos cortes longitudinais de 5 a 7µm de espessura e corados por Hematoxilina e Eosina (Janune, 2006).

### **3.5 Diferenciação endotelial**

Para promover a diferenciação endotelial, as hASC foram cultivadas com o meio de diferenciação endotelial por 7 e 14 dias e mantidas em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada dois dias. A indução da diferenciação foi realizada nas células cultivadas em placa de cultura e sobre a membrana de PHB/PHB-HV. Após 7 e 14 dias, ensaios foram feitos para comprovar a diferenciação.

#### **3.5.1 Avaliação da proliferação celular durante a diferenciação endotelial**

Para avaliar a proliferação celular durante a diferenciação endotelial foi realizado o ensaio de MTT. Para isso, as células foram cultivadas em placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV e induzidas à diferenciação endotelial por 7 e 14 dias. Como controle, células também foram cultivadas na placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV com meio de cultura basal.

O ensaio de MTT foi realizado conforme descrito no item 3.3.4. A densidade óptica obtida das células cultivadas em meio de cultura basal foi considerada 100%. Os dados obtidos foram plotados na forma de gráficos de barra utilizando-se o programa GraphPad Prism© 5 (Mosmann, 1983).

#### **3.5.2 Avaliação da produção da fosfatase alcalina durante a diferenciação endotelial**

Para avaliar a produção da fosfatase alcalina durante a diferenciação endotelial foi realizado o ensaio de BCIP/NBT nas células cultivadas em placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV e induzidas à diferenciação por 7 e 14 dias. Assim como no ensaio de proliferação celular, células cultivadas na placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV com meio de cultura basal foram utilizadas como controle.

O ensaio de BCIP/NBT foi realizado conforme descrito no item 3.3.5. A densidade óptica obtida das células cultivadas em meio de cultura basal foi considerada 100%.



Os dados obtidos foram plotados na forma de gráficos de barra utilizando o programa GraphPad Prism© 5 (Valerio, Pereira *et al.*, 2004).

### 3.5.3 Avaliação da presença de marcadores de células endoteliais através de imunofluorescência

A comprovação da diferenciação endotelial se fez através da detecção da expressão de moléculas específicas de células endoteliais, utilizando-se da técnica de imunofluorescência. Para a realização dessa técnica, são utilizados anticorpos contra moléculas específicas de interesse. Para a detecção desse anticorpo, normalmente é utilizado um segundo anticorpo conjugado a um fluorocromo ou apenas o anticorpo primário já conjugado.

As células hASC foram cultivadas sobre lamínula em placa de 6 poços. Após a indução dessas células à diferenciação endotelial, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e foi feita a permeabilização da membrana plasmática utilizando-se 0,1% PBS/Triton-100X, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min) e foi feito o bloqueio da reação com 1% PBS/BSA e 5% soro fetal de cabra, por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas, *overnight*, com anticorpo primário diluído em PBS/BSA 1%, tabela 4.

Após incubação com anticorpo primário, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min), e, em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário monoclonal de cabra, contra IgG de camundongo, Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) diluído em 1% PBS/BSA, 1:500, por 1 hora em câmara úmida, protegido da luminosidade e em temperatura ambiente. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. Controles negativos foram feitos utilizando-se apenas o anticorpo secundário.

Posteriormente, as células foram incubadas com a sonda Hoechst, 0,2 µg/mL, por 20 minutos ou com iodeto de propídio (PI), 0,5 µg/mL, por 5 minutos para marcação do núcleo. Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS (3 vezes/10min) e a montagem das lâminas com *Hydromount*.

As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas através do Microscópio Confocal (Zeiss LSM 510 Meta) do CEMEL do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510*© (Oswald, Boxberger *et al.*, 2004).

**Tabela 4:** Anticorpos primários utilizados para Imunofluorescência.

Antígeno	Tipo	Clone	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
vWF	Monoclonal	VW92-3	Camundongo	-	Abcam	1:200
VE-caderina	Policlonal	-	Coelho	FITC	Abcam	1:20

#### 3.5.4. Comprovação da Diferenciação Endotelial Através de PCR

As hASC foram cultivadas em meio de diferenciação endotelial por 7 e 14, após cada período foi realizada a extração do RNA, a fim de comprovar a expressão do gene que codifica o receptor 2 do VEGF. Em seguida, foi sintetizado o cDNA e realizada a PCR para verificar a amplificação do seguimento gênico referente ao VEGFR2. (Cao, Sun *et al.*, 2005).

##### 3.5.4.1 Extração de RNA

O RNA total foi isolado de  $1 \times 10^6$  células cultivadas em meio de cultura basal e meio de diferenciação endotelial por 7 e 14 dias, utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). Após incubação por 5 minutos com o Trizol, a solução formada foi centrifugada por 15 minutos a 4°C e 13000rpm. A fase superior foi coletada e o RNA foi precipitado com álcool isopropílico (Merck) por 10 minutos. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação a 4°C e 13000rpm por 10 minutos e lavagem com etanol 75% (Merck), seguida de centrifugação de 10 minutos a 4°C e 7500rpm. O RNA foi diluído em água destilada DNase e RNase free (Gibco). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm.

### 3.5.4.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando-se o RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Dois microgramas de cada amostra de RNA total foram incubados com 0,5 µg de oligo(dT)<sub>18</sub>, a 70°C por 5 minutos e, em seguida, as amostras foram incubadas no gelo. Logo após, foi adicionado às amostras, 5X reaction buffer, 20 unidades Ribolock™ Ribonuclease inhibitor, 10mM dNTP mix, e foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 unidades da enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (Fermentas) e as amostras foram incubadas por 60 minutos a 42°C. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70°C por 10 minutos.

O cDNA resultante foi utilizado nas reações de PCR descritas a seguir.

### 3.5.4.3. PCR

O cDNA sintetizado foi utilizado na reação de amplificação dos genes que codificam o receptor do VEGF. Como controle positivo da reação também foi amplificado o segmento gênico que codifica a gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima expressa constitutivamente por todas as células. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 5. As reações de amplificação foram realizadas com um aquecimento inicial de 94°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e 72°C por 10 minutos, utilizando-se o termociclador (PTC-100 MJ Research. Inc.). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para a sua visualização.

**Tabela 5:** Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR

	Fita Senso	Fita antisenso	pb
<b>VEGFR</b>	5' GGAATACCCCTTGAGTCC 3'	5' CCTCCAACCTGCCAATACC 3'	289
<b>GAPDH</b>	5' TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC 3'	5'ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAGC 3'	226

### **3.6 Análise estatística**

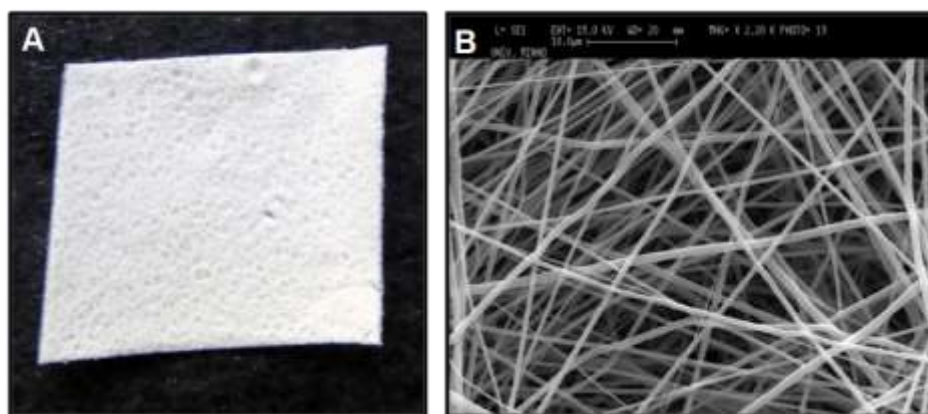
Os ensaios de MTT e produção da fosfatase alcalina foram analisados através do software *Prism statistical software* (Graphpad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados utilizando-se *One way ANOVA* e Bonferroni, sendo considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ . Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  o desvio padrão.

## *4. Resultados*

---

#### 4.1 Avaliação das membranas de nanofibras através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A metodologia de *electrospinning* permitiu a obtenção de membranas de nanofibras à base de PHB/PHB-HV. Essas membranas foram avaliadas através de MEV e observou-se que estas apresentavam 100 $\mu$ m de espessura e fibras com diâmetro de 300nm a 1,3  $\mu$ m, (Figura 9). Através da análise de MEV, pode ser verificado que as nanofibras estão dispostas em várias camadas e em diferentes direções, formando um entremeado de fibras capazes de sustentar células de forma eficiente.



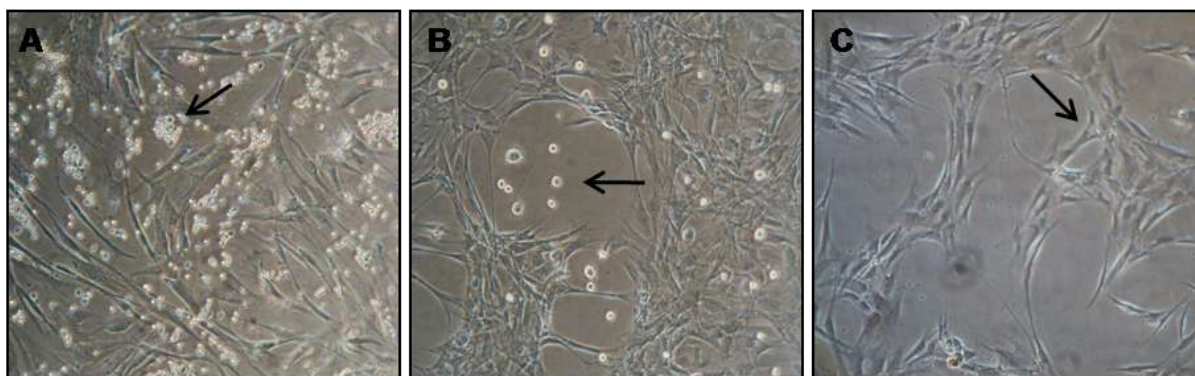
**Figura 9:** Avaliação estrutural da membrana de PHB/PHB-HV. (A) Avaliação macroscópica, (B) Imagem da microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.2 Extração e cultivo das hASC

As células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (h-ASC) foram extraídas conforme descrito na metodologia. Após a digestão com colagenase, a fração estromal foi colocada em cultivo com meio de cultura basal.

A observação das células extraídas se fez através da visualização com microscópio óptico (M.O). Na primeira passagem obteve-se uma população heterogênea, composta por células aderentes, com formato fusiforme e células não aderentes, com formato arredondado (Figura 10A). Ao longo do cultivo (Figura 10B), com a troca de meio, e a expansão da população celular, o número de células não aderentes diminuiu, predominando uma população de células aderentes ao plástico,

fusiformes, com potencial de auto-renovação e de formação de colônias. A partir da quarta passagem não foi mais observada a presença de células não aderentes (Figura 10C).

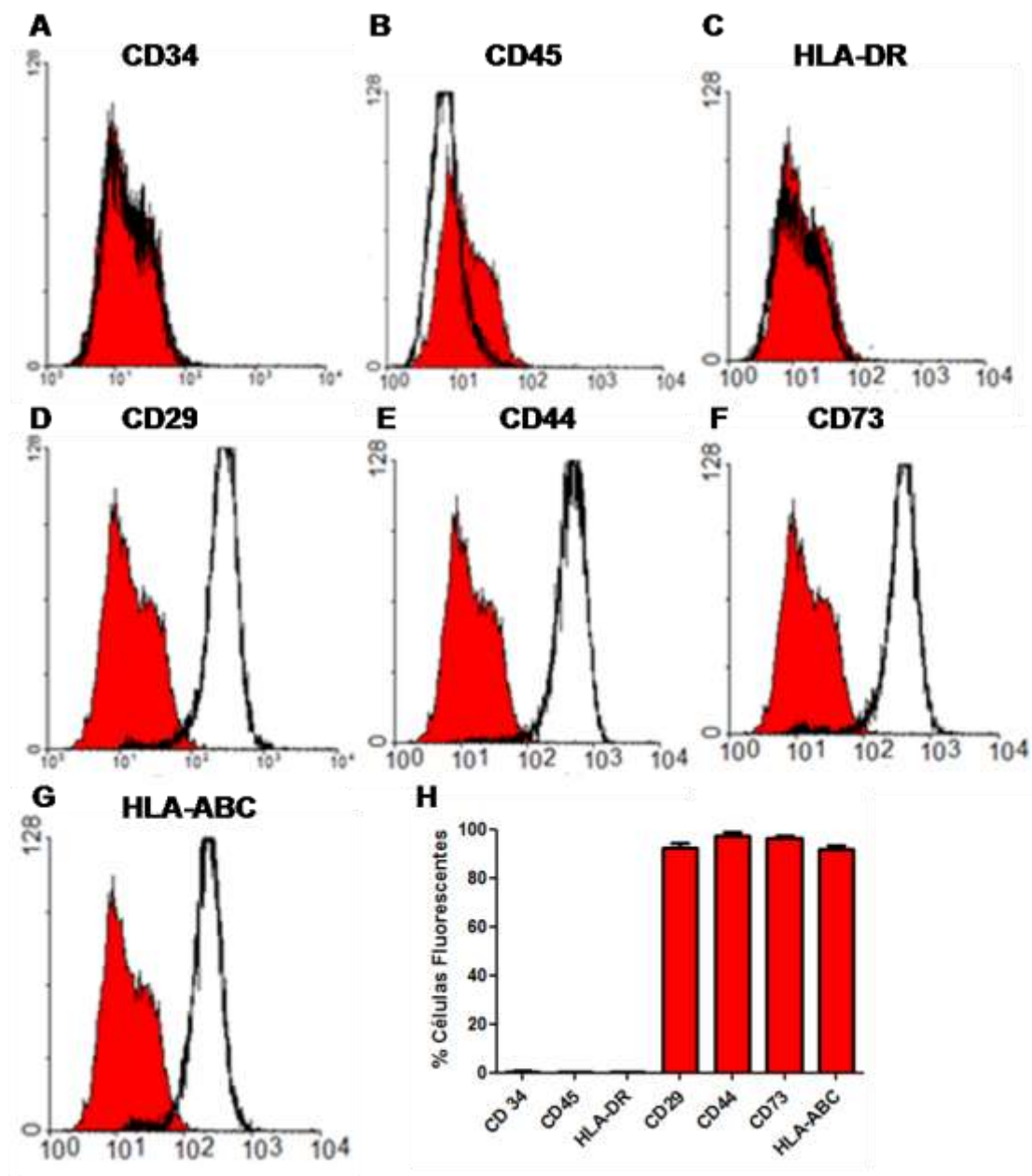


**Figura 20:** Aspectos morfológicos das células extraídas do tecido adiposo humano. (A) hASC na 1ª passagem, presença de uma população de células não aderentes (seta). Aumento: 100X. (B) hASC na 2ª passagem, presença de uma pequena população de células não aderentes (seta). Aumento: 100X. (C) hASC na 4ª passagem, ausência de células não aderentes, população homogênea de células aderentes, fusiformes e capazes de formar colônias (seta). Aumento: 150X.

### 4.3 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo

Uma população celular pode ser definida pelos tipos de antígenos expressos na membrana plasmática de suas células. Na 4ª passagem, foi feita a análise fenotípica das células obtidas a partir do processamento enzimático do tecido adiposo. As células foram incubadas com anticorpos específicos para os seguintes marcadores: CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, HLA-DR, HLA-ABC.

A população escolhida para a análise dos marcadores de superfície foi determinada a partir de um gráfico de tamanho versus granulosidade obtido de células sem nenhum tipo de marcação. A análise dos histogramas demonstrou que aproximadamente 92% das células expressam CD29, 97% expressam CD44, 96% expressam CD73 e 92% expressam HLA-ABC. Já o CD34, CD45 e HLA-DR foram expressos em menos de 1% das células (Figura 11A-H).



**FIGURA 11:** Análise fenotípica de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano através de citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de eventos versus intensidade de fluorescência. A curva vermelha é o controle negativo da fluorescência, a linha preta, apresenta a população de células avaliada para um marcador específico e o seu deslocamento para direita indica a existência da marcação. (A) Avaliação do marcador CD34; (B) CD45; (C) HLA-DR; (D) CD29; (E) CD44; (F) CD73; (G) HLA-ABC. (H) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população R1.

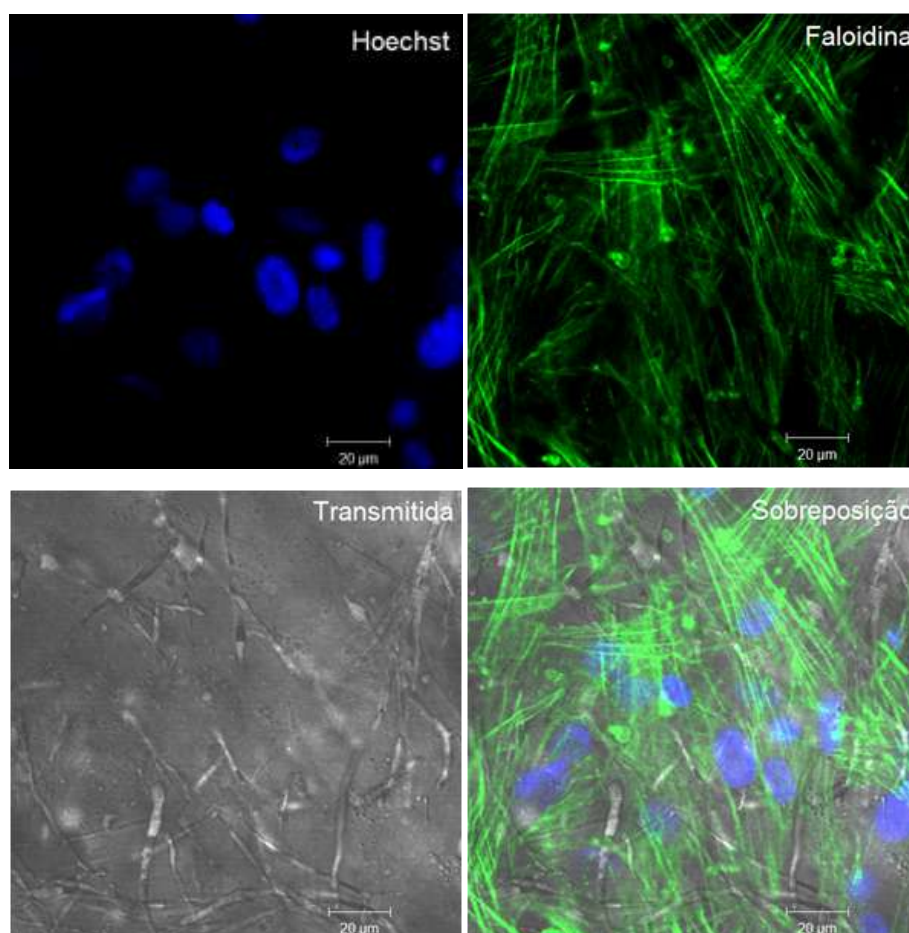


#### 4.4 Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* das membranas de nanofibras colonizadas com hASC

##### 4.4.1 Avaliação morfológica das hASC cultivadas na membrana de PHB/PHB-HV

Devido a impossibilidade da visualização da morfologia das hASC nas membranas de PHB/PHB-HV através de M.O, foi realizado um experimento de imunofluorescência. Foram utilizadas as sondas Hoechst e Faloidina para identificação do núcleo e filamentos de actina, respectivamente.

Através da microscopia confocal, foi possível observar que as células se encontravam na superfície da membrana e apresentavam morfologia fibroblastóide (Figura 12).

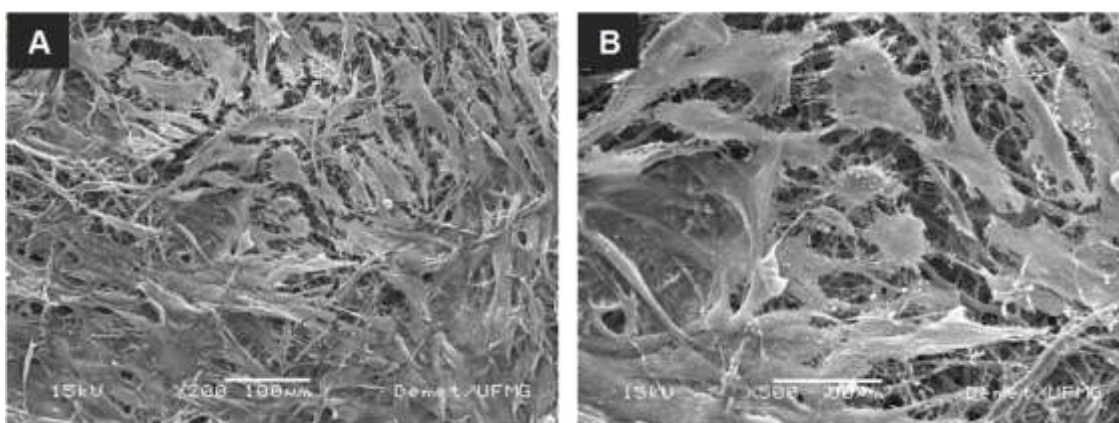


**Figura 12:** Microscopia Confocal das hASC aderidas na membrana de PHB/PHB-HV.

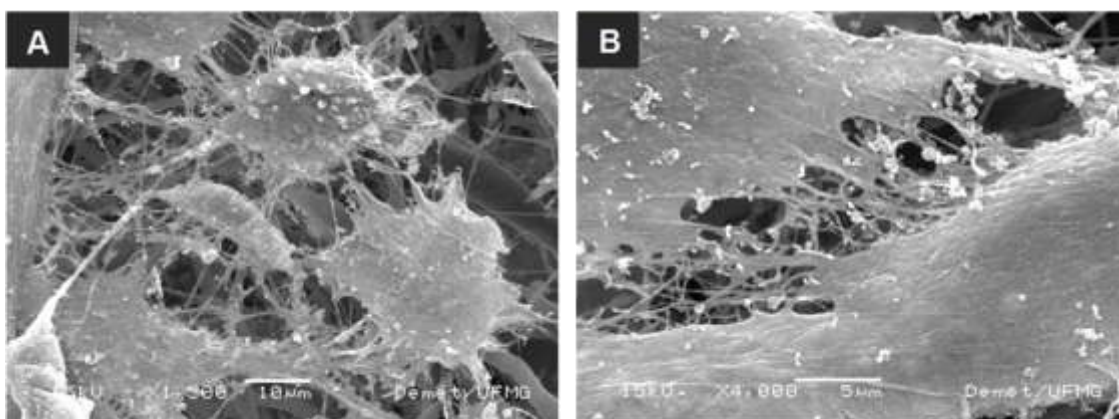
#### 4.4.2 Caracterização das hASC aderidas na membrana de PHB/PHB-HV – MEV e EDS

A fim de verificar se as células estavam realmente aderidas à membrana e fazendo conexões célula-célula, foi realizado a MEV.  $1 \times 10^5$  células foram semeadas na membrana e mantidas em cultivo por 7 dias. Após esse período, o material foi cuidadosamente processado para obtenção de imagens de MEV e análises de EDS.

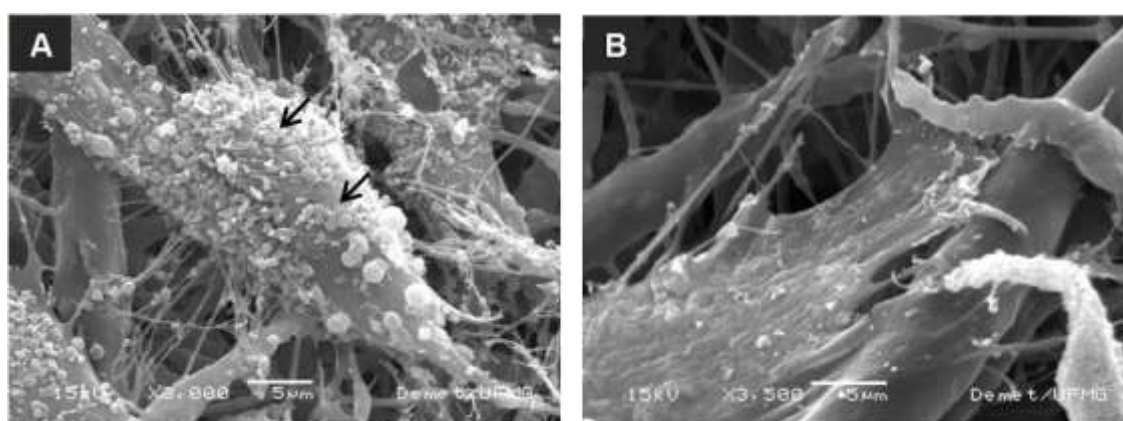
As imagens obtidas revelaram uma alta densidade celular. As células observadas apresentaram aspecto morfológico homogêneo (Figura 13). Em sua maioria se mostraram com formato achatado e com formação de filopódios periféricos, com diversos pontos de adesão a outras células (Figura 14) e às fibras da membrana (Figura 15). Em algumas micrografias foi possível observar a presença de pequenas vesículas na superfície da membrana celular, as quais indicam atividade de síntese e secreção protéica (Figura 15A).



**Figura 13:** Imagens da microscopia eletrônica de varredura das membranas de PHB/PHBHV colonizadas pelas hASC. (A) Visão panorâmica da superfície da membrana, demonstrando alta densidade celular, aspecto homogêneo da morfologia com predomínio de células achatadas. Aumento: 200X. (B) Aumento: 500X.

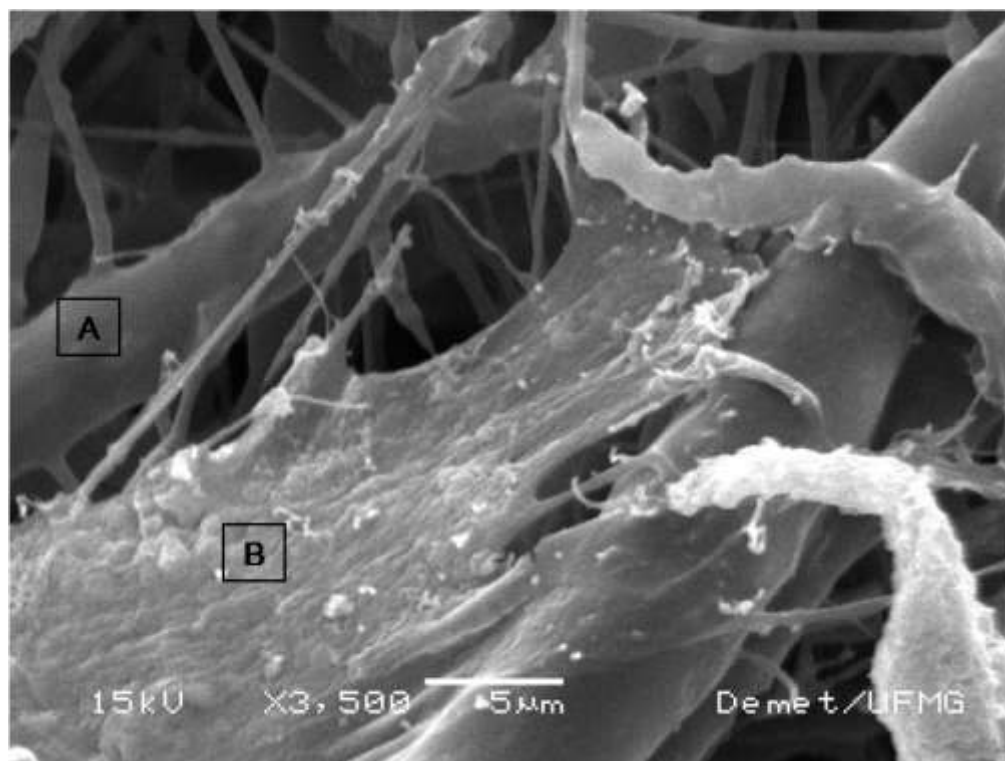


**Figura 14:** Imagens da microscopia eletrônica de varredura mostrando as células interconectadas através de prolongamentos citoplasmáticos. (A) Aumento: 1.500X. (B) Aumento 4.000X.



**Figura 15:** Imagens da microscopia eletrônica de varredura mostrando a adesão celular às fibras da membrana através de prolongamentos citoplasmáticos. (A) Nessa imagem é possível observar além dos prolongamentos os grânulos de secreção (setas). Aumento: 3.000X. (B) Aumento: 3.500X.

Um campo apresentando células e as fibras da membrana foi selecionado para aplicação da sonda EDS. Nesse campo foram marcadas duas áreas distintas. A primeira área determinada compreende apenas a fibra da membrana, uma região sem células. A outra área analisada estava completamente contida na superfície de uma célula (Figura 16).

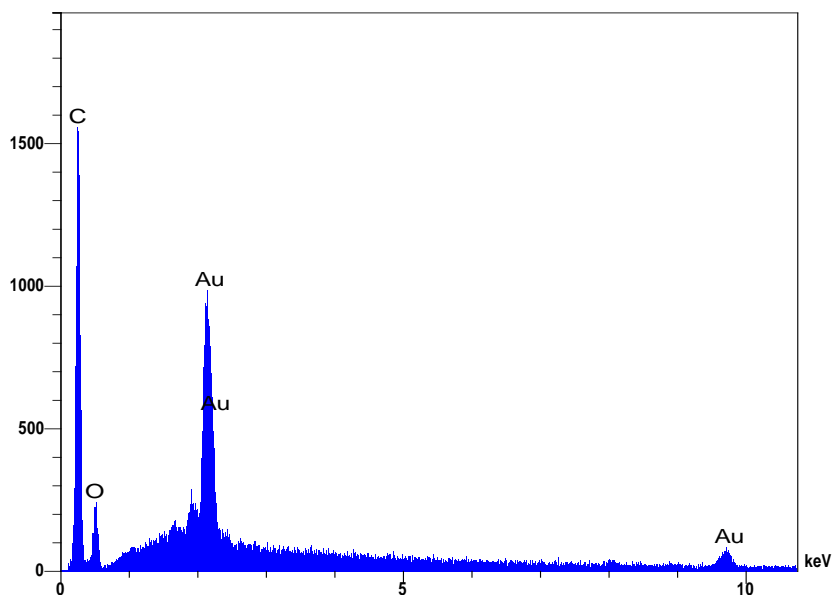


**Figura 16:** Campos selecionados para análise por EDS. Aumento: 3.500X. (A) Região selecionada para análise na fibra da membrana. (B) Região selecionada para análise na superfície celular.

Os resultados obtidos da análise na fibra da membrana mostraram que essa é composta apenas por carbono e oxigênio, elementos químicos do PHB e PHB-HV. Dessa forma, a membrana obtida não estava contaminada por nenhum outro elemento químico. O hidrogênio não é mostrado na análise, uma vez que a sonda utilizada não é capaz de identificá-lo (Figura 17).

Na análise executada somente sobre a superfície celular, os resultados mostraram a presença de carbono e oxigênio, assim como na fibra da membrana. No entanto, foi detectado o ósmio, o qual é utilizado para estabilizar a membrana celular e que permanece incrustado na sua parte lipídica durante o processamento da amostra. Dessa forma, pode-se considerar a área analisada como superfície celular (Figura 18).

O ouro e o cobre detectados nas análises se referem às etapas do processamento da amostra.



### SpectraPlus Report

**Company** ThermoNORAN  
**User** Quest  
**File** C- Fibra-3500X

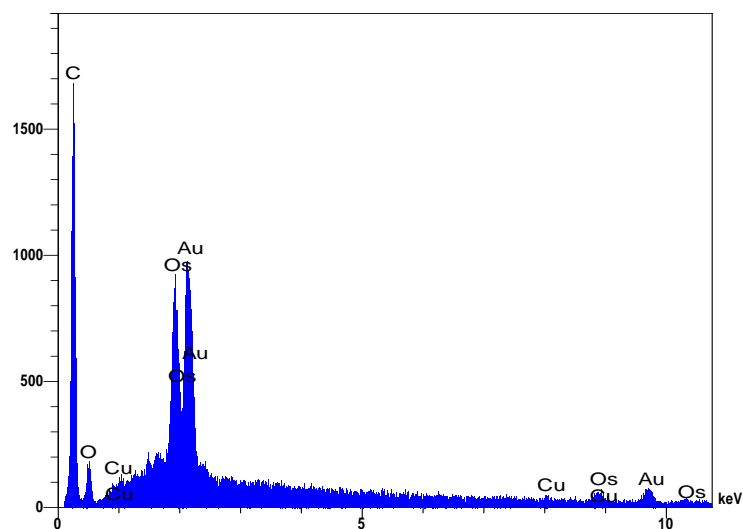
#### Acquisition Parameters

<b>Accelerating voltage (kV)</b>	15.0
<b>Beam current (nA)</b>	750.000
<b>Magnification</b>	1000
<b>Live time</b>	30
<b>Preset Time (s)</b>	30

#### Measures & Results

Elt	XRa	Int	Error	K	Kratio	W%	A%	ZAF
C	Ka	389.3	3.6025	0.9160	0.5629	72.82	78.11	1.2939
O	Ka	64.4	1.4652	0.0840	0.0516	27.18	21.89	5.2672
				1.0000	0.6145	100.00	100.00	

**Figura 17:** Análise EDS da fibra da membrana de PHB/PHB-HV. Os dados apresentados mostram que a amostra não está contaminada por nenhum outro elemento químico. O Hidrogênio não aparece na amostra, pois a sonda não é capaz de identificá-lo.



## SpectraPlus Report

**Company** ThermoNORAN  
**User** Quest  
**File** C- célula 3500X

### Acquisition Parameters

<b>Accelerating voltage (kV)</b>	15.0
<b>Beam current (nA)</b>	750.000
<b>Magnification</b>	1000
<b>Live time</b>	30
<b>Preset Time (s)</b>	30

### Measures & Results

Elt	XRa y	Int	Error	K	Kratio	W%	A%	ZAF
<b>C</b>	Ka	415.6	3.7220	0.6529	0.3341	64.03	87.76	1.9168
<b>O</b>	Ka	45.3	1.2289	0.0395	0.0202	9.53	9.80	4.7191
<b>Cu</b>	Ka	3.4	0.3374	0.0138	0.0071	0.86	0.22	1.2244
<b>Os</b>	La	12.9	0.6561	0.2938	0.1504	25.58	2.21	1.7013
				1.0000	0.5118	100.00	100.00	

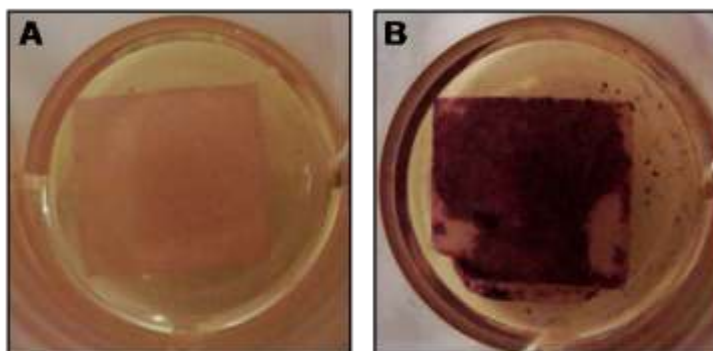
**Figura 18:** Análise EDS da superfície celular aderida à membrana de PHB/PHB-HV. Os dados apresentados indicam a presença de tecido celular.



#### 4.4.3 Avaliação da capacidade de metabolização do MTT pelas hASC cultivadas na membrana de nanofibras

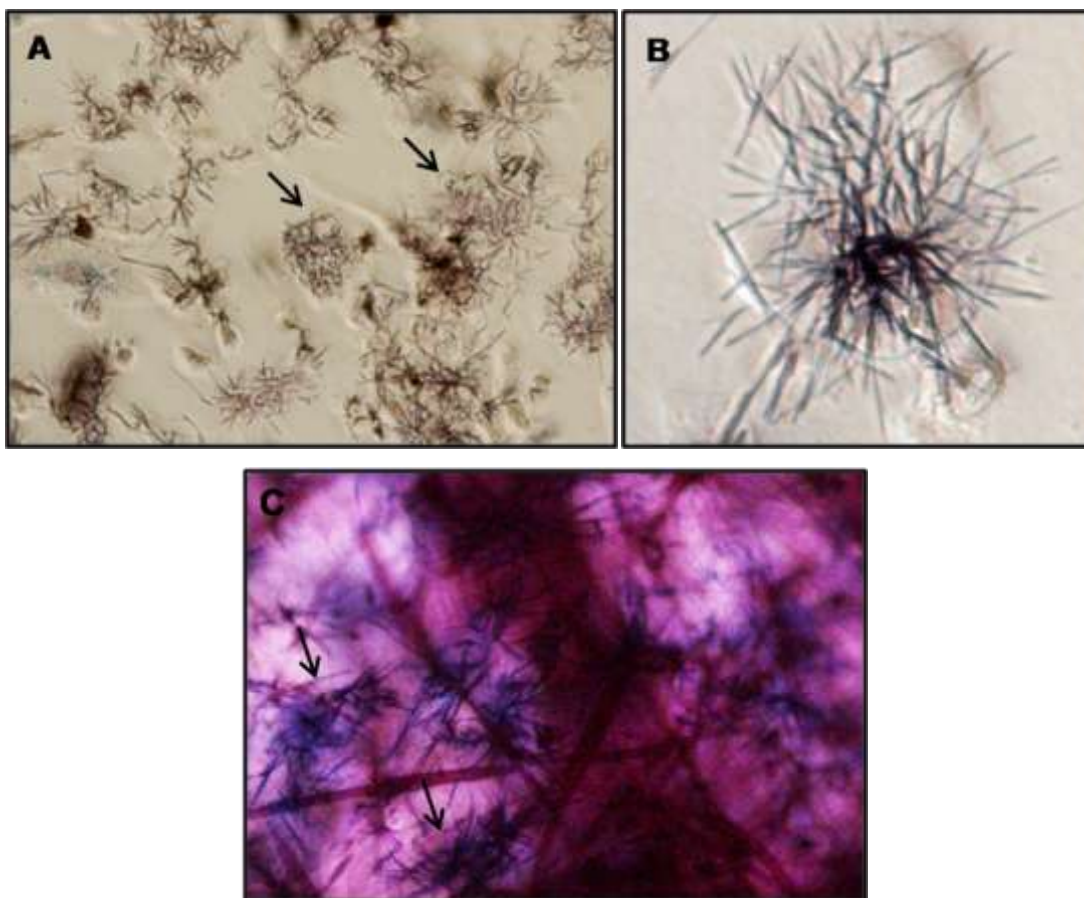
As membranas de nanofibras foram colonizadas com  $1 \times 10^5$  hASC e cultivadas por 3, 5 e 10 dias. Para verificar se a membrana estava influenciando na proliferação e viabilidade celular, foi realizado o ensaio de metabolização do MTT. O ensaio também foi realizado com células cultivadas em placas de cultura sem a membrana, como controle positivo. Para verificar se havia interferência da membrana no processo de colorimetria do MTT, esse foi também realizado nas membranas sem células, como controle negativo.

Através da visualização macroscópica das membranas contendo ou não células, foi possível visualizar que não houve interferência colorimétrica por parte das membranas (Figura 19). Esse dado foi comprovado pelo valor de absorbância obtido no ensaio da membrana sem célula, o qual foi similar ao valor obtido no experimento realizado apenas com os reagentes, sem presença de células. Esses valores foram subtraídos dos valores obtidos nos ensaios com células.



**Figura 19:** Avaliação macroscópica das membranas de PHB/PHB-HV durante o ensaio de MTT. (A) Membrana sem células. (B) Membrana com células após 10 dias de cultivo. A coloração escura é devido a presença de cristais de formazan, resultantes da metabolização do MTT pelas hASC.

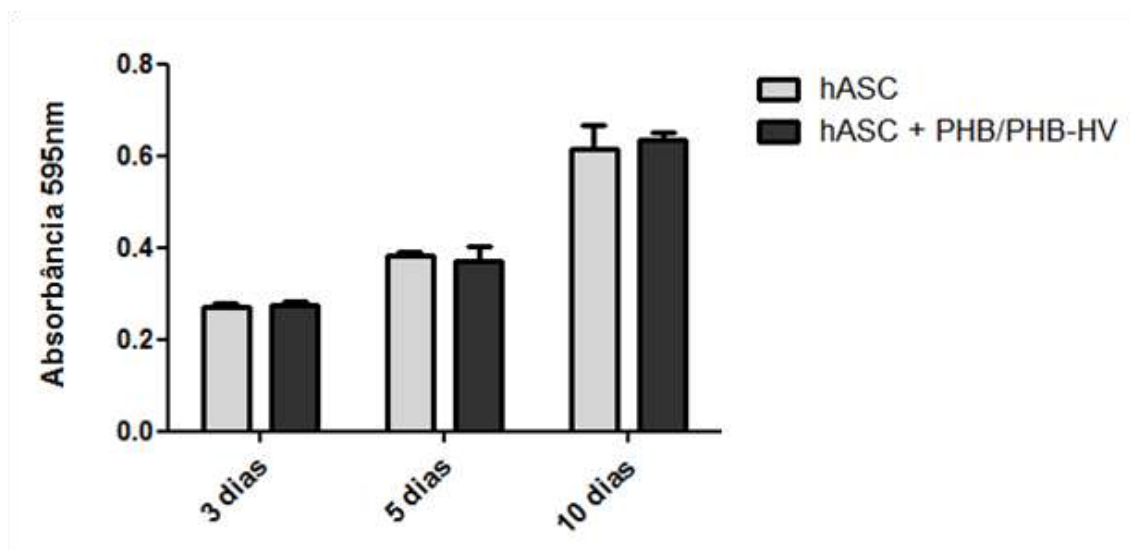
O ensaio do MTT consiste na metabolização do reagente MTT por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, levando à formação de cristais de formazan. Esses cristais foram observados durante o ensaio das hASC cultivadas na presença e ausência da membrana de nanofibras (Figura. 20).



**Figura 20:** Visualização dos cristais de formazan no ensaio de MTT. (A) hASC cultivadas em placa de cultura. Aumento: 100X. (B) Aumento: 300x. (C) hASC cultivadas na membrana de nanofibras. Aumento: 150X. As setas apontam alguns cristais de formazan.

Após a formação dos cristais, esses foram solubilizados com SDS-HCl 10% e foi feita a leitura de absorvância a 595nm. Na figura 21 é possível observar que houve proliferação das hASC cultivadas tanto na placa de cultura quanto nas membranas de nanofibras. Não houve diferença significativa entre os grupos hASC e hASC + PHB/PHBHV.



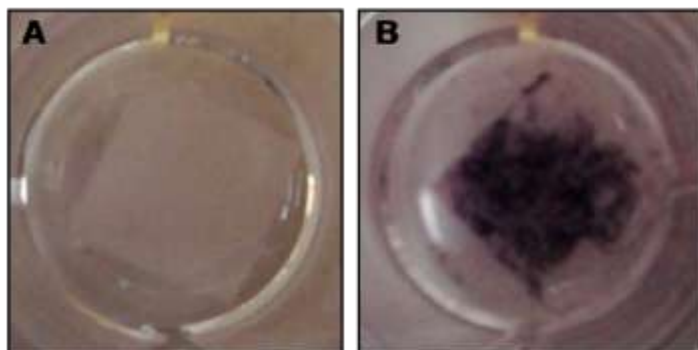


**Figura 21:** Representação gráfica da proliferação celular das hASC cultivadas em placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV.

#### 4.4.5 Avaliação da produção da fosfatase alcalina nas hASC cultivadas na membrana de nanofibras

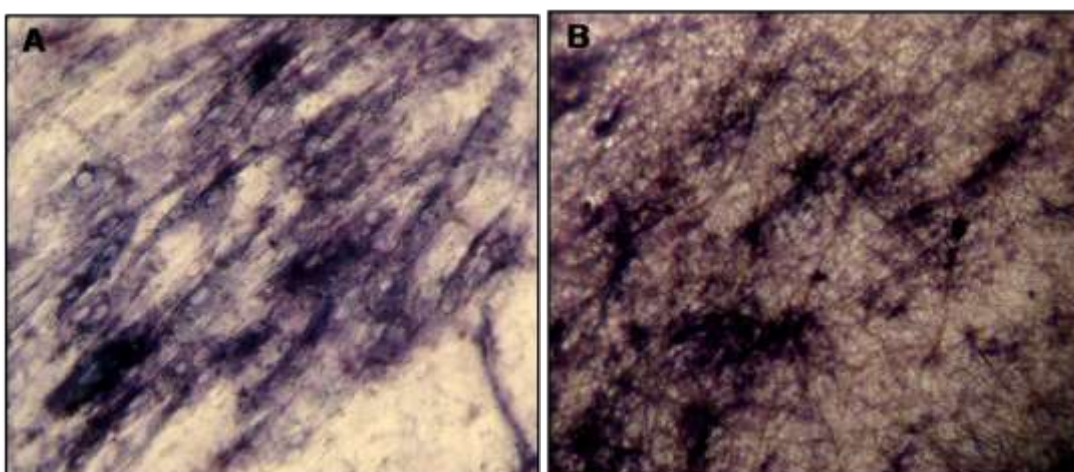
A fosfatase alcalina é uma enzima presente em células indiferenciadas e por isso, é utilizada como um marcador de células-tronco. Sendo assim, o ensaio de produção de fosfatase alcalina foi realizado para verificar se as células cultivadas na membrana de PHB/PHB-HV mantinham os mesmos níveis de produção dessa enzima.

Novamente, o ensaio foi realizado nas membranas sem células, para verificar se a membrana influenciava na reação colorimétrica. Na figura 22 é possível observar que não houve interferência da membrana na reação. O valor de absorbância também foi similar ao valor obtido no ensaio com os reagentes apenas, sem células. Esses valores foram subtraídos dos valores obtidos nos ensaios com células.



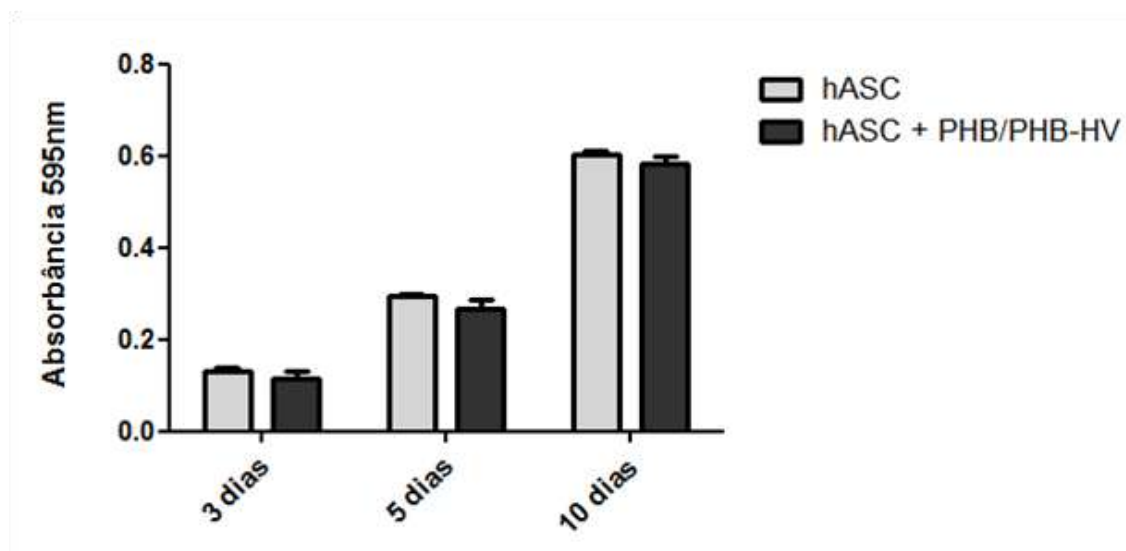
**Figura 22:** Avaliação macroscópica das membranas de PHB/PHB-HV durante o ensaio de produção de fosfatase alcalina. (A) Membrana sem células. (B) Membrana com hASC após 10 dias de cultivo. A coloração púrpura é resultado da atividade da fosfatase alcalina.

No ensaio de produção da fosfatase alcalina, o precipitado púrpura é formado quando a enzima cliva o grupamento fosfato presente no BCIP, produzindo um próton que reduz o NBT. Através da M.O foi possível observar o precipitado púrpura nas células cultivadas na placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV (Figura 23).



**Figura 23:** Visualização do precipitado púrpura no ensaio de produção da fosfatase alcalina. (A) hASC cultivadas em placa de cultura. Aumento: 200X. (B) hASC cultivadas na membrana de nanofibras. Aumento: 200X.

A figura 24 mostra que os níveis de produção da fosfatase alcalina aumentaram ao longo do tempo de cultivo das hASC na membrana, de forma semelhante ao que ocorre quando as células são cultivadas na placa de cultura. Não houve diferença significativa entre os grupos hASC e hASC + PHB/PHB-HV.



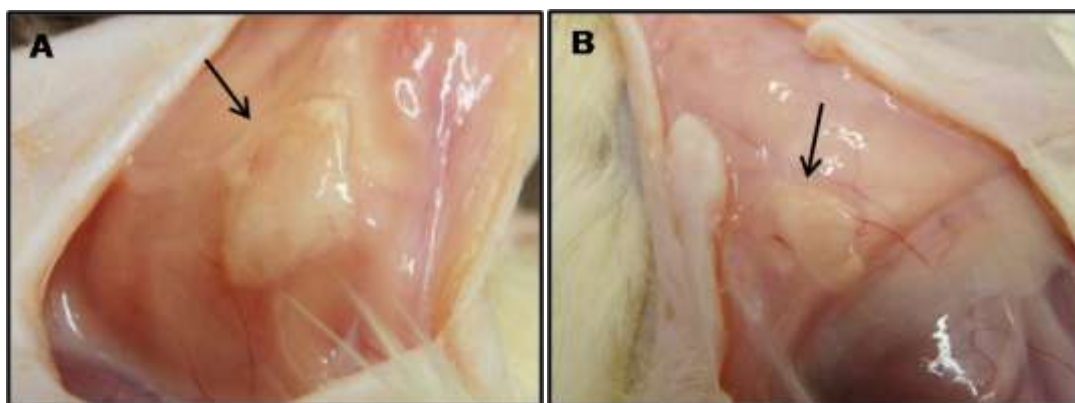
**Figura 24:** Representação Gráfica da detecção da atividade da fosfatase alcalina nas hASC cultivadas em placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV.

#### 4.5 Avaliação da biocompatibilidade *in vivo* das membranas de nanofibras de PHB/PHBHV

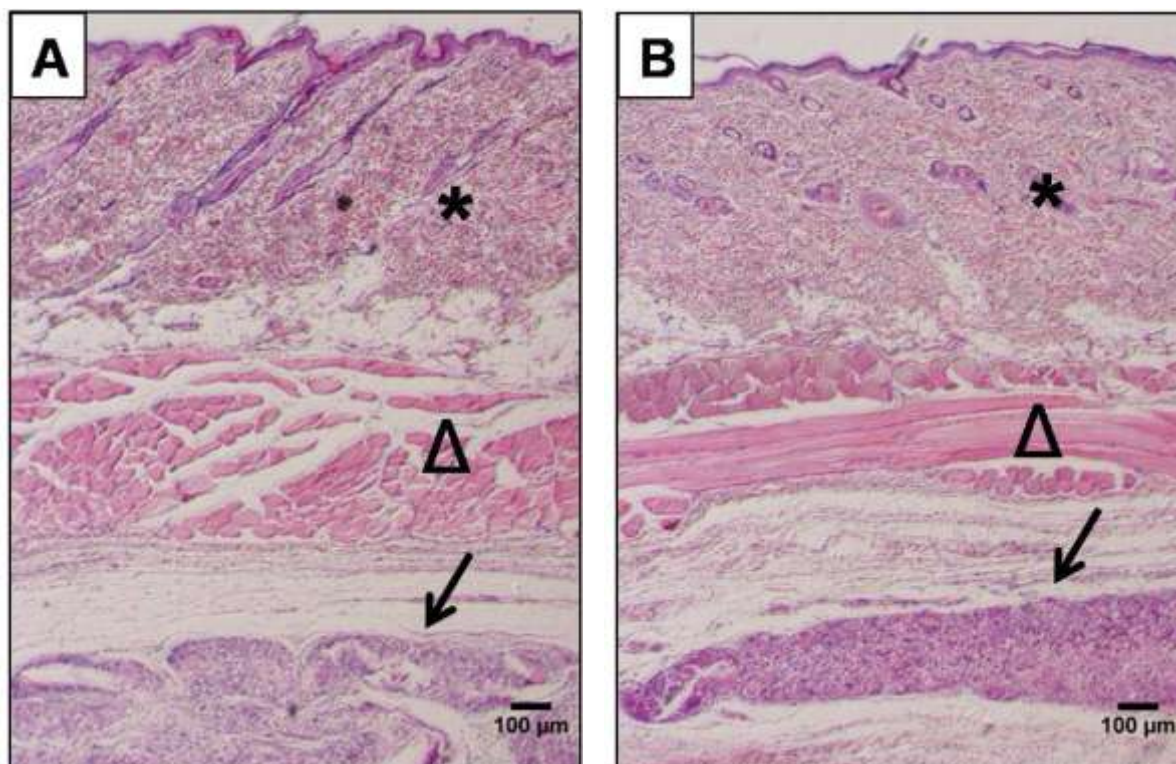
Para verificar a citotoxicidade das membranas de PHB/PHB-HV *in vivo*, foram feitos implantes subcutâneos da membrana em ratos Wistar. Após 4 e 8 semanas, os implantes foram retirados e analisados através de histologia, com coloração de hematoxilina e eosina.

Durante o período nos quais receberam os implantes, os animais apresentaram-se saudáveis. A partir da terceira semana após o procedimento cirúrgico, já havia ocorrido a completa reabsorção dos fios de sutura, a reepitelização da região traumatizada e o crescimento de novos pêlos.

Após 4 e 8 semanas, nenhuma região de necrose, abscesso ou tumorigênese foram observados nas proximidades do implante (Figura 25). A integridade dos tecidos adjacentes foi comprovada através dos cortes histológicos (Figuras 26).



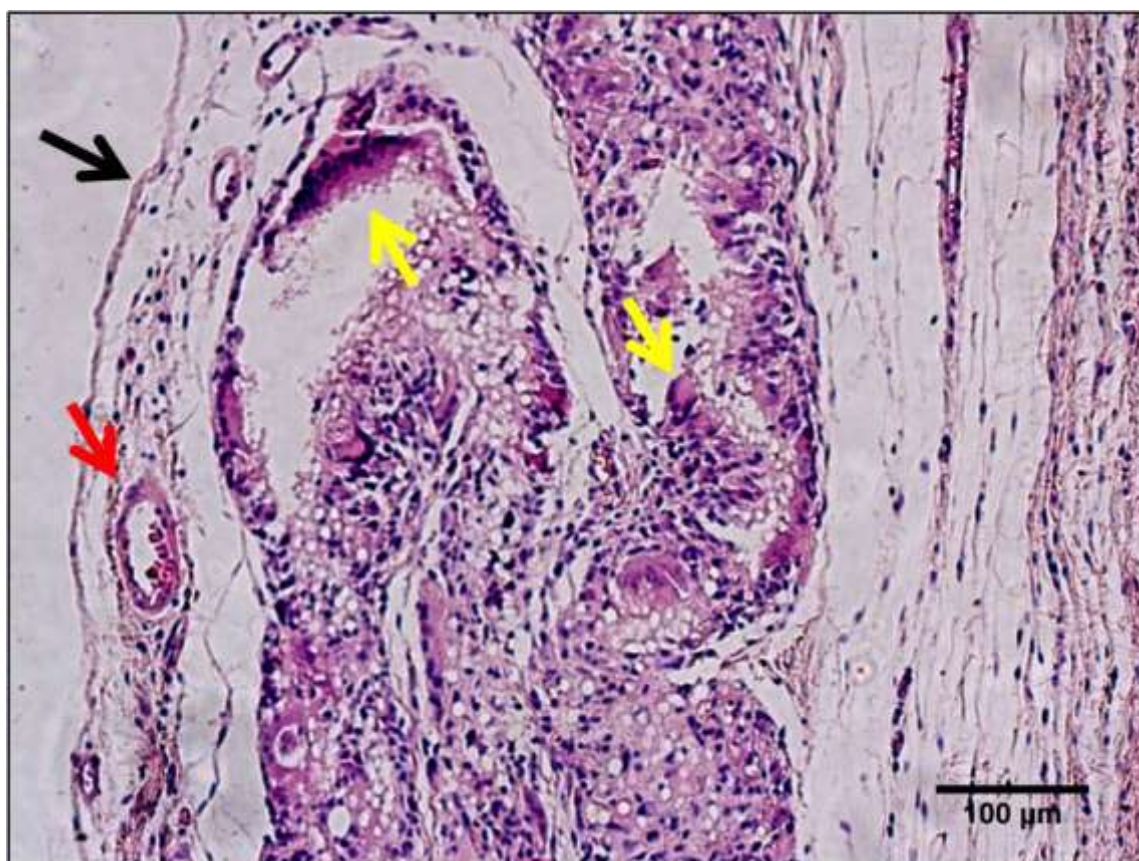
**Figura 25:** Região do implante no momento da retirada. (A) Implante após 4 semanas. (B) Implante após 8 semanas. As setas apontam para os implantes. Não é observada nenhuma área de necrose, abscesso ou tomorigênese.



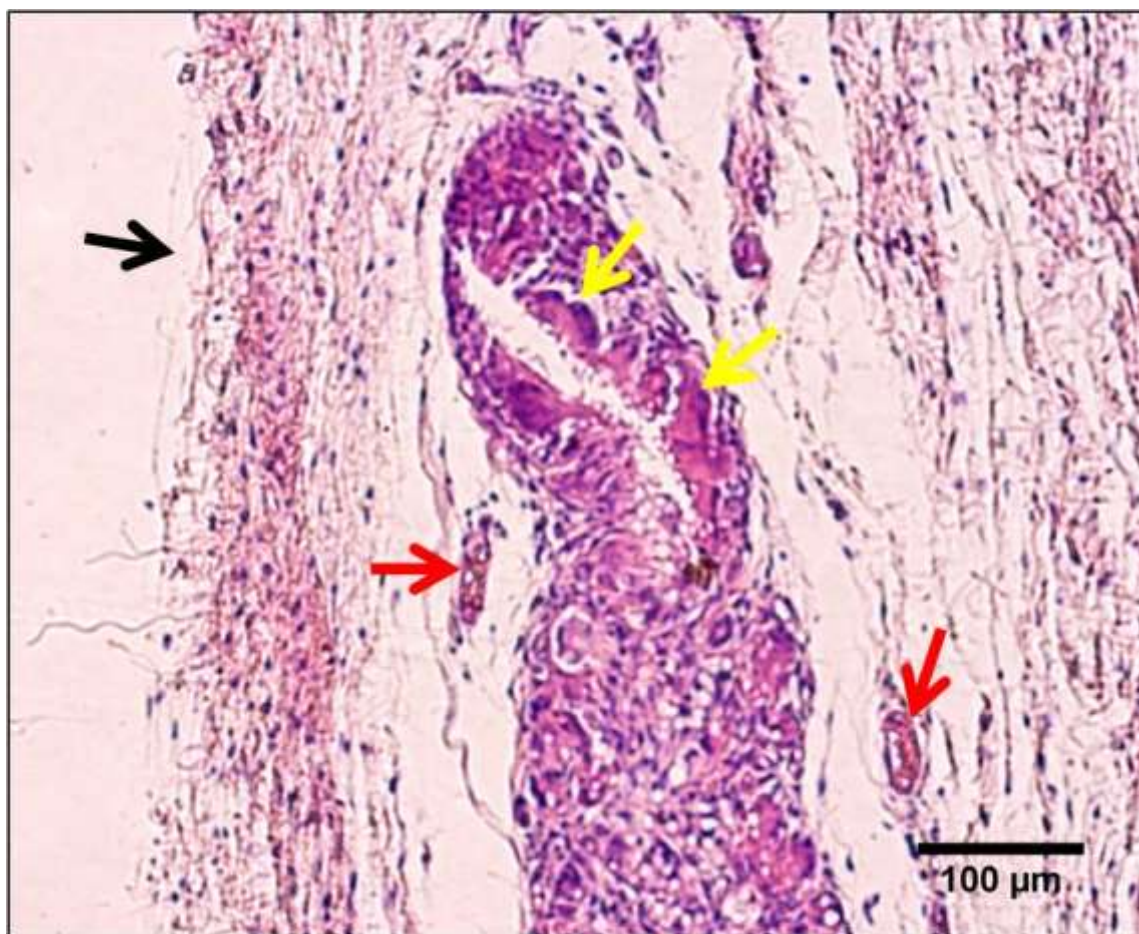
**Figura 26:** Visão panorâmica da região dos implantes. (A) Após 4 semanas. (B) Após 8 semanas. A análise histológica mostra que os tecidos adjacentes aos implantes encontram-se intactos. Setas apontam para o implante. \* região da epiderme e derme. Δ Tecido muscular.



A presença da membrana na região subcutânea do animal acarretou em uma resposta inflamatória ao corpo estranho. A membrana foi encapsulada por uma fina cápsula fibrosa e pôde-se observar uma resposta inflamatória crônica com proliferação fibroblástica discreta em torno do implante, formação de novos vasos sanguíneos e com a presença de infiltrado de células mononucleares como linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Além disso, foi observada a presença de células gigantes associadas às fibras da membrana. A resposta inflamatória foi considerada discreta, uma vez que não afetou a função e a integridade dos tecidos adjacentes (Figuras 27 e 28).



**Figura 27:** Análise histológica da região do implante após 4 semanas. Seta preta aponta para a cápsula fibrosa. Seta vermelha aponta para vaso sanguíneo. Setas amarelas apontam para células gigantes.



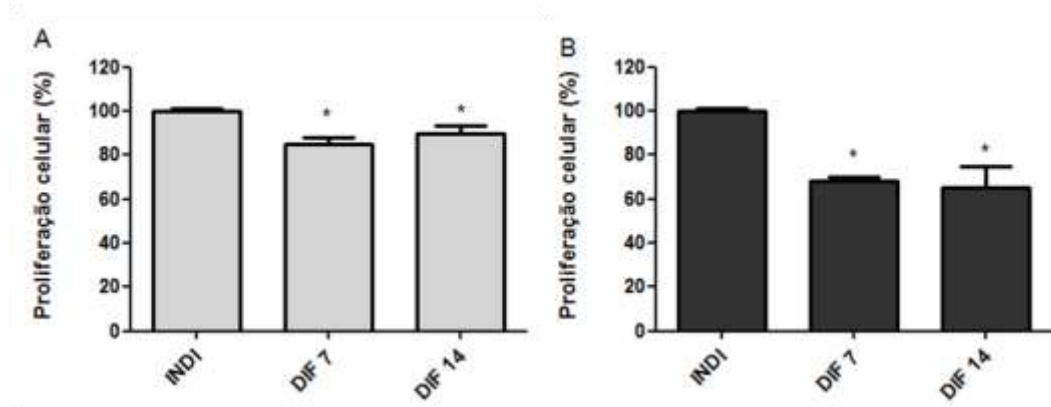
**Figura 28:** Análise histológica da região do implante após 8 semanas. Seta preta aponta para a cápsula fibrosa. Setas vermelhas apontam para vasos sanguíneos. Setas brancas apontam para células gigantes.

#### 4.6 Diferenciação endotelial

Após os ensaios de biocompatibilidade *in vitro*, as h-ASC foram induzidas à diferenciação endotelial, através da adição de meio de diferenciação, que contém VEGF e bFGF. A indução da diferenciação foi realizada nas células cultivadas em placa de cultura e sobre a membrana de PHB/PHB-HV. Para verificar se ocorreu diferenciação das h-ASC em células endoteliais, foram realizados os ensaios de proliferação celular - MTT, produção da fosfatase alcalina, imunofluorescência com anticorpos para moléculas específicas de células endoteliais e PCR. Esses ensaios foram realizados tanto com células cultivadas no meio de cultura basal como com células cultivadas em meio de diferenciação após 7 e 14 dias da indução.

#### 4.6.1 Avaliação da proliferação celular durante a diferenciação endotelial

Após 7 e 14 dias de indução da diferenciação endotelial, foi realizado o ensaio do MTT para avaliar a proliferação das células que estavam no processo de diferenciação. O ensaio foi realizado como descrito anteriormente. O valor de absorbância obtido pelas células cultivadas em meio de cultura basal (INDI) foi considerado 100%. A partir da figura 29 é possível observar que houve redução na proliferação das células cultivadas na placa de cultura e na membrana de PHB/PHBHV durante a diferenciação endotelial.

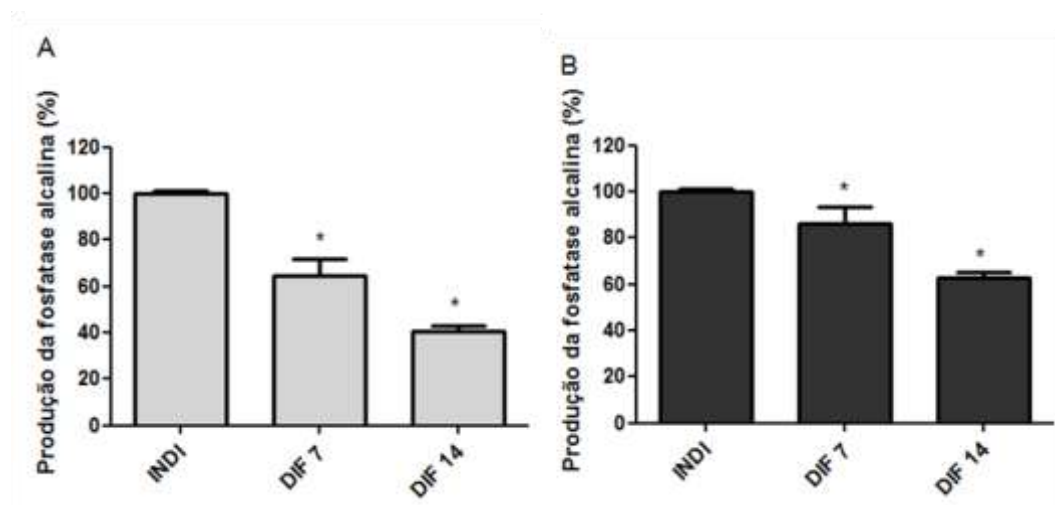


**Figura 29:** Representação gráfica da proliferação celular durante a diferenciação endotelial. (A) Ensaio realizado nas células cultivadas na placa de cultura. (B) Ensaio realizado nas células cultivadas na membrana de PHB/PHBHV. \* representa diferença significativa em relação ao controle (INDI),  $p < 0,05$ .

#### 4.6.2 Avaliação da produção da fosfatase alcalina durante a diferenciação endotelial

Conforme mencionado anteriormente, a fosfatase alcalina é uma enzima com alta atividade em células indiferenciadas. Dessa forma, foi realizado o ensaio de produção da fosfatase alcalina nas células cultivadas em meio de cultura basal e nas células cultivadas em meio de diferenciação, na placa de cultivo celular e sobre a membrana de PHB/PHBHV, após 7 e 14 dias da indução da diferenciação. Novamente, o valor da densidade óptica obtido das células indiferenciadas foi considerado 100%. A figura 30 mostra que houve redução significativa na produção da enzima durante a diferenciação endotelial.



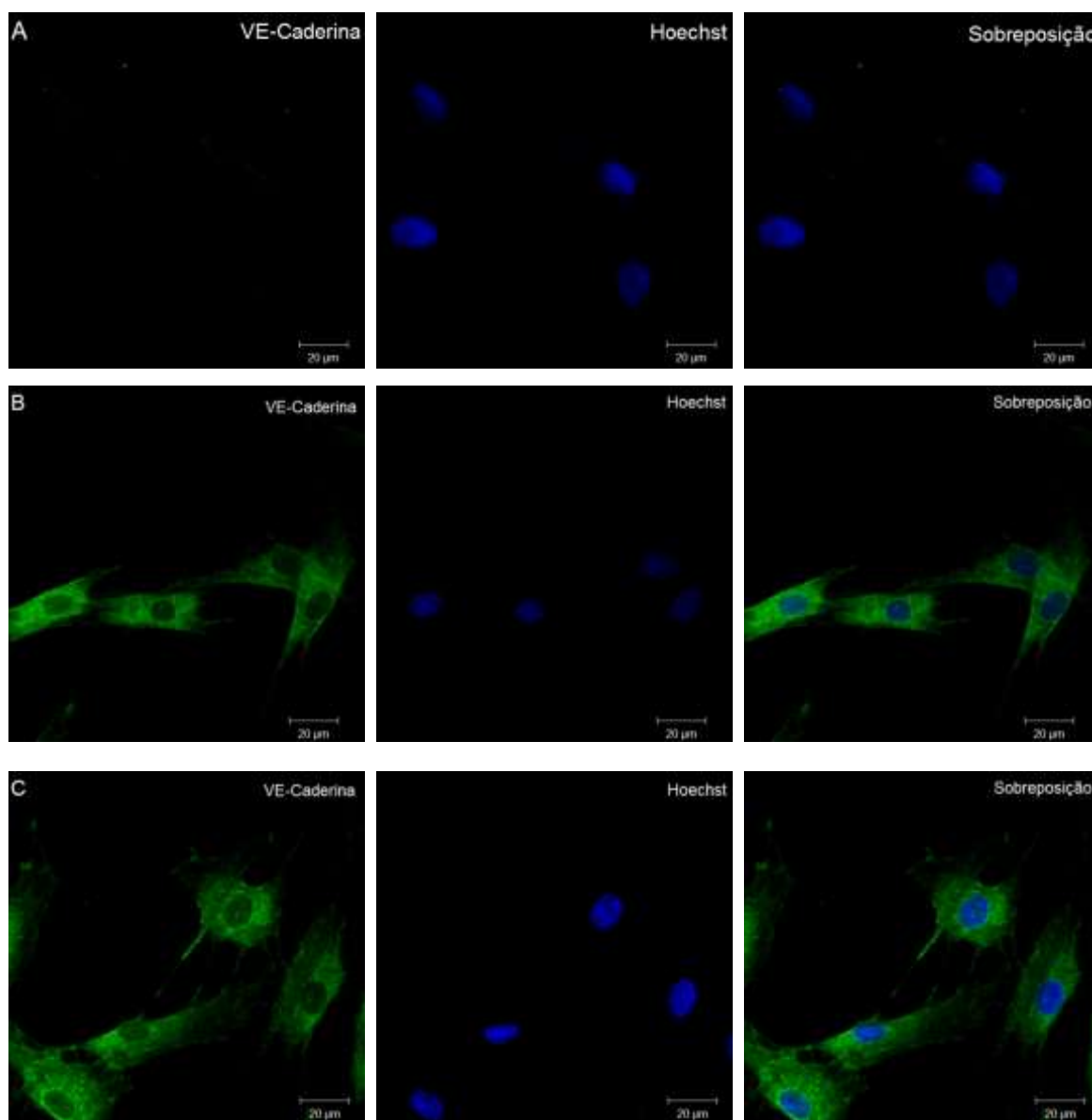


**Figura 30:** Representação gráfica da produção da fosfatase alcalina durante a diferenciação endotelial. (A) Ensaio realizado nas células cultivadas na placa de cultura. (B) Ensaio realizado nas células cultivadas na membrana de PHB/PHBHV. \* representa diferença significativa em relação ao controle (INDI) e entre os grupos DIF 7 e DIF 14,  $p < 0,05$ .

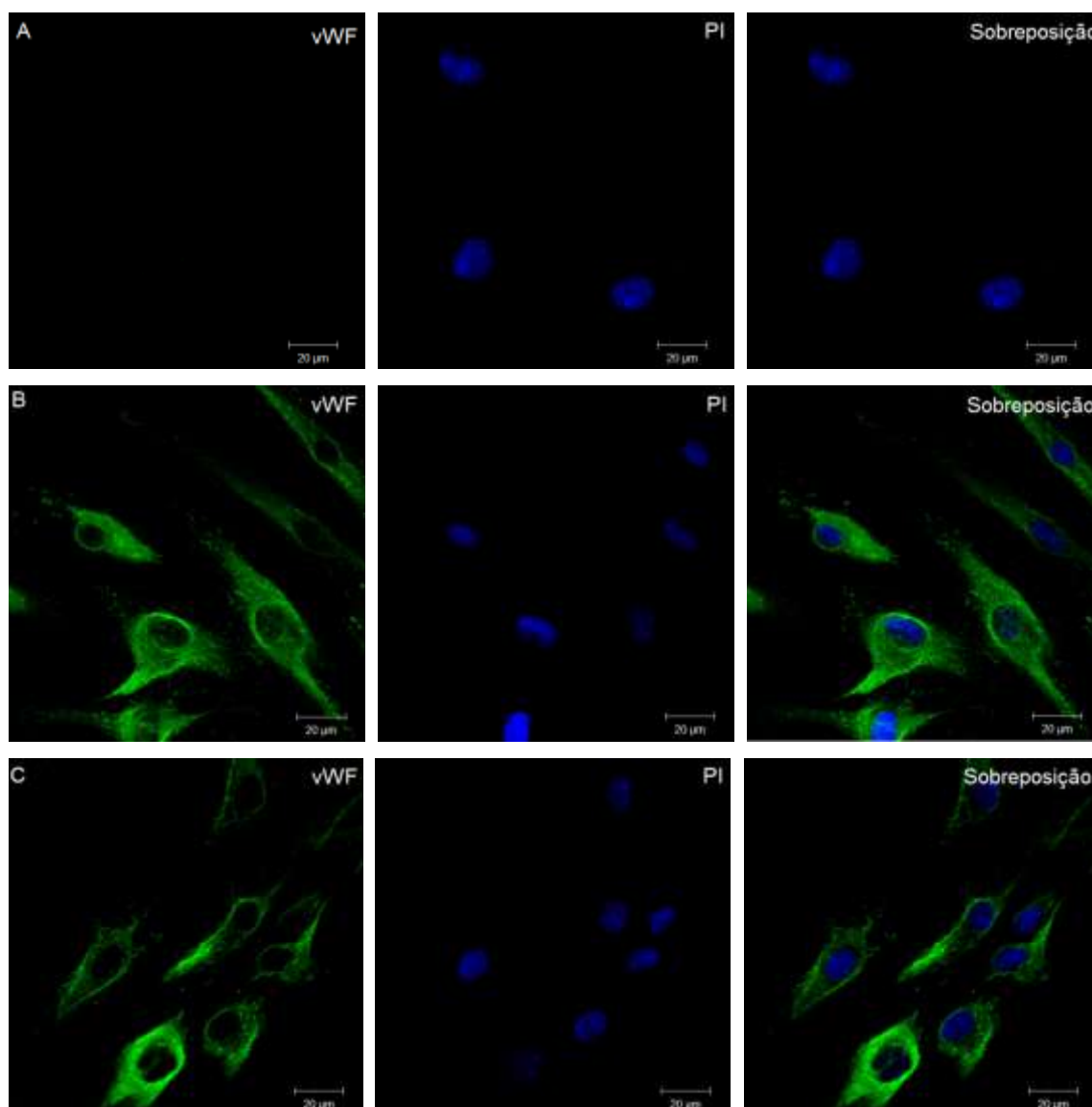
#### 4.6.3 Análise de marcadores de células endoteliais durante a diferenciação endotelial através de imunofluorescência

Para determinar se, durante o processo de diferenciação, as hASC passaram a expressar marcadores de células endoteliais, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos específicos para o vWF e VE-caderina. Esse ensaio foi realizado com células cultivadas em meio de cultura basal e células cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 7 e 14 dias de indução. Verificou-se, em microscópio confocal, que as células cultivadas em meio de cultura basal não apresentaram marcação para o vWF e VE-Caderina. Já as células cultivadas em meio de diferenciação após 7 dias expressavam as proteínas vWF e VE-Caderina. A expressão desses marcadores permaneceu após 14 dias de indução da diferenciação endotelial (Figuras 31 e 32).





**Figura 31:** Análise de imunofluorescência para a proteína VE-Caderina. (A) hASC cultivadas em meio de cultura basal. (B) hASC cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 7 dias. (C) hASC cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 14 dias.

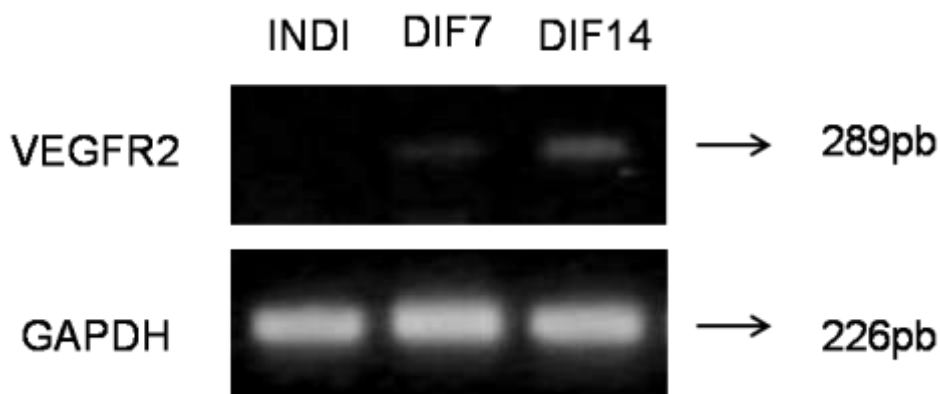


**Figura 32:** Análise de imunofluorescência para a proteína vWF. (A) hASC cultivadas em meio de cultura basal. (B) hASC cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 7 dias. (C) hASC cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 14 dias.

#### 4.6.4 Avaliação da diferenciação endotelial através de PCR

A expressão gênica do receptor 2 de VEGF foi analisada através da amplificação de segmentos gênicos e observado pelo resultado de eletroforese em gel de agarose. Essa análise foi feita em células cultivadas em meio de cultura basal e células cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 7 e 14 de indução. O receptor 2 de VEGF foi detectado nas células cultivadas em meio de diferenciação e

não foi detectado nas células cultivadas em meio de cultura basal. Como controle positivo da reação foi utilizado o gene GAPDH (Figura 33).



**Figura 33:** Detecção do VEGFR2 através de PCR. INDI representa células cultivadas em meio de cultura basal. DIF7 representa células cultivadas em meio de diferenciação endotelial por 7 dias. DIF15 representa células cultivadas em meio de diferenciação endotelial por 15 dias. GAPDH é controle positivo da reação, enzima constitutivamente expressa por todas as células.

## *5. Discussão*

---

A medicina regenerativa se baseia na possibilidade de auxiliar a regeneração de tecidos danificados por doenças, traumas ou senescência. Na engenharia de tecidos, isto pode ser conseguido através do uso de biomateriais degradáveis que servem como suporte temporário para que células possam aderir, proliferar, diferenciar e manter as funções de um determinado tecido (Gomes e Reis, 2004). No entanto, um dos grandes desafios dessa abordagem está relacionado à falta de vascularização após a implantação desses constructos. A ausência de vascularização no interior do implante limita a nutrição e remoção de metabólitos e conseqüentemente leva à morte celular (Rouwkema, Rivron *et al.*, 2008). Além disso, outra consideração importante na engenharia de tecidos é a fonte de células e a capacidade de controlar sua proliferação e diferenciação celular.

Nesse estudo, optou-se pela utilização de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (hASC). Essas células possuem inúmeras vantagens que as tornam excelentes candidatas para a utilização na engenharia de tecidos: (i) é uma fonte autóloga de células-tronco; (ii) a obtenção do tecido adiposo é um procedimento pouco invasivo, com anestesia local é possível retirar quantidades suficientes do tecido; (iii) é possível isolar grandes quantidades de hASC a partir do tecido adiposo e essas células podem ser expandidas rapidamente (alta taxa proliferativa); (iv) já foi demonstrada a capacidade das hASC de se diferenciarem em várias linhagens celulares, (v) sua utilização não envolve questionamentos éticos (Mizuno, 2009; Rada, Reis *et al.*, 2009).

As hASC foram primeiramente descritas por Patrícia Zuk e colaboradores em 2001 como uma fração de células-tronco presentes no tecido adiposo que possuem características semelhantes as células-tronco mesenquimais da medula óssea como morfologia fibroblastóide, capacidade de diferenciar em condrócitos, adipócitos e osteoblastos e perfil fenotípico semelhante (Zuk, Zhu *et al.*, 2001; Wagner, Wein *et al.*, 2005).

Corroborando os dados de Zuk (2001) e assim como o observado por vários autores que isolaram células-tronco a partir do tecido adiposo, as hASC isoladas nesse trabalho demonstraram adesão à superfície plástica da placa de cultura, formação de colônias e alta taxa proliferativa (Aust, Devlin *et al.*, 2004; Rodriguez, Elabd *et al.*, 2005; Lin, Liu *et al.*, 2006).

Além da caracterização morfológica, foi estabelecida uma caracterização fenotípica para identificar a população de células-tronco através da combinação da expressão de marcadores de superfície. Os resultados obtidos na caracterização fenotípica corroboram o perfil fenotípico proposto por Zuk (2001), Aust (2004) e Wagner (2005) e aceito pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. As hASC constituíram, *in vitro*, uma população homogênea de células que expressam os marcadores de superfície CD29, CD44, CD73 e HLA-DR e não expressam os marcadores CD34, CD45 e HLA-ABC.

Após a caracterização das hASC, essas foram cultivadas em membranas de nanofibras a fim de testar a biocompatibilidade *in vitro*. Segundo Araujo (2007) e de acordo com os resultados obtidos, essa técnica permite a produção de matrizes estruturais formadas de nanofibras capazes de mimetizar a estrutura das fibras de colágeno da MEC. De fato, foi possível obter membranas com fibras de diâmetro de 300nm a 1,3 µm que favoreceram a adesão celular de modo eficiente e adequado.

Os polímeros utilizados para a fabricação da membrana, o PHB e PHB-HV, pertencem à família dos PHA. A mudança na composição dos PHA permite a variação das propriedades mecânicas, da biocompatibilidade e da taxa de degradação, o que torna essa família de polímeros bastante atraente para aplicações na área médica, incluindo a engenharia de tecidos (Chen e Wu, 2005).

Várias matrizes estruturais compostas de PHB ou PHB-HV vêm sendo desenvolvidas e apresentam biocompatibilidade com diferentes tipos celulares (Suwantong, Waleetorncheepsawat *et al.*, 2007; Rathbone, Furrer *et al.*, 2009). No entanto, a utilização de uma blenda de PHB e PHBHV para a construção de uma membrana de nanofibras é uma abordagem inovadora.

É bem aceito que o termo biocompatibilidade não é definido apenas pela falta de citotoxicidade do material, mas também por sua biofuncionalidade, o que lhe permite suportar as interações entre as células e a matriz, além de desempenhar a função específica do local onde o constructo será aplicado (Williams, 2008).

Os resultados obtidos através de imunofluorescência e MEV demonstraram que as hASC foram capazes de aderir à membrana de PHB/PHB-HV e estabelecer conexões entre células. Aliadas às imagens obtidas por MEV, a sonda EDS proporcionou a certificação química da presença de superfície celular sobre as

amostras, através da demonstração da presença de ósmio na área selecionada no corpo celular comparada com a área livre de células. O tetróxido de ósmio é utilizado para estabilizar a membrana celular e permanece incrustado na sua parte lipídica durante o processamento da amostra. Resultados semelhantes foram demonstrados por McCullen *et al.* (2007) que cultivaram hASC em membranas de nanofibras baseadas em PLA e nanotubos de carbono e verificaram adesão celular, proliferação e manutenção da viabilidade.

A análise da biocompatibilidade de matrizes estruturais produzidas a partir de biomateriais é realizada por métodos baseados na avaliação da citotoxicidade (Guo, Su *et al.*, 2009), da mutagênese (Liu, Wang *et al.*, 1997; Montanaro, Cervellati *et al.*, 2006) e da biofuncionalidade celular (Smith, White *et al.*, 2009).

Para a avaliação da citotoxicidade, o ensaio de MTT é o mais aplicado, sendo um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade e proliferação celular (Onuki, Bhardwaj *et al.*, 2008). Esse ensaio é realizado para avaliação da biocompatibilidade de vários tipos de biomateriais, utilizando diferentes tipos de linhagens celulares (Valerio, Pereira *et al.*, 2004; Serrano, Portoles *et al.*, 2008; Guo, Su *et al.*, 2009).

Neste trabalho, realizou-se o ensaio de MTT em hASC cultivadas em placa de cultura e na membrana de PHB/PHB-HV por 3, 5 e 10 dias. Os valores de absorbância obtidos mostraram que a membrana de PHB/PHB-HV não interferiu na viabilidade e na proliferação celular. Esses valores aumentaram de acordo com o tempo de cultivo e, em cada tempo, não houve diferença significativa entre o grupo de células cultivadas na placa de cultura e o grupo de células cultivadas na membrana. Esse resultado demonstrou que a membrana de PHB/PHB-HV promove a proliferação celular de hASC, sem apresentar um efeito citotóxico, podendo ser considerada biocompatível com esse tipo celular.

Da mesma forma, na avaliação da produção da fosfatase alcalina, não houve interferência na produção da enzima, quando as hASC foram cultivadas na membrana de PHB/PHBHV por 3, 5 e 10 dias. A fosfatase alcalina é um dos marcadores do estágio de indiferenciação das células-tronco embrionárias (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998; O'connor, Kardel *et al.*, 2008) e já foi demonstrada a presença dessa enzima em células-tronco derivadas da medula óssea e tecido adiposo humano (Riekstina, Cakstina *et al.*, 2009). Baseado nisso,

esses resultados demonstraram que a membrana de PHB/PHB-HV não altera fisiologicamente a produção da fosfatase alcalina pelas hASC.

Após a avaliação *in vitro* da biocompatibilidade da membrana de PHB/PHB-HV com as hASC, foi realizado o implante subcutâneo dessa membrana no dorso de ratos Wistar para avaliar a resposta tecidual *in vivo*.

Quando um tecido é lesado para o implante de um material, uma resposta de cicatrização é iniciada por uma série de eventos complexos. As principais etapas desse processo incluem a inflamação aguda, inflamação crônica e a formação de tecido granuloso (Onuki, Bhardwaj *et al.*, 2008).

Durante os primeiros dias da implantação, neutrófilos e macrófagos são atraídos para o local do implante como resultado do ferimento e da inserção de um material estranho. O recrutamento dessas células caracteriza a inflamação aguda. No entanto, a persistência e o aumento crescente do número de neutrófilos na região do implante está relacionado à liberação de substâncias citotóxicas pelo implante (Qu, Wu *et al.*, 2006). Neste trabalho, não foi avaliada a resposta aguda. No entanto, após 4 e 8 semanas não observou-se a presença de neutrófilos, região de necrose, abscesso ou tumorigênese em nenhuma região próxima ao implante. Além disso, os tecidos adjacentes não sofreram nenhuma alteração morfológica, de forma que essas observações permitem sugerir que a membrana de PHB/PHB-HV não é citotóxica.

A presença contínua do material estranho acarretou inflamação crônica. Essa fase é caracterizada pela presença de um infiltrado de células mononucleares como linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Os macrófagos secretam proteínas que induzem a formação de uma cápsula fibrosa em volta do implante. Se o implante é produzido a partir de um material que não é reabsorvível, uma cápsula fibrosa espessa é formada ao seu redor. No entanto, se o implante é derivado de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, apenas uma fina cápsula fibrosa é formada e posteriormente pode ser absorvida (Shishatskaya, Volova *et al.*, 2004). Os resultados mostraram apenas uma fina cápsula fibrosa o que permite inferir que as membranas de PHB/PHB-HV são biocompatíveis e biodegradáveis.

Embora os macrófagos secretem proteínas que induzem a formação de uma cápsula fibrosa, eles também secretam citocinas pró-angiogênicas e mediadores de



degradação do biomaterial, importantes para o processo de incorporação do implante no tecido (Anderson, Rodriguez *et al.*, 2008). A fusão de macrófagos leva à formação de células gigantes, tipo corpo estranho, responsáveis pela fagocitose e reabsorção dos implantes. A presença de células gigantes foi observada após 4 e 8 semanas do implante, sugerindo a reabsorção do mesmo (Qu, Wu *et al.*, 2006).

Reações inflamatórias intensas, pirogênicas e outras reações indesejadas ao implante de biomateriais *in vivo* podem ocorrer devido à composição química, à forma e ao local da implantação e, em grande medida, ao grau de pureza do material. Polímeros provenientes de bactérias, como o PHB, podem conter fragmentos bacterianos como lipopolissacarídeos que podem induzir reações adversas durante o cultivo de células *in vitro*, e reações pirogênicas *in vivo*. Sendo assim, para aplicações médicas, esses polímeros devem estar livres de endotoxinas, sendo necessária a utilização de métodos acurados de extração e purificação (Lee, Choi *et al.*, 1999; Sevastianov, Perova *et al.*, 2003; Valappil, Misra *et al.*, 2006).

Através de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, foi possível caracterizar a resposta produzida pelo implante da membrana de PHB/PHB-HV como resposta do tipo corpo estranho. Observou-se a presença de uma fina cápsula fibrosa, de um infiltrado de células mononucleares, formação de novos vasos sanguíneos e presença de células gigantes tipo corpo estranho. Dessa forma, pode-se inferir que a membrana produzida possui um alto grau de pureza em relação aos seus componentes, o PHB e PHB-HV, pois nenhuma reação insatisfatória foi determinada *in vitro* e *in vivo*. Observou-se que a degradação *in vivo* de polímeros da família PHA é um processo lento, concordando com Shishatskaya *et al.* (2004) que afirmam que a degradação *in vivo* desse tipo de polímero pode demorar de meses a anos. A partir dessas análises é possível afirmar que a membrana de PHB/PHB-HV apresenta biocompatibilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Após a avaliação e comprovação da biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* da membrana de PHB/PHB-HV foram realizados ensaios para verificar o potencial de diferenciação endotelial das hASC, para que dessa forma, um constructo de membrana de PHB/PHB-HV e células endoteliais derivadas de hASC pudesse ser criado.

A indução da diferenciação endotelial se fez através da adição de VEGF e bFGF ao meio de cultura. A utilização desses fatores na indução da diferenciação endotelial já foi demonstrada por diversos autores utilizando células-tronco humanas de diversas fontes como medula óssea (Oswald, Boxberger *et al.*, 2004), tecido adiposo (Cao, Sun *et al.*, 2005), líquido amniótico (Zhang, Baxter *et al.*, 2009) e sangue periférico (Ria, Piccoli *et al.*, 2008).

Vários ensaios foram realizados a fim de comprovar a indução endotelial. Inicialmente, realizou-se o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade e a proliferação das hASC durante o processo de diferenciação. É conhecido que a capacidade de proliferação e diferenciação está mutuamente relacionada. Populações de células-tronco possuem alto potencial proliferativo que gradualmente diminui à medida que as células tornam-se comprometidas com a diferenciação. Entretanto, há um estágio intermediário, na maioria dos tecidos, no qual a proliferação e diferenciação estão equilibradas. Nesse estágio encontram-se as células precursoras ou progenitoras. No entanto, a capacidade de auto-renovação é exclusiva das células-tronco e é perdida à medida que essas células se comprometem com uma linhagem celular (Mountford, 2008).

De fato, ao longo da diferenciação, houve uma redução na proliferação das hASC cultivadas em meio de cultura de diferenciação endotelial, em relação às células cultivadas em meio de cultura basal. Essa redução ocorreu tanto nas células cultivadas na placa de cultura quanto nas cultivadas na membrana de PHB/PHBHV. Breyner *et al.* (2010) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar a proliferação de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de rato durante a diferenciação condrogênica.

Como mencionado anteriormente, a fosfatase alcalina é uma enzima presente em células-tronco embrionárias e adultas como um marcador do estágio de indiferenciação (O'connor, Kardel *et al.*, 2008; Riekstina, Cakstina *et al.*, 2009). No entanto, no indivíduo adulto, existem quatro isoformas dessa enzima, específicas para o fígado, osso, placenta e intestino, mas não para células endoteliais (Moss, 1992). Dessa forma, avaliou-se a produção da fosfatase alcalina durante o processo de diferenciação. Com base nos resultados obtidos, foi observada a redução na produção da enzima pelas hASC cultivadas em meio de diferenciação, tanto na

placa de cultura quanto na membrana de PHB/PHB-HV, em relação às células que receberam meio de cultura basal.

A redução da quantidade da produção da fosfatase alcalina também foi demonstrada por Breyner *et al.* (2010) durante a diferenciação condrogênica. Dessa forma, essa redução pode ser considerada um indicativo da alteração fenotípica sofrida pelas células quando cultivadas em meio indutor.

A fim de verificar alteração fenotípica das hASC durante a diferenciação endotelial, realizaram-se ensaios de imunofluorescência e de PCR para marcadores específicos de células endoteliais. A expressão das moléculas VE-Caderina, vWF e VEGFR2 foi comprovada após 7 dias da indução da diferenciação endotelial e permaneceu após 14 dias.

A VE-cadareina é uma glicoproteína de superfície celular constitutivamente expressa no endotélio vascular. Essa glicoproteína promove a adesão entre células endoteliais através de interações  $Ca^{2+}$  dependentes e regula a permeabilidade vascular (Menon, Ghartey *et al.*, 2006; Vestweber, 2008).

A inativação do gene da VE-Caderina provoca alterações graves no desenvolvimento vascular. Em animais mutantes, as células endoteliais são capazes de formar um plexo vascular primitivo. No entanto, na ausência da VE-Caderina, a vasculatura não sofre remodelação e os vasos tendem a regredir até a falência, levando à morte dos embriões (Gory-Faure, Prandini *et al.*, 1999). Sendo assim, a presença da VE-Caderina em células endoteliais é essencial para a o contato entre as células e para a formação de uma rede vascular madura e estável.

Já o vWF é uma glicoproteína plasmática, sintetizada por células endoteliais e importante na manutenção da hemostasia, atuando na adesão de plaquetas à parede de vasos que sofreram lesão e sendo a proteína transportadora e estabilizadora do fator VIII, essencial no processo de coagulação. Além disso, o vWF pode auxiliar no ancoramento de células endoteliais à MEC. Defeitos quali ou quantitativos na expressão do vWF podem levar à diátese hemorrágica grave (De Wit e Van Mourik, 2001). Diante disso, os resultados obtidos demonstram que houve o comprometimento das hASC na diferenciação endotelial, uma vez que, além da expressão de VE-Caderina, houve a expressão de vWF ,sendo que ambos são

---

amplamente utilizados como marcadores na diferenciação endotelial (Oswald, Boxberger *et al.*, 2004; Kuwana, Okazaki *et al.*, 2006; Zhang, Baxter *et al.*, 2009).

Em seguida, avaliou-se a expressão do receptor 2 do VEGF. Sabe-se que esse receptor é considerado o marcador inicial da diferenciação endotelial e, é também utilizado para identificar células endoteliais progenitoras (Yamaguchi, Dumont *et al.*, 1993; Young, Vaughan *et al.*, 2007). Uma das principais funções do VEGFR2 é o estímulo da proliferação e sobrevivência de células endoteliais e promoção da angiogênese (Gerber, Mcmurtrey *et al.*, 1998). Shalaby *et al.* (1995) mostraram que a inativação de genes que codificam o VEGFR2 em camundongos levou à morte embrionária devido à falta de vasculogênese e à escassez no desenvolvimento de células hematopoiéticas. Esses camundongos não desenvolveram a vasculatura do saco vitelino, indicando que o VEGFR2 desempenha um papel essencial no crescimento e diferenciação de células progenitoras endotelial.

A ativação de VEGFR2 estimula a migração de células endoteliais durante a embriogênese e na fase adulta. Dessa forma, a presença do receptor VEGFR2 nas células obtidas após a diferenciação endotelial juntamente com a expressão de VE-Caderina e vWF, podem auxiliar na resposta dessas células a estímulos angiogênicos *in vivo* e na formação de uma rede vascular funcional. Além disso, foi demonstrado que essas células são biocompatíveis com a membrana de PHB/PHB-HV e que essa membrana é biocompatível *in vivo*, o que viabiliza a proposta do grupo de utilizar uma membrana associada a células endoteliais para acelerar a vascularização de implantes de matrizes tridimensionais.

## *6. Conclusões*

---

O presente trabalho demonstrou que a membrana de nanofibras, baseada em PHB/PHB-HV, apresenta biocompatibilidade com as células-tronco isoladas do tecido adiposo humano, favorecendo a adesão, a viabilidade e a proliferação dessas células. Ao serem implantadas *in vivo*, a membrana de PHB/PHB-HV não induziu uma resposta inflamatória intensa e não afetou a função dos tecidos adjacentes ao implante, possibilitando sua utilização *in vivo*. Além disso, quando induzidas à diferenciação endotelial, as hASC passaram a expressar marcadores específicos de células endoteliais, tornando possível a utilização dessas células diferenciadas, juntamente com a membrana de PHB/PHB-HV, para auxiliar a vascularização de matrizes tridimensionais.

## *7. Perspectivas*

---

Diante dos resultados obtidos, podem-se traçar algumas perspectivas:

- 1- Avaliar a diferença na expressão gênica entre células-tronco derivadas do tecido adiposo humano indiferenciadas e induzidas à diferenciação endotelial, através da técnica de hibridização subtrativa (RaSH).
- 2- Avaliar o potencial angiogênico das membranas contendo células endoteliais para auxiliar a vascularização de matrizes tridimensionais para regeneração de tecido ósseo.



## *8. Referências Bibliográficas*

---

Anderson, J. M., A. Rodriguez, *et al.* Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol, v.20, n.2, Apr, p.86-100. 2008.

Andersson, H. e A. Van Den Berg. Microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities. Lab Chip, v.4, n.2, Apr, p.98-103. 2004.

Anghileri, E., S. Marconi, *et al.* Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev, v.17, n.5, Oct, p.909-16. 2008.

Araujo, J. V., A. Martins, *et al.* Surface controlled biomimetic coating of polycaprolactone nanofiber meshes to be used as bone extracellular matrix analogues. J Biomater Sci Polym Ed, v.19, n.10, p.1261-78. 2008.

Arosarena, O. Tissue engineering. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, v.13, n.4, Aug, p.233-41. 2005.

Aurich, H., M. Sgodda, *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. Gut, v.58, n.4, Apr, p.570-81. 2009.

Aust, L., B. Devlin, *et al.* Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. Cytotherapy, v.6, n.1, p.7-14. 2004.

Awad, H. A., M. Q. Wickham, *et al.* Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials, v.25, n.16, Jul, p.3211-22. 2004.

Breyner, N.M., R.C. Hell, *et al.* Effect of a Three-Dimensional Chitosan Porous Scaffold on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes. Cells Tissues Organs, v.191, p.119-128. 2010.

Cao, Y., Z. Sun, *et al.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. Biochem Biophys Res Commun, v.332, n.2, Jul 1, p.370-9. 2005.

Carano, R. A. e E. H. Filvaroff. Angiogenesis and bone repair. Drug Discov Today, v.8, n.21, Nov 1, p.980-9. 2003.

Cassell, O. C., S. O. Hofer, *et al.* Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. Br J Plast Surg, v.55, n.8, Dec, p.603-10. 2002.

Chen, G. Q. e Q. Wu. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials, v.26, n.33, Nov, p.6565-78. 2005.

Chen, R. R., E. A. Silva, *et al.* Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation. Pharm Res, v.24, n.2, Feb, p.258-64. 2007.

Cheung, H.Y., K.T. Lau, *et al.* A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. Composites: Part B, v. 38. p.291-300. 2007.

Choi, J. e S. Y. Lee. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. Biotechnol Bioeng, v.62, n.5, Mar 5, p.546-53. 1999.

Choi, Y. S., S. M. Cha, *et al.* Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. Biochem Biophys Res Commun, v.345, n.2, Jun 30, p.631-7. 2006.

Cowan, C. M., Y. Y. Shi, *et al.* Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Nat Biotechnol, v.22, n.5, May, p.560-7. 2004.

Da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, *et al.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci, v.119, n.Pt 11, Jun 1, p.2204-13. 2006.

De Coppi, P., G. Bartsch, Jr., *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol, v.25, n.1, Jan, p.100-6. 2007.

De Wit, T. R. e J. A. Van Mourik. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. Best Pract Res Clin Haematol, v.14, n.2, Jun, p.241-55. 2001.

Deckers, M. M., R. L. Van Bezooijen, *et al.* Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology, v.143, n.4, Apr, p.1545-53. 2002.

Dominici, M., K. Le Blanc, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, v.8, n.4, p.315-7. 2006.

Druecke, D., S. Langer, *et al.* Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. J Biomed Mater Res A, v.68, n.1, Jan 1, p.10-8. 2004.

Eglitis, M. A. e E. Mezey. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.8, Apr 15, p.4080-5. 1997.

Elbahloul, Y. e A. Steinbuchel. Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonas putida* GPo1 and a simplified downstream process. Appl Environ Microbiol, v.75, n.3, Feb, p.643-51. 2009.

Fauza, D. Amniotic fluid and placental stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v.18, n.6, Dec, p.877-91. 2004.

Fischbach, G. D. e R. L. Fischbach. Stem cells: science, policy, and ethics. J Clin Invest, v.114, n.10, Nov, p.1364-70. 2004.

Flynn, L. E., G. D. Prestwich, *et al.* Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds. Biomaterials, v.29, n.12, Apr, p.1862-71. 2008.

Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, *et al.* The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet, v.3, n.4, Oct, p.393-403. 1970.

Gabbay, J. S., J. B. Heller, *et al.* Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix. Ann Plast Surg, v.57, n.1, Jul, p.89-93. 2006.

Gavrilescu, M. e Y. Chisti. Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. Biotechnol Adv, v.23, n.7-8, Nov, p.471-99. 2005.

Gepstein, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. Circ Res, v.91, n.10, Nov 15, p.866-76. 2002.

Gerber, H. P., A. McMurtrey, *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem, v.273, n.46, Nov 13, p.30336-43. 1998.

Gokhale, P. J. e P. W. Andrews. Human embryonic stem cells: 10 years on. Lab Invest, v.89, n.3, Mar, p.259-62. 2009.

Gomes, M. E. e R. L. Reis. Tissue engineering: key elements and some trends. Macromol Biosci, v.4, n.8, Aug 9, p.737-42. 2004.

Gory-Faure, S., M. H. Prandini, *et al.* Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. Development, v.126, n.10, May, p.2093-102. 1999.

Guo, H., J. Su, *et al.* Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. Acta Biomater, v.5, n.1, Jan, p.268-78. 2009.

Gupta, D., J. Venugopal, *et al.* Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts. Biomaterials, v.30, n.11, Apr, p.2085-94. 2009.

Haimi, S., N. Suuriniemi, *et al.* Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds. Tissue Eng Part A, v.15, n.7, Jul, p.1473-80. 2009.

Hattori, H., K. Masuoka, *et al.* Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, v.76, n.1, Jan, p.230-9. 2006.

Hess, D. C., T. Abe, *et al.* Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. Exp Neurol, v.186, n.2, Apr, p.134-44. 2004.

Heydarkhan-Hagvall, S., K. Schenke-Layland, *et al.* Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. Cells Tissues Organs, v.187, n.4, p.263-74. 2008.

Hipp, J. e A. Atala. Sources of stem cells for regenerative medicine. Stem Cell Rev, v.4, n.1, Spring, p.3-11. 2008.

Horowitz, J. R., A. Rivard, *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.17, n.11, Nov, p.2793-800. 1997.

Huebsch, N. e D. J. Mooney. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. Nature, v.462, n.7272, Nov 26, p.426-32. 2009.

Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. J R Soc Interface, v.3, n.10, Oct 22, p.589-601. 2006.

Jain, R. K., P. Au, *et al.* Engineering vascularized tissue. Nat Biotechnol, v.23, n.7, Jul, p.821-3. 2005.

Janune DDJ; Cestari TM; De Oliveira RC; Taga EM; Taga R e Granjeiro JM. Avaliação da resposta tecidual ao implante de osso bovino misto medular em subcutâneo de ratos. Innovations implant journal, v.2, p.21-28. 2006.

Jendrossek, D. e R. Handrick. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annu Rev Microbiol, v.56, p.403-32. 2002.

Kapritchkoff, F. M., A. P. Viotti, *et al.* Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. J Biotechnol, v.122, n.4, Apr 20, p.453-62. 2006.

Kawamoto, H. e Y. Katsura. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. Trends Immunol, v.30, n.5, May, p.193-200. 2009.

Khanna, S. e A. K. Srivastava. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. J Ind Microbiol Biotechnol, v.34, n.6, Jun, p.457-61. 2007.

- Kim, B. S., C. E. Baez, *et al.* Biomaterials for tissue engineering. World J Urol, v.18, n.1, Feb, p.2-9. 2000.
- Kim, B. S. e D. J. Mooney. Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure. J Biomed Mater Res, v.41, n.2, Aug, p.322-32. 1998.
- Kneser, U., D. J. Schaefer, *et al.* Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. J Cell Mol Med, v.10, n.1, Jan-Mar, p.7-19. 2006.
- Kose, G. T., H. Kenar, *et al.* Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. Biomaterials, v.24, n.11, May, p.1949-58. 2003.
- Krause, D. S., M. J. Fackler, *et al.* CD34: structure, biology, and clinical utility. Blood, v.87, n.1, Jan 1, p.1-13. 1996.
- Kumarasuriyar, A., R. A. Jackson, *et al.* Poly(beta-hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate) supports in vitro osteogenesis. Tissue Eng, v.11, n.7-8, Jul-Aug, p.1281-95. 2005.
- Kuwana, M., Y. Okazaki, *et al.* Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells. Stem Cells, v.24, n.12, Dec, p.2733-43. 2006.
- Lagasse, E., H. Connors, *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med, v.6, n.11, Nov, p.1229-34. 2000.
- Langer, R. e J. P. Vacanti. Tissue engineering. Science, v.260, n.5110, May 14, p.920-6. 1993.
- Laschke, M. W., Y. Harder, *et al.* Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. Tissue Eng, v.12, n.8, Aug, p.2093-104. 2006.
- Lavik, E. e R. Langer. Tissue engineering: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol, v.65, n.1, Jul, p.1-8. 2004.
- Lee, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol Bioeng, v.49, n.1, Jan 5, p.1-14. 1996.
- Lee, S. Y., J. Choi, *et al.* Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol, v.65, n.6, Jun, p.2762-4. 1999.
- Lee, W. H., C. Y. Loo, *et al.* Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. Bioresour Technol, v.99, n.15, Oct, p.6844-51. 2008.
- Levenberg, S. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. Curr Opin Biotechnol, v.16, n.5, Oct, p.516-23. 2005.

- Li, L. e Y. L. Hsieh. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. Carbohydr Res, v.341, n.3, Feb 27, p.374-81. 2006.
- Lin, Y., L. Liu, *et al.* Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein. Mol Cell Biochem, v.291, n.1-2, Oct, p.1-10. 2006.
- Liu, C., W. Wang, *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite. J Endod, v.23, n.8, Aug, p.490-3. 1997.
- Lo, K. C., W. W. Chuang, *et al.* Stem cell research: the facts, the myths and the promises. J Urol, v.170, n.6 Pt 1, Dec, p.2453-8. 2003.
- Machado, C. B., J. M. Ventura, *et al.* 3D chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Biomed Mater, v.2, n.2, Jun, p.124-31. 2007.
- Maes, C., P. Carmeliet, *et al.* Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. Mech Dev, v.111, n.1-2, Feb, p.61-73. 2002.
- Martins, A., J. V. Araujo, *et al.* Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. Nanomed, v.2, n.6, Dec, p.929-42. 2007.
- Matthews, J. A., G. E. Wnek, *et al.* Electrospinning of collagen nanofibers. Biomacromolecules, v.3, n.2, Mar-Apr, p.232-8. 2002.
- Mccullen, S. D., D. R. Stevens, *et al.* Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. Int J Nanomedicine, v.2, n.2, p.253-63. 2007.
- Menon, C., A. Ghartey, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha damages tumor blood vessel integrity by targeting VE-cadherin. Ann Surg, v.244, n.5, Nov, p.781-91. 2006.
- Misra, S. K., S. P. Valappil, *et al.* Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. Biomacromolecules, v.7, n.8, Aug, p.2249-58. 2006.
- Mitomo, H., T. Takahashi, *et al.* Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Burkholderia cepacia* D1. Int J Biol Macromol, v.24, n.4, May, p.311-8. 1999.
- Mizuno, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. J Nippon Med Sch, v.76, n.2, Apr, p.56-66. 2009.
- Mizuno, H., Y. Itoi, *et al.* In vivo adipose tissue regeneration by adipose-derived stromal cells isolated from GFP transgenic mice. Cells Tissues Organs, v.187, n.3, p.177-85. 2008.

Montanaro, L., M. Cervellati, *et al.* Promising in vitro performances of a new nickel-free stainless steel. J Mater Sci Mater Med, v.17, n.3, Mar, p.267-75. 2006.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

Moss, D. W. Perspectives in alkaline phosphatase research. Clin Chem, v.38, n.12, Dec, p.2486-92. 1992.

Mountford, J. C. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. Transfus Med, v.18, n.1, Feb, p.1-12. 2008.

Moutos, F. e F. Guilak. Functional properties of cell-seeded three-dimensionally woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A, Nov 10. 2009.

Nomi, M., A. Atala, *et al.* Principals of neovascularization for tissue engineering. Mol Aspects Med, v.23, n.6, Dec, p.463-83. 2002.

Nussbaum, J., E. Minami, *et al.* Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. FASEB J, v.21, n.7, May, p.1345-57. 2007.

O'connor, M. D., M. D. Kardel, *et al.* Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. Stem Cells, v.26, n.5, May, p.1109-16. 2008.

Onuki, Y., U. Bhardwaj, *et al.* A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. J Diabetes Sci Technol, v.2, n.6, Nov, p.1003-15. 2008.

Oréfice, Rodrigo Lambert. Biomateriais; fundamentos e aplicações/ Rodrigo Lambert Oréfice, Marivalda de Magalhães Pereira, Herman Sander Mansur. – Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

Oswald, J., S. Boxberger, *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells, v.22, n.3, p.377-84. 2004.

Page, W. J. e A. Cornish. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly-beta-Hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol, v.59, n.12, Dec, p.4236-4244. 1993.

Pereira, L.V. The importance of the use of stem cells for public health. Ciências & Saúde Coletiva, v.13, p.7-14. 2008.



Pinho, E. D., A. Martins, *et al.* Degradable particulate composite reinforced with nanofibres for biomedical applications. Acta Biomater, v.5, n.4, May, p.1104-14. 2009.

Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. Circulation, v.109, n.5, Feb 10, p.656-63. 2004.

Qu, X. H., Q. Wu, *et al.* In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. Biomaterials, v.27, n.19, Jul, p.3540-8. 2006.

Rada, T., R. L. Reis, *et al.* Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering. Tissue Eng Part B Rev, Jan 28. 2009.

Rathbone, S., P. Furrer, *et al.* Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. J Biomed Mater Res A, Nov 12. 2009.

Rentsch, C., B. Rentsch, *et al.* Evaluation of the osteogenic potential and vascularization of 3D poly(3)hydroxybutyrate scaffolds subcutaneously implanted in nude rats. J Biomed Mater Res A, v.92, n.1, Jan, p.185-95. 2010.

Ria, R., C. Piccoli, *et al.* Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. Clin Cancer Res, v.14, n.6, Mar 15, p.1678-85. 2008.

Riekstina, U., I. Cakstina, *et al.* Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. Stem Cell Rev Rep, Sep 22. 2009.

Ringe, J., C. Kaps, *et al.* Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. Naturwissenschaften, v.89, n.8, Aug, p.338-51. 2002.

Rodriguez, A. M., C. Elabd, *et al.* The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Biochimie, v.87, n.1, Jan, p.125-8. 2005.

Romanov, Y. A., A. N. Darevskaya, *et al.* Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. Bull Exp Biol Med, v.140, n.1, Jul, p.138-43. 2005.

Rouwkema, J., N. C. Rivron, *et al.* Vascularization in tissue engineering. Trends Biotechnol, v.26, n.8, Aug, p.434-41. 2008.

Sabatini, F., L. Petecchia, *et al.* Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. Lab Invest, v.85, n.8, Aug, p.962-71. 2005.

Sachlos, E. e J. T. Czernuszka. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. Eur Cell Mater, v.5, Jun 30, p.29-39; discussion 39-40. 2003.

Salgado, A. J., O. P. Coutinho, *et al.* Bone tissue engineering: state of the art and future trends. Macromol Biosci, v.4, n.8, Aug 9, p.743-65. 2004.

Santos, M. I. e R. L. Reis. Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. Macromol Biosci, v.10, n.1, Aug 17, p.12-27. 2009.

Seal, B.L., T.C. Otero, *et al.* Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. Materials Science and Engineering, v.34, p.147-230. 2001.

Schlechta, B., D. Wiedemann, *et al.* Ex-Vivo Expanded Umbilical Cord Blood Stem Cells Retain Capacity for Myocardial Regeneration. Circ J, Nov 19. 2009.

Serrano, M. C., M. T. Portoles, *et al.* In vitro positive biocompatibility evaluation of glass-glass ceramic thermoseeds for hyperthermic treatment of bone tumors. Tissue Eng Part A, v.14, n.5, May, p.617-27. 2008.

Sevastianov, V. I., N. V. Perova, *et al.* Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. J Biomater Sci Polym Ed, v.14, n.10, p.1029-42. 2003.

Shalaby, F., J. Rossant, *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature, v.376, n.6535, Jul 6, p.62-6. 1995.

Shields, K. J., M. J. Beckman, *et al.* Mechanical properties and cellular proliferation of electrospun collagen type II. Tissue Eng, v.10, n.9-10, Sep-Oct, p.1510-7. 2004.

Shishatskaya, E. I., T. G. Volova, *et al.* Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. J Mater Sci Mater Med, v.15, n.6, Jun, p.719-28. 2004.

Singh, M., S. K. Patel, *et al.* Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates. Microb Cell Fact, v.8, p.38. 2009.

Smith, M. J., K. L. White, Jr., *et al.* In vitro evaluations of innate and acquired immune responses to electrospun polydioxanone-elastin blends. Biomaterials, v.30, n.2, Jan, p.149-59. 2009.

Soliman, S., S. Pagliari, *et al.* Multiscale three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering via multimodal electrospinning. Acta Biomater, Nov 1. 2009.

Songchotikunpan, P., J. Tattiyakul, *et al.* Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. Int J Biol Macromol, v.42, n.3, Apr 1, p.247-55. 2008.

Squiao, C.R, G.M.F. Aragão. Estratégias de Cultivos para Produção dos Plásticos Biodegradáveis Poli(3-hidroxiacetato) e Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) Quim. Nova, v. 27, No. 4, p.615-622. 2004.

Strem, B. M., K. C. Hicok, *et al.* Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J Med, v.54, n.3, Sep, p.132-41. 2005.

Strem, B. M., M. Zhu, *et al.* Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. Cytotherapy, v.7, n.3, p.282-91. 2005.

Suwantong, O., S. Waleetorncheepsawat, *et al.* In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. Int J Biol Macromol, v.40, n.3, Feb 20, p.217-23. 2007.

Tabata, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. J R Soc Interface, v.6 Suppl 3, Jun 6, p.S311-24. 2009.

Takahashi, K. e S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, v.126, n.4, Aug 25, p.663-76. 2006.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, v.282, n.5391, Nov 6, p.1145-7. 1998.

Timper, K., D. Seboek, *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. Biochem Biophys Res Commun, v.341, n.4, Mar 24, p.1135-40. 2006.

Toma, J. G., M. Akhavan, *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat Cell Biol, v.3, n.9, Sep, p.778-84. 2001.

Tang, X. J. e Q. Y. Wu. Mesenchymal stem cellular adhesion and cytotoxicity study of random biopolyester scaffolds for tissue engineering. J Mater Sci Mater Med, v.17, n.7, Jul, p.627-32. 2006.

Vajanto, I., T. T. Rissanen, *et al.* Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. J Gene Med, v.4, n.4, Jul-Aug, p.371-80. 2002.

Valappil, S. P., S. K. Misra, *et al.* Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: an overview of animal testing and in vivo responses. Expert Rev Med Devices, v.3, n.6, Nov, p.853-68. 2006.

Valerio, P., M. M. Pereira, *et al.* The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. Biomaterials, v.25, n.15, Jul, p.2941-8. 2004.

- Vasita, R. e D. S. Katti. Nanofibers and their applications in tissue engineering. Int J Nanomedicine, v.1, n.1, p.15-30. 2006.
- Verlinden, R. A., D. J. Hill, *et al.* Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. J Appl Microbiol, v.102, n.6, Jun, p.1437-49. 2007.
- Vestweber, D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.28, n.2, Feb, p.223-32. 2008.
- Von Heimburg, D., S. Zachariah, *et al.* Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. Biomaterials, v.22, n.5, Mar, p.429-38. 2001.
- Vunjak-Novakovic, G. e L. E. Freed. Culture of organized cell communities. Adv Drug Deliv Rev, v.33, n.1-2, Aug 3, p.15-30. 1998.
- Wagner, W., F. Wein, *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol, v.33, n.11, Nov, p.1402-16. 2005.
- Wei, Y., Y. Hu, *et al.* A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells. J Orthop Res, v.26, n.1, Jan, p.27-33. 2008.
- Williams DF. Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier; 1987.
- Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials, v.29, n.20, Jul, p.2941-53. 2008.
- Yamaguchi, T. P., D. J. Dumont, *et al.* flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. Development, v.118, n.2, Jun, p.489-98. 1993.
- Yang, S., K. F. Leong, *et al.* The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Eng, v.7, n.6, Dec, p.679-89. 2001.
- Ye, C., P. Hu, *et al.* PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. Biomaterials, v.30, n.26, Sep, p.4401-6. 2009.
- Young, P. P., D. E. Vaughan, *et al.* Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. Prog Cardiovasc Dis, v.49, n.6, May-Jun, p.421-9. 2007.
- Zhang, P., J. Baxter, *et al.* Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. Stem Cells Dev, v.18, n.9, Nov, p.1299-308. 2009.

Zhao, K., Y. Deng, *et al.* Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. Biomaterials, v.24, n.6, Mar, p.1041-5. 2003.

Zinn, M., B. Witholt, *et al.* Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv Drug Deliv Rev, v.53, n.1, Dec 3, p.5-21. 2001.

Zisch, A. H., M. P. Lutolf, *et al.* Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. Cardiovasc Pathol, v.12, n.6, Nov-Dec, p.295-310. 2003.

Zuk, P. A., M. Zhu, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng, v.7, n.2, Apr, p.211-28. 2001.