

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Dissertação de Mestrado

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
PRELIMINAR DE CITOTOXICIDADE DA MATRIZ
POROSA DE NANOCOMPÓSITO
BIODEGRADÁVEL**

Autora: Regina Coeli Moreira Dias
Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfica
Co-orientador: Prof. Alfredo M. Góes

Março/2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Regina Coeli Moreira Dias

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE
CITOTOXICIDADE DA MATRIZ POROSA DE NANOCOMPÓSITO
BIODEGRADÁVEL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais**

Área de concentração: Biomateriais
Orietador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice
Co-orientador: Prof. Alfredo M. Góes

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
2006

A meus pais, pelo amor incondicional,
base sólida para minha formação.

Às minhas filhas Paula e Carla, orgulho e
alegria de minha vida.

Ao elo universal familiar que proporciona a
absorção e continuidade do saber.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço ao Prof. Rodrigo Lambert Oréfice, meu orientador, pela confiança, dedicação e paciência.

Agradeço ao Prof. Alfredo Góes, meu co-orientador, exemplo de profissionalismo, disponibilidade e, sobretudo, o carinho com que me acolheu.

Agradeço à Eliane Ayres, pela doação profissional e pessoal, sem a qual seria impossível realizar este trabalho.

Agradeço à Ana Paula que, com sua sensibilidade, orientação e competência, contribuiu de forma efetiva para a realização deste trabalho.

Agradeço à Patrícia Valério pela inestimável ajuda, disponibilidade e amizade.

Agradeço à Carolina, pelo suporte de conhecimento que me proporcionou.

Agradeço ao Fagner, pelo companheirismo e dedicação que me disponibilizou.

Agradeço ao Prof. Marcelo Vidigal, pela cooperação na manipulação de imagens.

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas - CPGEM.

À minha filha Paula, pelo trabalho em Photo Shop.

Aos colegas dos laboratórios de Biomateriais e Imunologia, pela convivência e amizade.

Aos técnicos, em especial à Denise.

À Cida e ao Nelson, pelo suporte administrativo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE NOTAÇÕES	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO GERAL	18
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. HISTÓRICO	19
3.2. REQUISITOS FUNDAMENTAIS PARA SÍNTESE DE BIOMATERIAIS	22
3.3. MATERIAIS POLIMÉRICOS	25
3.3.1. Polímeros sintéticos não degradáveis	25
3.3.1.1. Poli(álcool vinílico) (PVA)	25
3.3.1.2. Poliacrilato	26
3.3.1.3. Poli N-Isopropilacrilamida	27
3.3.1.4. Polietileno	27
3.3.2. Polímeros naturais degradáveis	27
3.3.2.1. Polissacarídeos	27
3.3.2.2. Polipeptídeos	28
3.3.3. Polímeros sintéticos biodegradáveis	30
3.3.3.1. Característica da estrutura x proliferação celular	32
3.3.4. Polímeros com cadeia contendo grupos hidrolisáveis	38
3.3.4.1. Poliésteres	39
3.3.4.2. Poliuretanos	40
3.3.5. Degradação dos polímeros	41
3.3.6. Efeitos da modificação química da estrutura e da superfície do polímero	44
3.3.7. Desenho das matrizes poliméricas	47
3.4. METABOLISMO ÓSSEO	48
3.4.1. Composição e diversidade da ECM /célula	50
3.4.2. Mecanismo de transdução	54
3.4.3. Interface biomaterial /célula	57
3.5. CULTIVO DE CÉLULAS	62
3.6. VIABILIDADE	70

3.7. ESTERILIZAÇÃO	71
4. MATERIAIS	72
4.1. MATERIAL PESQUISADO	72
4.2. OUTROS MATERIAIS E REAGENTES PARA ENSAIOS <i>IN VITRO</i> ...	74
4.3. MATERIAL PARA ENSAIO <i>IN VIVO</i>	74
5. METODOLOGIA	75
5.1. SÍNTESE DE POLIURETANO	75
5.2. IMOBILIZAÇÃO DO GRGDS E SC	77
5.3. ADSORÇÃO DO GRGDS /SC	78
5.4. ESTERILIZAÇÃO	78
5.5. CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ DE PU	79
5.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	79
5.5.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	79
5.6. CULTIVO DE OSTEOBLASTO	80
5.6.1. Isolamento de cultura	80
5.6.2. Repicagem, contagem e plaqueamento	81
5.6.3. Ensaio <i>in vivo</i>	82
5.6.4. Ensaio de MTT	82
5.6.5. Ensaio de fosfatase alcalina	83
5.6.6. Ensaio de colágeno	84
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
6.1. MEV	85
6.2. DIFRAÇÃO DE RX	87
6.3. ATR - FTIR	90
6.4. CULTURA <i>IN VITRO</i>	94
6.5. ENSAIO <i>IN VIVO</i>	98
7. CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Interação das áreas biológica, engenharia e ciência dos materiais	23
Figura 3.2	Estrutura de alguns polímeros não degradáveis	26
Figura 3.3	Estrutura de polímeros naturais degradáveis	30
Figura 3.4	Estrutura de polímeros sintéticos degradáveis	31
Figura 3.5	Gráfico de número células x dias de cultura	35
Figura 3.6	Gráfico ALPase x dias de cultura	36
Figura 3.7a	Profundidade de penetração	37
Figura 3.7b	Mineralização	37
Figura 3.7c	Diminuição do peso molecular	38
Figura 3.8	Polímeros de cadeia de grupos hidrolizáveis	39
Figura 3.9	Mecanismo de hidrólise da poli(ϵ -caprolactona)	40
Figura 3.10	Mecanismo de erosão de polímeros	42
Figura 3.11	Tipos de compósitos	46
Figura 3.12	Integrinas e sua composição com seus ligantes extracelulares	52
Figura 3.13	Representação das proteínas da célula envolvidas na adesão celular no biomaterial	53
Figura 3.14	Modelo de transdução de sinais na célula <i>in vivo</i>	56
Figura 3.15	Adesão e espalhamento de osteoblastos na superfície do material	58
Figura 3.16	Efeito oposto das integrinas ligantes.....	59
Figura 3.17	Reação da RGD via N terminal com diferentes grupos de polímeros	60
Figura 3.18	Seqüência da RGD, sua fórmula molecular e nomenclatura	60
Figura 3.19	Representação do sítio da RGD	61
Figura 3.20	Modelo de diferenciação osteogênica	63
Figura 3.21	Relação entre proteínas de expressão e diversidade de fenótipos expressos	67

Figura 3.22	Formação óssea sobre a superfície do implante	68
Figura 3.23	Seqüência dos fatores que induzem a aglutinação de moléculas na superfície do implante	69
Figura 5.1	Estrutura do poliuretano e seus intermediários	76
Figura 6.1a	Estrutura em MEV da matriz de poliuretano	85
Figura 6.1b	Estrutura em MEV da matriz de poliuretano	85
Figura 6.1c	Estrutura em MEV da matriz de poliuretano	85
Figura 6.2	Poros com colonização de células	86
Figura 6.3	Rede de fibras e células agregadas ao material	86
Figura 6.4	Fibras revestindo o material polimérico	86
Figura 6.5	Um apêndice do PU todo envolvido por células	86
Figura 6.6	Tecido necrótico e hemácias	87
Figura 6.7	Poros com tecido necrótico em amostras tratadas	87
Figura 6.8	Poros com tecido necrótico em amostras tratadas	87
Figura 6.9	Poros em escala aumentada com tecido degenerado em seu interior	87
Figura 6.10	Estrutura molecular amorfa característica do poliuretano	88
Figura 6.11	Argila com bandas características de sua estrutura cristalina	89
Figura 6.12	Maior cristalização da estrutura amorfa do polímero após a incorporação do MMT	89
Figura 6.13	Região de $2\theta < 10^\circ$ ampliada	90
Figura 6.14	FTIR de PU com argila e sem argila com bandas diferenciadas em 1725cm^{-1} , 1640cm^{-1} , 1150cm^{-1} e 1040cm^{-1}	91
Figura 6.15	FTIR. Ampliação da região de bandas em 1150cm^{-1} entre PU e PU + argila	92
Figura 6.16	FTIR de PU + GRGDS sugerindo diferenças entre as estruturas em 1110cm^{-1}	93
Figura 6.17	FTIR apresentando diferenças de bandas na região de 1150cm^{-1}	93
Figura 6.18	FTIR apresentando alargamento de banda em $1150, 1380\text{cm}^{-1}$	94
Figura 6.19	Teste de viabilidade do PU em osteoblastos	95

Figura 6.20	Produção de colágeno pelo controle e PU	95
Figura 6.21	Osteoblastos em presença do biomaterial.....	97
Figura 6.22	Osteoblastos do controle	97
Figura 6.23	Ensaio de MTT em cultivo de biomaterial	97
Figura 6.24	Ensaio do MTT da cultura do controle	97
Figura 6.25	Ensaio de FA do biomaterial	97
Figura 6.26	Ensaio de FA do controle	97
Figura 6.27	Osteoblastos degenerados sobre o material	98
Figura 6.28	Ensaio de FA em osteoblastos degenerados	98
Figura 6.29	Tecido organizado sobre o PU	99
Figura 6.30	Tecido com grande processo de vaso angiogênese e hemácias ...	99
Figura 6.31	Tecido organizado com vaso e hemácias	99
Figura 6.32	Tecido necrótico sobre o material tratado quimicamente	99
Figura 6.33	Tecido organizado sobre o poliuretano	100
Figura 6.34	Tecido com grande processo de angiogênese	100
Figura 6.35	Tecido organizado com presença de vaso e hemácia	100
Figura 6.36	Tecido necrótico sobre o material tratado	100

LISTA DE TABELAS

Tabela III.1	Engenharia de tecido	64
Tabela III.2	Ação sinérgica para diferenciação de tecido específico.	65
Tabela IV.1	Estrutura química dos reagentes utilizada na preparação do pré-polímero	73

LISTA DE NOTAÇÕES

3D - tridimensional
ALPase - atividade da fosfatase alcalina
BCIP - NBT - indolyphosphato - nitroblue tetrazolium
Bd.2 - proteína anti-apoptótica
BMP - proteína formadora de osso
BMU- unidade de remodelamento ósseo
BrdU - bromodeoxiuridina
CDI - carbonil diimidazol
CO - colágeno
DCC - dialonexil-carbodiimida
ECM - matriz extracelular
EDC - dimetilamino propil carbodiimida
ESCA - espectroscopia foto eletrônica de RX
FAK - quinase de adesão focal
FBS - soro fetal bovino
FN - fibronectina
FG - fibrinogênio
GAG - glicosaminoglicana
GRGDS - glicina-arginina-glicina-ácido aspártico-serina
GTPase - guanidina trifosfatase
HA - hidroxiapatita
HCl - ácido clorídrico
HDI - hexametileno diisocianato
HFN7 1 - Fator inibidor de apoptose
ICAM 1 - molécula de adesão intercelular
IGF - fator de crescimento ligado à insulina
IL - interleucina
IPDI - isoforona diisocianato
LCST - temperatura crítica inferior de solução
LDL - lisina di- isocianato
LN - laminina
MAPK - proteína quinase mitogênica ativadora
MEV - microscopia eletrônica de varredura
MMT - montmorilonita

MSC - células mensequimais indiferenciadas
MTT - ensaio de redução do sal tetrazolio
N₂ - nitrogênio
NCP - proteína não colágena
OCN -osteocalcina
OSP - osteopontina
PBS - Tampão fosfato salino
PCL - poli(ε- caprolactona)
PCR - reação da cadeia de polimerase
PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas
PE - polietileno
PEMA/THFMA - poli(metacrilato de etila)/ tetrahidrofurfuril metacrilato
PGA - poli ácido glicólico
PGTMC - poli (glicolídeo-co-trimethileno carbono)
PH - concentração hidrogênio iônica
PHEMA - poli(metacrilato de 2-hidroxietila)
PIP - fosfatidil inositol
PLA - poli(ácido láctico)
PLGA - poli(ácido láctico glicólico)
PMMA - poli(metacrilato de metila)
PNIPAAm - poli (nicopropilacrilamida)
PP - polipropileno
PTH - hormônio da paratireóide
PVA - poli(álcool vinílico)
REDV - arginina - ácido glutâmico - ácido aspártico, valina
RGD - arginina-glicina - ácido aspártico
RPM I - meio de cultura.
SC – sulfato de condroitina
SDS - sódio dodecil sulfato
TCPS - cultura de tecido em poliestireno
TdT - deoxinucleotidil
TGF - fator de transformação e crescimento
Ti - titânio
TSP - trombospodin
VN - vitronectina
VCAM - molécula de adesão de célula vascular

VWF - Von Willebrand fator

WSC - N - cyclohexyl - N` - (2 - morpholinoethyl) - carbodiimida methyl - p - tolueno - sulfonado

RESUMO

Biomateriais para aplicações ligadas à Engenharia de Tecidos usualmente requerem uma série de características: presença de poros grandes e com elevada interconectividade, biodegradabilidade, elevadas propriedades mecânicas, bioatividade, citocompatibilidade, entre outras. Neste trabalho, uma nova matriz para a Engenharia de Tecidos foi desenvolvida e preliminarmente testada *in vitro* e *in vivo*. Este novo sistema consistiu em uma matriz de poliuretano biodegradável (derivado de policaprolactona) contendo nanopartículas derivadas de argilas. O material foi avaliado por FTIR, difração de raios-x e microscopia eletrônica. Testes *in vitro* foram realizados através do estudo da colonização do material por osteoblastos via uso de ensaios como: tetrazolium (MTT), expressão de colágeno e fosfatase alcalina. As matrizes obtidas foram ainda implantadas em camundongos e foi realizada análise histológica em amostras removidas após 14 e 29 dias. Os resultados mostraram que a porosidade, obtida através da reação do poliuretano com água, foi bem sucedida em produzir poros conectados e com tamanhos entre 184µm - 327µm. Espectros de FTIR mostraram a formação com sucesso de uma rede de poliuretano contendo nanopartículas. A difração de raios-x mostrou que as nanopartículas no material se apresentaram parcialmente esfoliadas e ainda atuaram como sítios nucleadores da cristalização do poliuretano. Testes *in vitro* mostraram que a matriz porosa de poliuretano foi bem sucedida em permitir a fixação e crescimento de osteoblastos. Os resultados dos testes *in vivo* também confirmaram os resultados *in vitro*, mostrando a ausência de um processo inflamatório prolongado. Além disso, as fotos obtidas por microscopia eletrônica mostraram uma grande invasão celular através dos poros abertos da matriz, levando à uma total colonização. Modificações na superfície do poliuretano através da imobilização de peptídeos e glicosaminoglicanas levaram a altos níveis de toxicidade detectados tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando que os procedimentos químicos usados foram agressivos o suficiente para produzir estruturas poliméricas parcialmente degradada e tóxicas.

ABSTRACT

Biomaterials for tissue engineering applications usually require a series of characteristics: presence of large and interconnected pores, biodegradability, high mechanical properties, cytocompatibility, bioactivity, among others. In this work, a novel scaffold for tissue engineering was developed and preliminarily tested by using *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity assays. This new scaffold consisted of a biodegradable polyurethane matrix (derived from polycaprolactone) containing nanoparticles derived from clay minerals. The material was characterized by using FTIR, x-ray diffraction and electron microscopy. *In vitro* tests were performed by studying the colonization of the material by osteoblasts by using cellular viability and activity tests, such as tetrazolium (MTT) assay, collagen expression and alkaline phosphatase assay. The obtained scaffold was also implanted in mice and histological analyses on samples explanted after 14 and 29 days were investigated by employing optical and electron microscopies. Results showed that the porosity, obtained by expanding the polyurethane by reacting it with water, was successful in producing interconnected pores averaging 184 μ m - 327 μ m. FTIR spectra showed the successful formation of the polyurethane network and incorporation of nanoparticles. X-ray diffraction showed that the nanoparticles within the material were partially exfoliated and also acted as nucleation sites for the crystallization of the polyurethane. *In vitro* results showed that the polyurethane porous matrix was well succeeded in allowing the fixation and growth of osteoblasts. *In vivo* results also confirmed *in vitro* tests by showing that no prolonged inflammation process could be detected. Moreover, *in vivo* electron micrographs proved that cells were able to migrate through the open pores of the scaffold leading to a complete cellular colonization of the material. Modifications of the polyurethane surface by immobilizing peptides and glycosaminoglycans led to high levels of toxicity detected by both *in vitro* and *in vivo* tests, showing that the chemical procedures used were aggressive enough to cause partially degraded and toxic polymer structures.

1. INTRODUÇÃO

Acidentes, doenças degenerativas ou congênitas, onde se constatarem seqüelas deformantes (funcionais e /ou estéticas), por destruição ou ausência de tecido de suporte, está adquirindo um novo enfoque nas perspectivas de tratamento e cura. Delineia-se um prognóstico favorável em relação à indução, proliferação e recuperação desses tecidos, tanto morfológicamente quanto funcionalmente.

O transplante, como opção de tratamento, ainda é preocupante tanto pela possibilidade de transferência de patógenos como pela falta de disponibilidade de órgãos, juntamente com aspectos sociais advindos de paradigmas éticos e religiosos. Por outro lado, os implantes sintéticos podem resultar em cisalhamento do tecido ósseo vizinho ou mesmo fadiga e, conseqüentemente, falência do implante (ULRICH HERSEL *et al.*, 2003).

Algumas linhas de pesquisas são bastante promissoras em relação à criação de tecidos extracorporalmente através de cultivo de células e sua subsequente introdução no organismo; outras utilizam o implante de uma matriz porosa na região injuriada, onde se espera a infiltração, adesão, proliferação e diferenciação de células autógenas. Em ambas as técnicas, há necessidade de se desenvolverem biomatrizes de materiais com características adequadas e compatíveis com os tecidos vivos.

A cultura 2D é necessária para estabelecer o potencial de compatibilidade e interação do material para implante, mas não é ideal para avaliar preenchimento em sítios de tecidos defeituosos. Defeitos esqueléticos variam em tamanho e forma, portanto requerem materiais em 3D para satisfazerem requisitos de preenchimento ou reposição do tecido perdido. (ULRICH HERSEL *et al.*, 2003).

Este trabalho propõe desenvolver um poliuretano biodegradável, baseado em POLICAPROLACTONA + IPDI + MONTMORILONITA ORGANOFÍLICA na forma de uma matriz porosa a qual terá sua toxicidade testada preliminarmente visando avaliar uma possível utilização na Engenharia de Tecidos.

2. OBJETIVO GERAL

Fabricação de uma matriz porosa biocompatível e biodegradável com potencial para aplicação como suporte de crescimento tecidual na engenharia de tecido.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- 1) Sintetizar matriz porosa a partir da combinação de poliuretano derivado de policaprolactona e argila organofílica.
- 2) Caracterizar as estruturas dos biomateriais a serem testados PU/SILICATO/GRGDS/ SULFATO DE CONDROITINA.
- 3) Promover o cultivo *in vitro* de células ósseas de calvária de ratos.
- 4) Avaliar a viabilidade celular e proliferação em presença dos biomateriais semeados, através das técnicas de MTT, Fosfatase Alcalina, Colágeno.
- 5) Avaliar, preliminarmente, resultados de citotoxicidade dos biomateriais "in vivo".

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. HISTÓRICO

Registros escritos de povos antigos como os Assírios, Egípcios, Gregos e Maias mostravam a preocupação com a reconstrução estética e funcional de órgãos e tecidos mutilados. Foi achado no Egito antigo, na cidade de Tebas, há 2600 anos a mais antiga prótese conhecida do mundo: um dedo artificial feito de um plástico de linho tratado, e prensado com uma cor semelhante à da pele e textura de couro, coberto com unha feita de algum material semelhante ao vidro. Os furos em volta do artefato sugerem que eram presos ao órgão mutilado com tiras em fita. Foi visto também em múmia no museu de Arlington, England, antebraço artificial e, no museu de Manchester, esculturas sintéticas de pés (*Discovering Archaeology*, 1999).

Outras múmias apresentavam cavidades dentárias obturadas com madeira dura e marfim. Heródoto de Halicarnassus, que viveu por volta de cinco séculos A. C., registrou a arte egípcia de próteses bucais, que eram confeccionadas em chumbo, ouro, marfim ou madeira, onde se encaixavam os dentes de animais, dentes humanos, amarrados com fios aos elementos dentais remanescentes (*Revista Informe Dental Capital*, 2000).

Surgiu, também, a idéia de combinar partes de diferentes espécies, que hoje denominamos xenotransplante (células ou órgãos de animais implantados em humanos). Os gregos, há mais de 3000 anos, já utilizavam esta técnica. (*Scientific American*, 1997). Em 1682, um físico russo recompôs a calota craniana de um nobre usando osso de cachorro. Nova tentativa apareceu no século XX, quando em 1905 um cirurgião francês inseriu pedaços de rins de coelho em uma criança que sofria falência dos rins. O resultado imediato, segundo ele registrou, foi excelente, entretanto a criança foi a óbito, duas semanas mais tarde. Nas décadas seguintes, vários outros cirurgiões tentaram transplante de órgãos de porco, carneiro, macaco em pacientes. Todos estes implantes falharam por razões que pareciam um quebra-cabeça na época. Em 1940, um físico ganhou o prêmio Nobel, *Sir Peter Medawar*, at the *University of London* pelas primeiras investigações das bases imunológicas ligadas às rejeições. Com tantas falências ocorridas, perdeu-se o interesse neste tipo de transplante até que, em 1954, Joseph E. Murray e seus colegas do Peter Bent Brigham Hospital in Boston fizeram o primeiro transplante de rins com sucesso. Eles

controlaram a rejeição imunológica utilizando rins de irmãos gêmeos idênticos e, mais tarde, com doadores diferentes, porém administrando drogas para suprimir a resposta imunológica inata do paciente. A prática médica com transplante de coração, fígado, pulmão e pâncreas têm crescido com sucesso desde então. Entretanto, este processo tem encontrado limitações pela falta de doadores de órgãos saudáveis, e pela própria demanda que tem crescido ano a ano com o aumento da longevidade do paciente, como também pela eficiência tecnológica desenvolvida e aplicada à medicina. Apesar da falência de tecido animal no transplante, esta idéia não foi abandonada e, durante a década de 1960, pesquisas médicas continuaram a investigar o motivo do insucesso rápido do transplante entre espécies diferentes. A causa identificada foi a molécula de anticorpo do sangue que se ligava ao tecido receptor. Estes anticorpos ativam complementos protéicos do sangue, o qual desencadeava a destruição do implante. Isso acontecia devido à destruição dos capilares do órgão transplantado, causando uma hemorragia maciça.

Em 1992, David J. G. White e colegas da University of Cambridge conseguiram criar porcos transgênicos, onde a parede de seus vasos sanguíneos não era atacada por proteínas humanas. Outras estratégias para prevenir as rejeições agudas estão sendo pesquisadas em nível de manipulação e identificação de fragmentos moleculares, ou antígenos do tecido do porco para o qual anticorpos humanos são ativados, como também o método de alterar o sistema imune do receptor para que não destrua o órgão transplantado.

Apesar de todos estes esforços, foi observado que tanto porcos como outros animais contêm, dentro de seu código genético, os chamados “provírus”(seqüência de código genético) que podem, potencialmente, direcionar a produção de partículas virais infecciosas). Estes provírus tanto podem repassar doenças próprias de animais para os seres humanos, como, também, se combinarem com o código genético do hospedeiro, podendo causar doenças e patógenos completamente diferentes (Scientific American, 1997).

Como observamos no decorrer da história da pesquisa na área de regeneração de tecidos e órgãos, as estratégias usadas esbarraram em limitações até então aparentemente intransponíveis. Com o enfoque diferente, e pensando em novas possibilidades, Michael Stefton, da universidade de Toronto, ativou um novíssimo campo da engenharia de tecidos com o isolamento de células-tronco embrionárias

humanas. Afinal, células- tronco são o ponto de partida da natureza para a construção de órgãos funcionais. A partir daí, tanto camada delgada de pele como vasos sanguíneos individuais, já foram cultivados em laboratório, com algumas versões testadas em seres humanos.

Um órgão completo entretanto, constitui em uma complexa construção tridimensional formada por células, nervos e músculos especializados, todos entrelaçados a uma densa rede de veias e capilares para a circulação de oxigênio e nutrientes. O principal problema, até aqui, tem sido fazer com que múltiplos tipos de células cresçam e trabalhem em harmonia, estimulando a formação de vasos sanguíneos necessários para alimentar tecidos com espessuras superiores a alguns centésimos de milímetros. Imitando a forma 3D natural com que os órgãos crescem, os engenheiros de tecidos estão tentando fazer com que células adjacentes “conversem” umas com as outras, completando a tarefa de construir os tecidos desejados. O próximo passo será a “impressão” de desenhos com múltiplos tipos de células, e sua posterior impressão, camada por camada, de modo a criar estruturas maiores. Uma das técnicas consiste em cultura de células vivas em matriz de hidrogel, que pode ser moldada em 3D. Nos últimos anos, progressos maiores foram obtidos por meio de cultivo de células-tronco, em moldes impregnados com produtos químicos indutores de seu crescimento. No ITI (Instituto de Tecnologia Israel) foi relatada a geração de tecidos em matriz de polímero biodegradável semeados com células embrionárias humanas. Quando transplantado para o rato, aparentemente conectaram-se ao sistema sanguíneo do animal (Scientific American, 2004).

Todos os materiais até então mencionados, sejam eles de contato com estruturas de superfície externa do organismo, contato direto com tecidos ou órgãos, ou mesmo com fluidos corporais, são denominados atualmente de BIOMATERIAIS. Uma definição de consenso por especialistas da área cita: “Biomaterial é um material usado como dispositivo médico com o objetivo de interagir com sistemas biológicos” (WILLIAMS, 1987). Faz-se necessária a diferenciação entre biomaterial e biocompatibilidade. “Biocompatibilidade é a capacidade de desempenho do material de induzir uma resposta apropriada do hospedeiro em aplicações específicas.” (WILLIAMS, 1987).

3.2. REQUISITOS FUNDAMENTAIS PARA SÍNTESE DE BIOMATERIAIS

A área de estudos dos biomateriais é o resultado da conjunção de esforços das pesquisas na medicina, ciência dos materiais e engenharia (SEAL, *et al.*, 2001). Pode-se observar essa interação com o esquema da FIG. 3.1.

FATORES RELEVANTES PARA FORMAÇÃO DE NOVOS BIOMATERIAIS (Requisitos básicos)

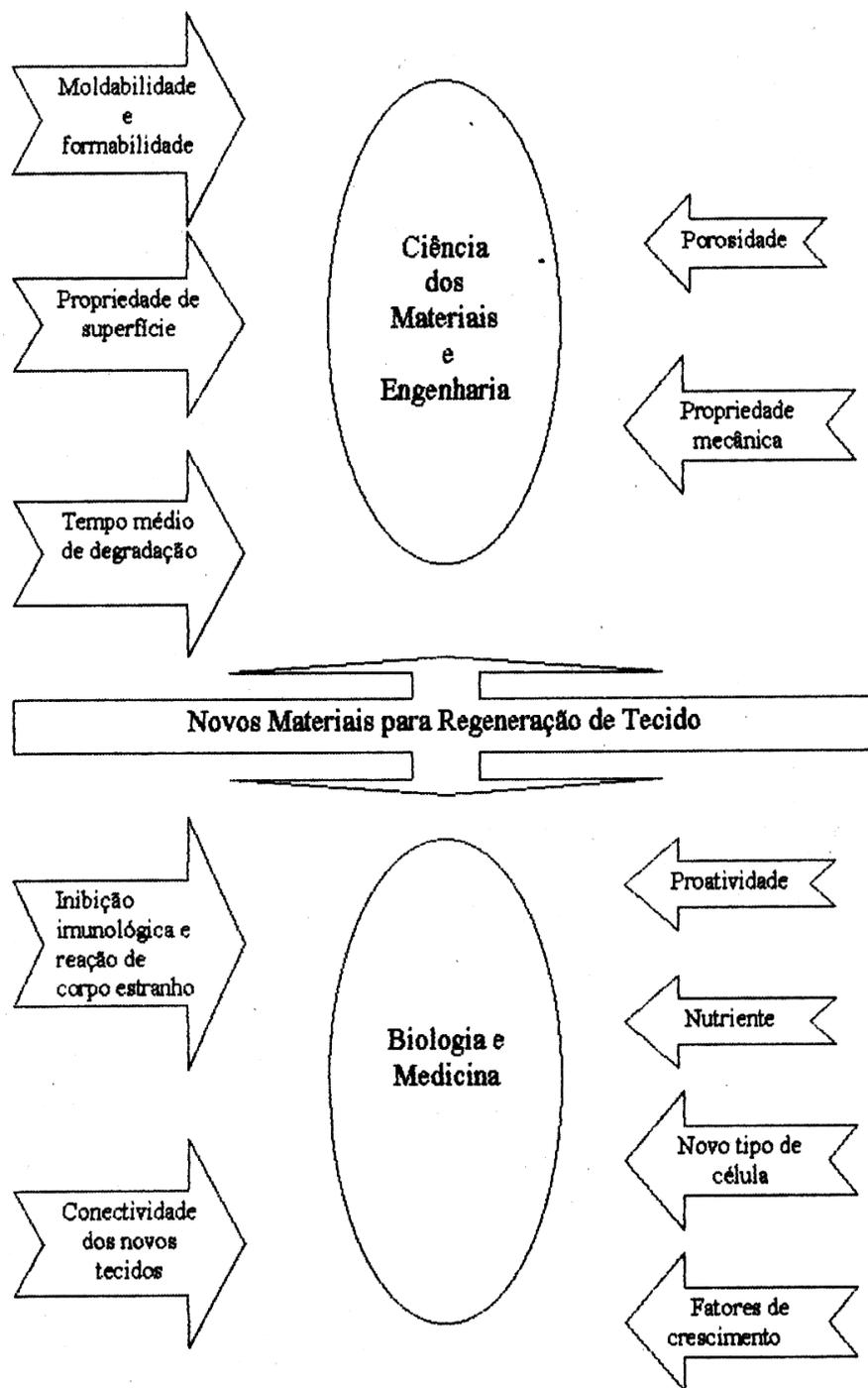


FIG. 3.1 - Interação das áreas biológica, engenharia e ciência dos materiais
FONTE: SEAL *et al.*, 2001.

Na engenharia de tecido, onde se usam os biomateriais para regeneração de tecidos ou órgãos, há necessidade de se desenvolver materiais com características diferentes para funções biológicas diferentes. Os tecidos biológicos diferem entre si. Por exemplo: o tecido mole como pele, e tecido duro como osso, possuem módulos de elasticidade variáveis, estruturas químicas diferentes, porosidades e mecanismo de regeneração peculiar. Sendo assim, devemos considerar os parâmetros biológicos para o desenho de novos biomateriais biocompatíveis. Estes parâmetros terão papéis preponderantes na adesão, proliferação, diferenciação e formação funcional dos tecidos. Os requisitos fundamentais para o sucesso dos novos materiais devem incluir avaliação e resposta específica dos mediadores bioquímicos. São questionamentos freqüentes: "-Estes materiais vão induzir respostas rápidas e encapsulamento? O material vai sofrer resposta de corpo estranho? Vai induzir resposta imune? As células vão ser capazes de aderir, proliferar, diferenciar em contato com o biomaterial?" Por outro lado, temos o desafio de trabalhar em ciência dos materiais modificando as propriedades dos materiais em relação às propriedades mecânicas, estrutura química, massa molar, origem dos monômeros, ligações cruzadas, morfologia de superfície, porosidade, capacidade de degradação e sua toxicidade. Devemos também levar em consideração a capacidade do material de tomar forma durante sua síntese do desenho tridimensional do tecido a ser reconstruído (SEAL. *et al.*, 2001)

3.3. MATERIAIS POLIMÉRICOS

O uso de polímeros na medicina coincide com a ampliação no campo da ciência de polímeros sintéticos. Na década de 40, surgem registros de uso em cirurgia de nylon, poli(metacrilato de metila) PMMA e o poliéster Dracon. A partir daí apareceram novos materiais como teflon, polipropileno, e poliuretanos. Estes materiais são os mais importantes usados na medicina como componentes de próteses permanentes, lentes artificiais, implante vascular, cateteres etc. Dentre os biomateriais sintéticos mais usados na engenharia de tecido apresentam-se grandes grupos de polímeros. Polímeros sintéticos não degradáveis: polietileno, poli(álcool vinílico), PMMA, polidimetil siloxano, poli(etileno tereftalato) e outros. Polímeros sintéticos degradáveis: poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(óxido de etileno), poli(lactato-co-glicolídico), poli(ε-caprolactona). Polímeros naturais biológicos: alginato, sulfato de condroitina 6, quitosana, ácido hialurônico, colágeno, polilisina, dextran e heparina.

3.3.1. Polímeros sintéticos não degradáveis

Estão representadas na FIG. 3.2 algumas estruturas químicas de polímeros sintéticos mais comuns usados em aplicações biomédicas de composição não degradável.

3.3.1.1. Poli(álcool vinílico) (PVA)

O PVA é um material polimérico compatível para a substituição da cartilagem, devido as suas propriedades mecânicas adequadas, resistente ao uso e fadiga, lubrificação facilitada, boa biocompatibilidade, permitindo uma boa aderência dos tecidos vizinhos. O PVA foi um dos primeiros a ser testado em cartilagem. Ele contém, em sua estrutura, a quantidade de água em torno de 70% a 80%, similares ao da cartilagem. O PVA pode ser esterilizado, mantendo sua estabilidade mecânica. Ele pode ser moldado na forma desejável, sendo assim, é muito pesquisado para uso em implantes de cartilagem articular humana. Além disto, sua capacidade de aderência celular pode ser aumentada pela incorporação em sua superfície, de fatores de crescimento e/ou outros materiais bioativos (SEAL, *et al.*, 2001).

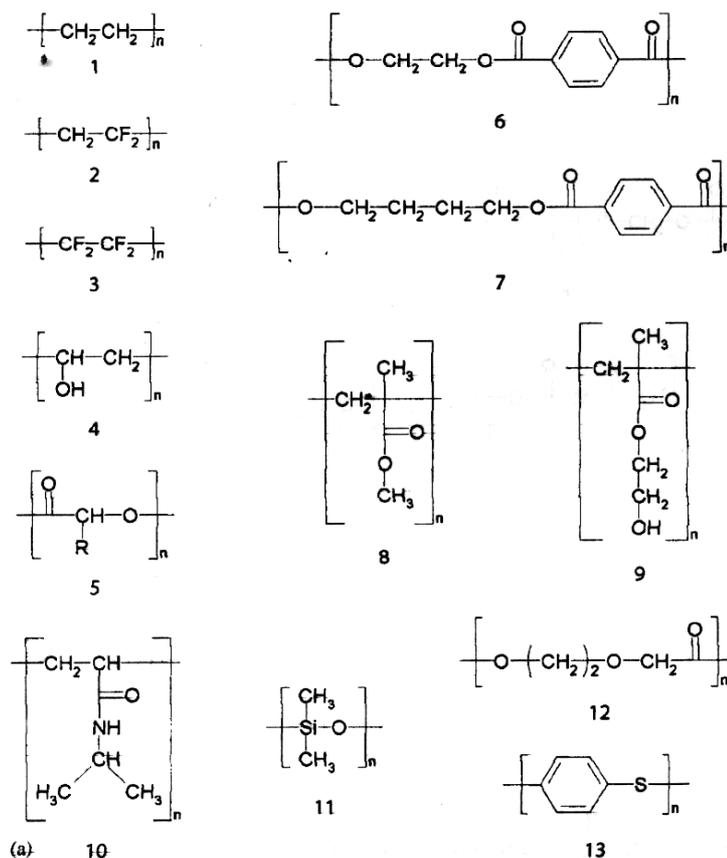


FIG. 3.2 - Estrutura de polímeros não degradáveis. (i) Polietileno; (ii) Poli(vinilidene); (iii) poli(tetrafluotileno); (iv) poli(álcool vinílico); (v) Poli(hidroxil alcanato); (vi) Poli(etileno tereftalato); (vii) Poli(butireno tereftalato); (viii) Poli(metacrilato de metila); (ix) Poli(hidroximetacrilato de metila); (x) poly(N-isopropilacrilamida); (xi) Poly(dimetil siloxano); (xii) Poly(dioxanone); (xiii) polipirrol.

3.3.1.2. Poliacrilato

Poliacrilatos são utilizados também como cartilagem articular artificial. Fazem parte desse grupo: PHEMA poli(metacrilato de 2-hidroxietila); este material já foi testado mecanicamente em ratos por 16 semanas e foram obtidos resultados positivos, tanto na interação com os tecidos adjacentes, quanto ao não aparecimento de resposta inflamatória. B.L. Seal *et al.* (2001) descrevem, em suas pesquisas, o material poli(metacrilato de etila /tetrahidrofurfuril metacrilato (PEMA/THFMA), com características interessantes em suas propriedades como: uniformidade mecânica, baixa exotermia de polimerização a temperatura ambiente e contração mínima verificada durante o processo de polimerização.

3.3.1.3. Poli(N- isopropilacrilamida)

B. L. Seal *et al.* (2001) investigaram o uso do poli (n-isopropilacrilamida) (pNIPAAm) como hidrogel injetado para aplicação em tecido de cartilagem. Ele possui temperatura crítica inferior de solução (LCST) em torno de 32°C em solução aquosa. Uma vez injetado *in situ*, nos defeitos de cartilagem, que deverá estar a uma temperatura de 37°C, ocorreria a contração com a expulsão de água.

3.3.1.4. Polietileno

Este polímero tem uma compressibilidade similar à cartilagem. Seal *et al.* (2001) fizeram uma cobertura do material com HA (hidroxiapatita), implantando-o em articulação de coelho e obtendo cobertura completa do artefato por volta de 24 semanas. Após as 24 semanas, o tecido ósseo cresceu em torno do implante, o que resultou num material indicado para aplicações onde há necessidade de justaposição de osso e cartilagem, induzindo a integração da neocartilagem com osso adjacente, podendo ser usado para defeito osteocondral.

3.3.2. Polímeros naturais degradáveis

Biopolímeros são polímeros formados na natureza durante o ciclo de crescimento de todos os organismos. São também referenciados como polímeros naturais. A síntese desses polímeros envolve enzimas catalisadoras, reações de crescimento de cadeias ativando monômeros, que caracterizam processos metabólicos complexos dentro de células (CHANDRA *et al.*, 1998).

3.3.2.1 Polissacarídeos

Para aplicação em materiais, os polissacarídeos de maior interesse são a celulose e o amido, com aumento gradual de interesse em polímeros complexos produzidos por bactérias e fungos. Estes polímeros se caracterizam por apresentarem mais de um tipo de unidade de carboidrato com estrutura de cadeia com ligações cruzadas. Ambos, celulose e amido, são compostos de centenas ou milhares de repetições de D-glicopiranosídeos. Apesar da pequena diferença entre as unidades de repetição da forma α do amido e a forma β presente na celulose, tal feito se traduz em diferenças

consideráveis nas reações de biodegradação onde atuam diferentes enzimas para cada polissacarídeo. O amido está sendo usado na produção de filmes, pela sua baixa permeabilidade, e bem indicado para acondicionamento de alimento. Este material, uma vez descartado, decompõe-se em produtos que não causam danos quando em contato com microorganismos do solo. É utilizado também como material de preenchimento em filmes de várias resinas, como o polietileno por exemplo. Neste caso, uma vez extraído o amido, induzindo poros, a invasão de microorganismos acelera o processo de degradação do polímero pelo caminho da oxidação. (CHANDRA *et al.*, 1998). A celulose é um polissacarídeo (polímero natural) produzido por plantas de cadeia molecular longa que consiste em unidades de repetição (acelobiose). Tem alto peso molecular e alta cristalinidade e características de infusibilidade e insolubilidade. Alguns fungos e bactérias produzem enzimas capazes de quebrar a cadeia de carbono, formando oligômeros originados da hidrólise. A classe representada pelos polímeros celulose ésteres tem potencial para participar da catálise microbiológica de esterificação e decomposição. O acetato de celulose é muito usado em forma de fibra nos filmes, moldes termoplásticos de injeção com baixo custo e tecnicamente aceito no mercado. Quitina é uma macromolécula que compõem conchas de lagosta, camarões e insetos. É degradada pela quitinase. As fibras de quitina são utilizadas para confeccionar pele artificial e linhas de sutura reabsorvível (CHANDRA *et al.*, 1998). O ácido algínico é um polissacarídeo bastante estudado por sua capacidade de formar géis em presença de cátions divalentes. Os géis de alginato têm sido usados nos sistemas controladores de liberação de drogas e encapsulamento de vários herbicidas, microorganismos e células. A quitosana é um material de grande interesse para pesquisas com cartilagem. Ele é um polissacarídeo derivado da quitina. Sua estrutura química produz propriedades similares aos dos glicosaminoglicanas. É um material biocompatível e biodegradável; não provoca forte resposta imune, de baixo custo e abundante. Eles formam ligações cruzadas com sulfato de condroitina provendo condições para manter o fenótipo dos condrócitos e induzindo a formação de cartilagem. A presença de sulfato de condroitina é essencial para sinalizar a ancoragem dos condrócitos (SEAL *et al.*, 2001).

3.3.2.2 Polipeptídeos

As proteínas naturais usadas como materiais aplicados, em sua maioria, não são solúveis, não têm fusibilidade sem degradação específica. Todas essas proteínas são copolímeros específicos com arranjos regulares para diferentes tipos de aminoácidos.

Sua biossíntese é bastante complexa envolvendo diferentes tipos de enzimas; em contraste com a degradação enzimática de proteínas proporcionada pelas proteases. Os polipeptídeos mais comuns na natureza, em forma de fibra, são a lã, seda e colágeno (CHANDRA *et al.*, 1998). O colágeno tem sido largamente estudado como artefato polimérico, por sua propriedade codrogênica. Ele está presente na maioria dos tecidos conectivos dentro do corpo. Consiste em fibras arranjadas em rede. Sua molécula é uma seqüência de aminoácidos primários, contendo o primeiro aminoácido a glicina, o segundo a prolina, e hidroxiprolina respectivamente. Esta cadeia de repetição forma um arranjo espacial em tríplice hélice que, associado com outras hélices formam uma estrutura macromolecular de fibras com propriedades elevadas (SEAL *et al.*, 2001).

Alguns polipeptídeos sintéticos degradáveis podem ser considerados praticamente inertes em relação à resposta do sistema imunológico, porém induzem a uma agregação de células indiferenciadas aleatórias, devido à absorção de proteínas não específica em contato com material, caracterizando um crescimento de células fenotípicas indesejáveis (YU-CHINANG *et al.*, 2003).

Trabalhos de vários autores evidenciam que, usando polímeros naturais biodegradáveis na rede polimérica sintética, ou adsorvido em sua superfície, resultados interessantes com aumento da velocidade de agregação de células e, principalmente, para a especificidade celular. Os biopolímeros mais estudados com esses objetivos são aqueles que contêm um pequeno peptídeo RGD, que é uma seqüência de três aminoácidos (Arg-Gly-Asp), uma glicosaminoglicam (GAG) chamada de sulfato de condroitina, e um polissacarídeo já mencionado, a quitosana, derivado da quitina (FIG. 3.3).

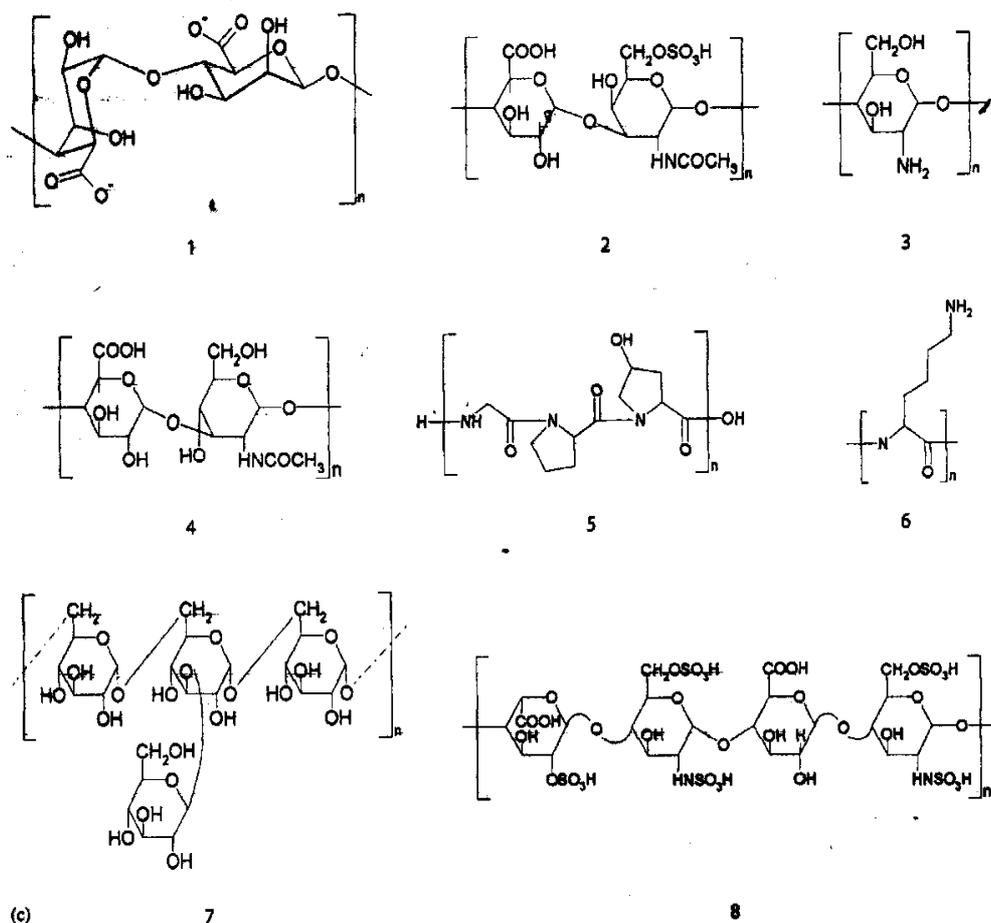


FIG. 3.3 - Estrutura de polímeros naturais degradáveis. (i) Alginato; (ii) Sulfato de condroitina; (iii) Quitosana; (iv) Ácido hialurônico; (v) Colágeno; (vi) Polilisina; (vii) Dextran; (viii) Heparina.

3.3.3. Polímeros sintéticos biodegradáveis

Material biodegradável oferece significativa vantagem sobre os materiais não biodegradáveis. Sua função regeneradora se mantém por um tempo limitado, evitando, assim, problemas específicos com reação inflamatória de encapsulamento, rejeição, fadiga do material, degradação química por exposição aos fluidos corpóreos, e conseqüente reposição do artefato cirurgicamente (SUSAN; ISHAUG *et al.*, 1997). Outra importante vantagem dos polímeros biodegradáveis é a oportunidade de controlar sua propriedade de superfície e, subseqüentemente, direcionar a adesão celular e resposta celular. A adesão celular é o parâmetro importante que subsidia, na engenharia de tecido, a estabilidade do material para seu uso. A ECM (matriz

extracelular) é o mediador principal da adesão, organização, produção de moduladores que identificam esta interação.

Em estudo feito por ISHANG – RILLY *et al.* (1997) foi focalizado e caracterizado o efeito de diferentes tipos de polímeros comerciais como substrato para condrócitos humanos. Vários polímeros e copolímeros foram investigados incluindo poli(glicolídio), poli(l-lactídeo), poli(D.L 85:15–lactídeo–co-glicolídio), poli(ε-caprolactone), 90:10 poli(L-lactídeo-co-caprolactona), 40:60 poli(lactídeo-co-caprolactona), 9:91 poli(D-L-lactidio-co-caprolactona), 67:33 poli(glicolídio-co-trimetileno carbono), e poli(dioxanona). Duas propriedades destes polímeros são comuns: todos são considerados degradáveis, e todos são aprovados pela FDA. As estruturas químicas destes materiais (FIG. 3.4) diferem entre si pelo número de oxigênios e grupo metila, como, também, variações na hidrofobicidade influenciando no comportamento de adesão celular (SEAL *et al.*, 2001).

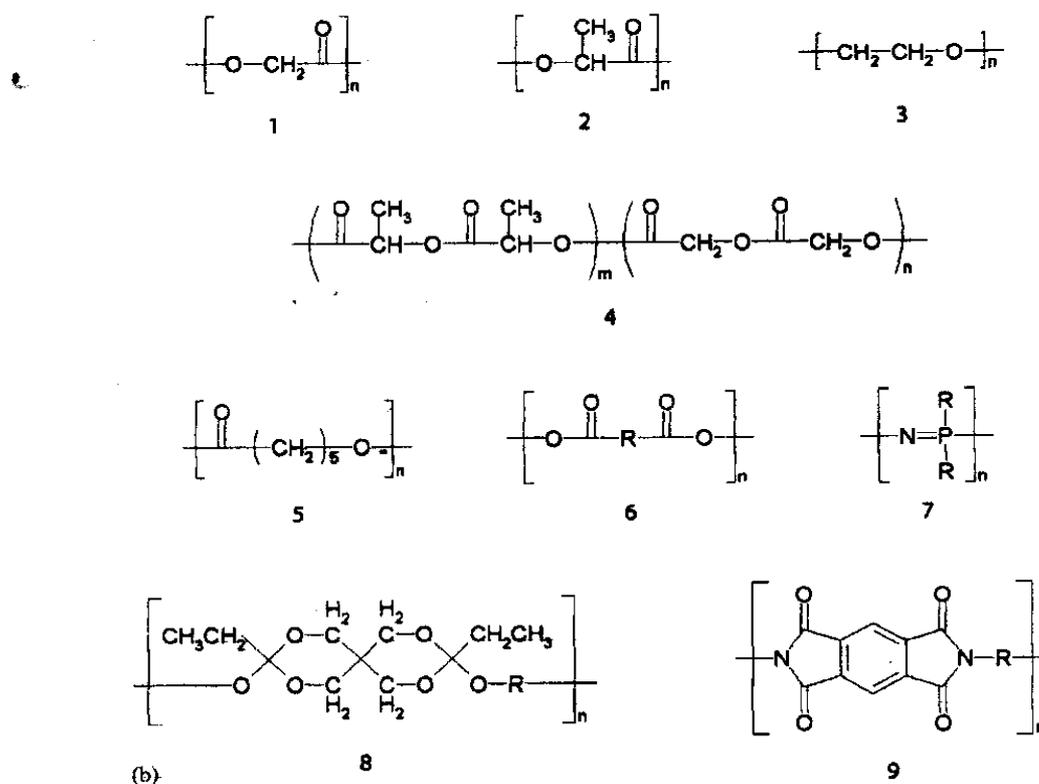


FIG. 3.4 - Estrutura de polímeros sintéticos degradáveis. (i) Poli(ácido glicólico); (2) Poli(ácido láctico); (3) Poli(óxido de etileno); (4) Poli(lactideo-co-glicolídio); (5) Poli(ε-caprolactona); (6) Poli(anidrido); (7) Poli(fosfazeno); (8) Poli(orto éster); (9) Poliimida.

3.3.3.1. Característica da estrutura x proliferação celular

O comportamento da célula e sua interação com a superfície do material polimérico são dependentes de propriedades, como topografia, carga, química e energia de superfície (EL- AMIN *et al.*, 2002).

A matriz polimérica escolhida deve permitir a adesão e ligação dos tecidos (osteoblastos), porque são células dependentes de ancoragem que requerem uma matriz de suporte ordenada em meio ambiente adequado para sobreviver, proliferar, neoformar tecido-vascular e dar funcionalidade ao tecido reconstruído. Por outro lado, o material biodegradável deve ter uma média controlada de moléculas degradadas, e com relativa facilidade de metabolização e excreção devendo ser processado na forma 3D da matriz (SUSAN L. *et al.*, 1997).

Recentemente, ISHANG *at al.* (1997) demonstraram que osteoblastos em filme polimérico migram e proliferam formando camadas multilaminares. Cultura bidimensional é necessária para estabelecer o potencial de uso como material de suporte para crescimento e função de osteoblasto, mas não são ideais para transplante em sítios com defeitos. Defeitos esqueléticos variam em tamanho e forma e requerem implantes 3D para preenchimento do tecido injuriado. GUGALA E GOGOLEWSKI (2003), em seus trabalhos comparando poli(L/DL. Lactídeo, 80/20%) na forma de membrana, e como matriz porosa, observaram através da análise do ESCA, que a superfície porosa exibe 50% mais oxigênio do que a membrana não porosa; isto é, mais hidrofílica, e o polímero com maior taxa de oxigênio obteve maior aumento na adesão e ligação de células, principalmente se este oxigênio estiver ligado ao carbono do grupo carboxila.

LAURENCIN *et al.* (1996) observaram fato semelhante com poli(lactídeo, glicolídeo)/HA onde concluíram que a área de superfície da matriz porosa 3D era maior que o sistema bidimensional proporcionando, assim, não só maior ancoragem para as células, como também possibilitava maior eficácia no transporte de nutrientes e moléculas efetoras.

ATAWA *et al.* (1995) concluíram, usando a técnica de imunofluorescência e microscopia confocal a laser, que células osteoblásticas migraram, aderiram e

proliferaram no interior da matriz de poli(lactídeo-co-glicolídeo)/HA com a preservação do fenótipo das células ósseas.

SERRANO *et al.* (2004) estudaram a biocompatibilidade de filme de polímero PCL em fibroblastos de camundongo L.929 em diferentes tempos de colonização e concluíram que este é um material estável e biocompatível como matriz para desenvolver tecido vascular. Além da indicação de uma matriz porosa tridimensional de polímeros compatíveis, o PCL poderá ser usado para regeneração de tecidos. Estudos observaram, também, a influência do tamanho do poro e sua interconectividade no cultivo e proliferação de células.

HOU *et al.* (2002) compararam algumas técnicas de fabricação de poros na estrutura do biomaterial. Eles utilizaram as técnicas de coagulação, compressão em molde combinada com dissolução de partículas com tamanhos variados de partículas de sal em *freeze-drying*. Os autores verificaram resultados mais interessantes com a técnica de compressão em molde, seguidos de dissolução de partículas de sal em água. Obteve, assim, maior homogeneidade, aliada a uma estabilidade da matriz. Essa técnica possibilitou também um maior controle, tanto sobre o tamanho das partículas de sal dispersadas na solução, como também na porosidade através da variação da concentração de sal.

HENTZE. *et al.* (2002) descreveram técnicas convencionais e modernas para a síntese de polímeros porosos como formação gasosa, separação de fases, síntese com misturas de partículas que servem como molde, e de conformação mecânica. As diferentes técnicas produziram diferentes tamanhos e diferentes morfologias de poros, adequadas às suas funcionalidades. Para o crescimento de tecido ósseo em matriz, a porogênese criada através do desprendimento de gases (CO₂) foi apropriada e vantajosa pela sua simplicidade.

FREYMAN *et al.* (2001) observaram em seus estudos com fibroblastos alguns requisitos desejáveis para satisfazerem seu crescimento. As matrizes devem possuir alta porosidade (90%) e tamanho dos poros com uma média de 100-200µm. A porosidade deve ter alta interconectividade para permitir o crescimento de células, vascularização e difusão de nutrientes. O biomaterial requer, também, integridade mecânica suficiente para resistir à manipulação durante a implantação e uso *in vivo*.

Uma técnica interessante, desenvolvida por CHEN *et al.* (2001), foi a criação de poros em polímeros como PGA, PLA e PLGA através de *freeze-drying*, com partículas de gelo misturado em solução polimérica dentro de uma cuba com nitrogênio líquido, criando, então, uma esponja de polímero. Foram inseridos dentro desses poros, microesponjas de colágeno e hidroxapatita, criando uma estrutura híbrida com boas propriedades mecânicas. Observou-se, também, um bom grau de interação celular e osteocondutividade, devido à presença de dois componentes primários da matriz extracelular do osso.

ZHANG *et al.* (1999) usaram a técnica de liberação de CO₂ durante o processo de polimerização para tornar cavidades tipo esponja em polímero não tóxico, lisina-diisocianato LDL-glicerol. A dimensão dos poros do polímero variou, em média, de 10µm a 2mm de diâmetro, e, em corte transversal do material, verificou-se uma boa área de superfície para suporte de crescimento celular e interconectividade permitindo uma livre circulação de fluidos, nutrientes e outros metabólicos.

SUSAN *et al.* (1997) estudaram a relação entre média de tamanho de poros e proliferação e função de osteoblastos *in vitro* com o polímero PLGA (poliácido láctico glicólico). Essa investigação se mostrou importante porque, em estudos com materiais cerâmicos observados *in vitro*, o tamanho de poro ideal ficou entre 200-400µm. Uma das principais razões para essa observação está ligada ao fato da ausência de angiogênese no cultivo *in vitro*, portanto, a média achada foi suficiente para prover uma compressão e tensão, ótimas para os mecanorreceptores de osteoblastos. É interessante ressaltar, no trabalho de SUSAN *et al.* (1997), algumas avaliações relacionadas ao número de células aumentadas na cultura com: densidade de semeadura inicial, número de células aumentadas com a média de tamanho de poros, (FIG. 3.5) atividade da fosfatase alcalina (ALPase) relacionada à densidade de semeadura e atividade da ALPase com tamanho de poros (FIG. 3.6).

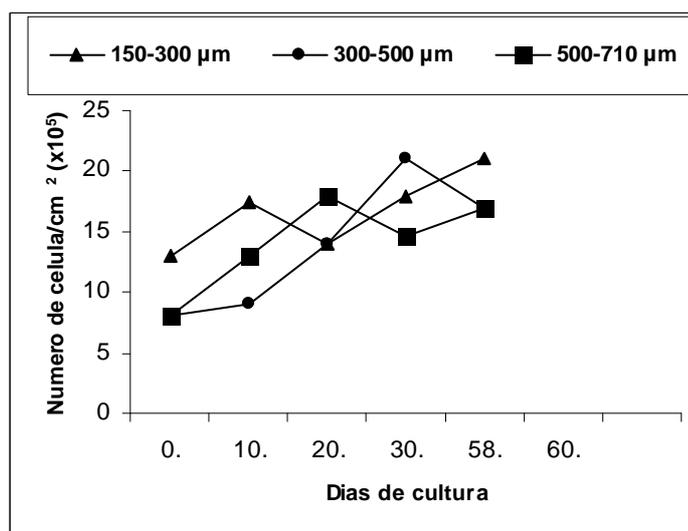
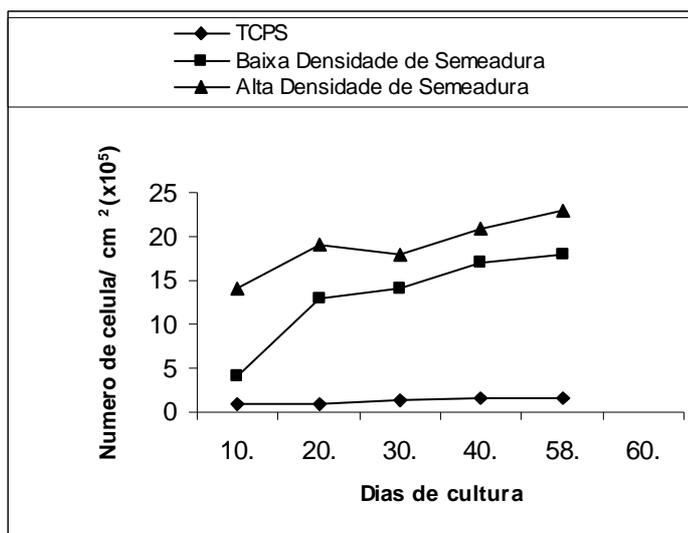


FIG. 3.5 - Gráfico de número de células x dias de cultura

A baixa densidade de sementeira aumenta rapidamente o número de células até o 7º dia de cultura e estabilizando ao final de 56ª dias de cultura. O tamanho do poro de 300-500µm do PLGA facilitou o aumento rápido de células nos primeiros dias, no entanto ao final de 56ª dia de cultura não houve diferenças significativas.

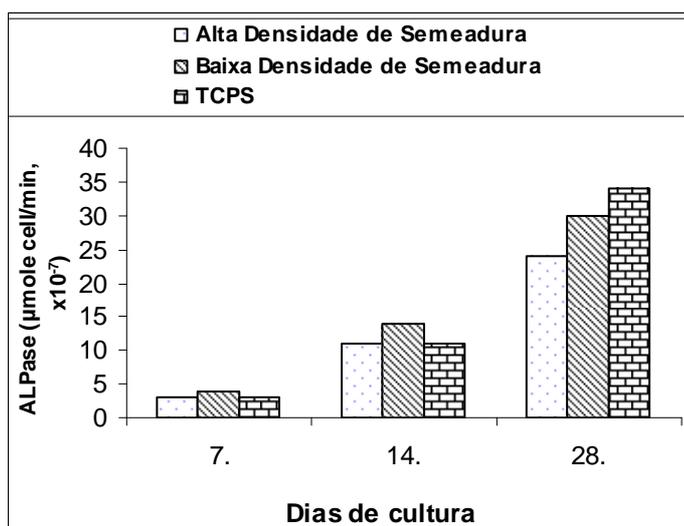
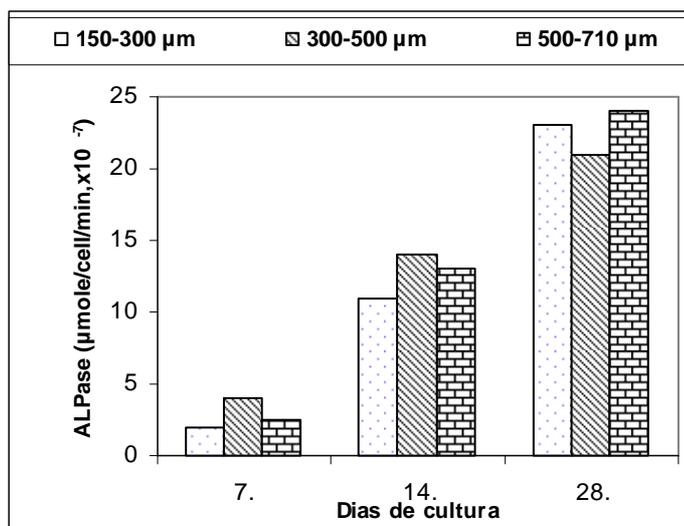


FIG. 3.6 - Gráfico Alpase x dias de cultura

A atividade da ALPase foi significativa no decorrer dos dias de cultura, mas não houve diferença significativa com densidade de sementeira, o mesmo pode-se observar com tamanho diferente de poros.

Outros dados observados foram: (i) profundidade de penetração de tecidos mineralizados com alta e baixa densidade de sementeira em diferentes tamanhos de poros; (ii) volume de mineralização por superfície de área com alta e baixa densidade de sementeira com diferentes tamanhos de poros; (iii) diminuição do peso molecular do polímero por degradação ao longo dos dias de cultura, relacionado com tamanho de poros (FIGS. 3.7a, 3.7b e 3.7c).

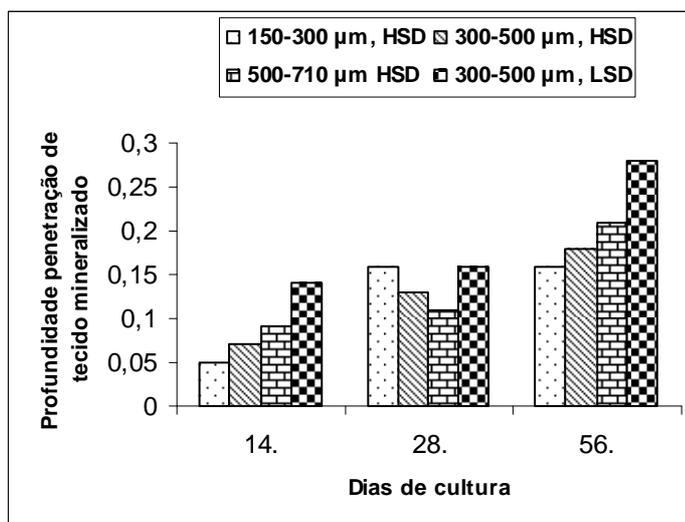


FIG. 3.7a - Profundidade de penetração

A profundidade de penetração de tecido mineralizado alcançou um máximo de 250µm com poros de 300-500µm e baixa densidade de semeadura.

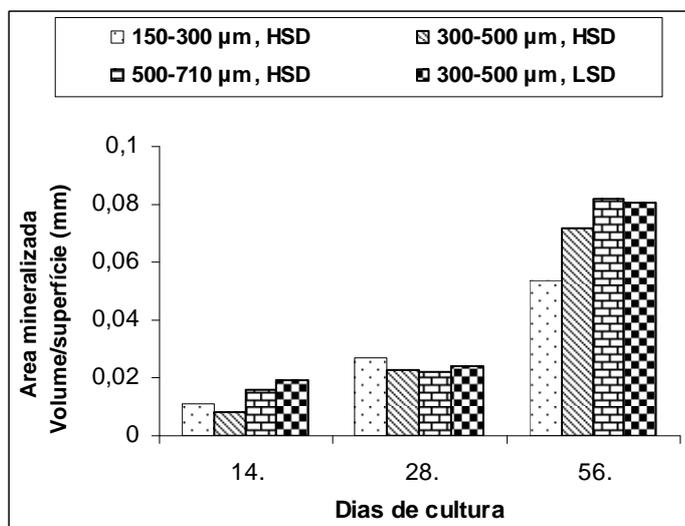


FIG. 3.7b - Mineralização

A mineralização do tecido aconteceu de forma proporcional aos dias de cultura, sem diferenças significativas entre a variação do tamanho de poros e densidade de semeadura.

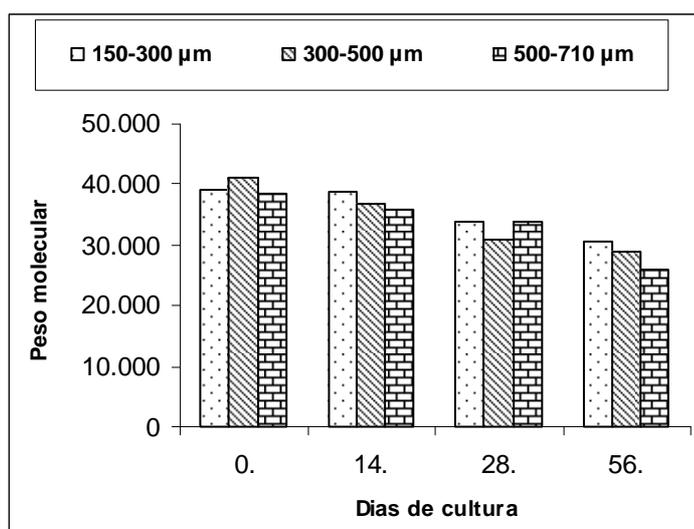


FIG. 3.7c - Diminuição do peso molecular

A diminuição do peso molecular do PLGA 75:25 ocorreu durante os dias de cultura, não havendo diferenças significativas entre os materiais com densidade de sementeira diferente e tamanho de poros diferentes.

Deve-se ressaltar o problema da pequena quantidade de células presente no interior da matriz, sugerindo que a distância e obstrução física das células e matriz mineralizada presente na superfície do polímero eliminaram a possibilidade da difusão de nutrientes no meio de cultura.

3.3.4. Polímeros com cadeia contendo grupos hidrolisáveis

Polímeros com cadeia contendo grupos hidrolisáveis são polímeros susceptíveis a biodegradação. Os mais comuns são mostrados na FIG. 3.8.

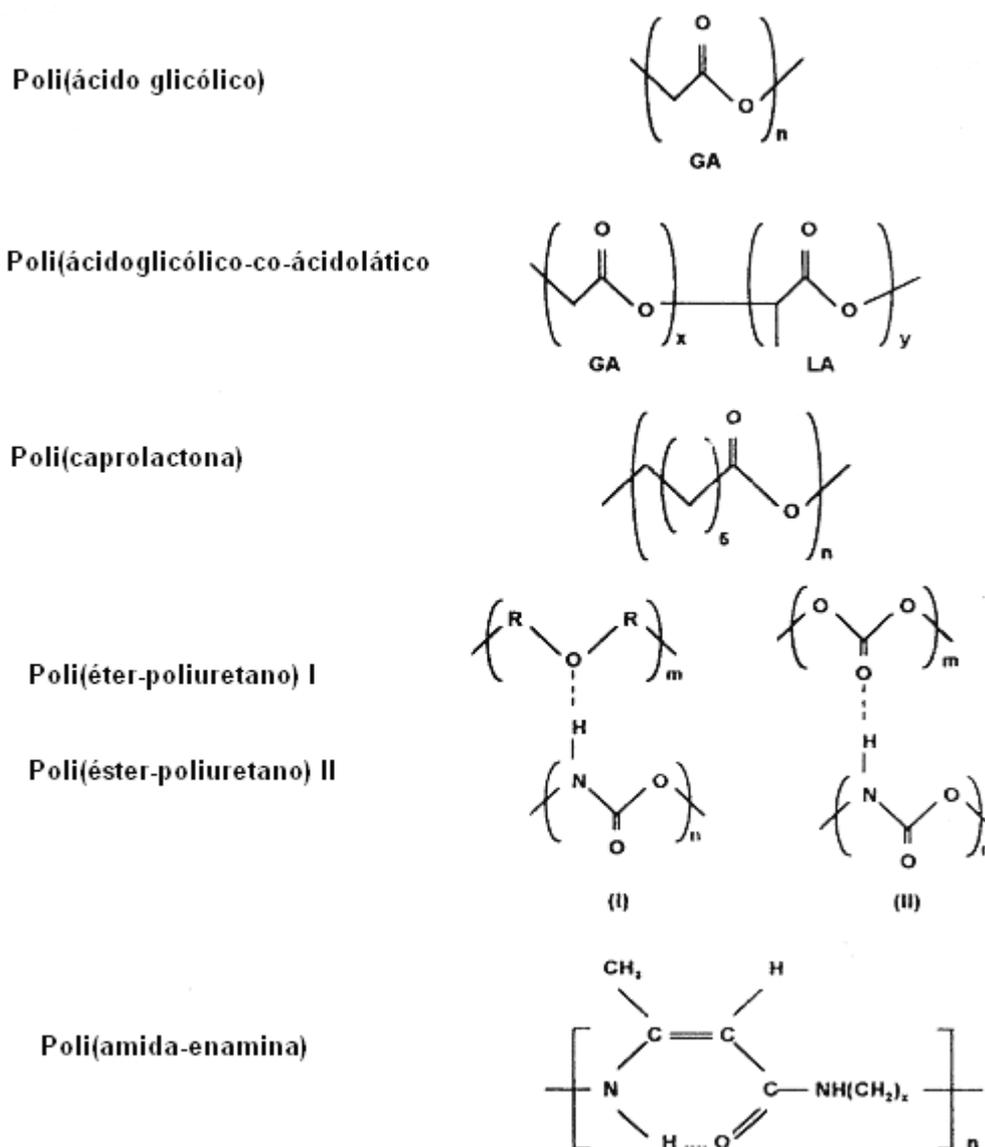


FIG. 3.8 -Polímeros de cadeia com grupos hidrolisáveis

FONTE: CHANDRA, 1998.

3.3.4.1. Poliésteres

Poliésteres alifáticos com alta massa molar são biodegradáveis. Esta razão é explicada pela flexibilidade da cadeia onde a enzima catalisadora tem acesso fácil aos sítios ativos. PGA (poli(ácido glicólico)) e PGA/PL (poli(ácidoglicólico-co-ácido-lático)) são poliésteres alifáticos de cadeia linear simples e suas vantagens, na degradabilidade, é a hidrólise simples da ligação éster em meio aquoso como fluídos

corporais. Os produtos da degradação são, finalmente, metabolizados em dióxido de carbono e água e excretados via rins (CHANDRA *et al.*, 1998).

Policaprolactona

Poli(ϵ - caprolactona) (PCL) tem sido alvo de estudos como substrato biodegradável e como matriz controladora de liberação de drogas. O PCL é geralmente sintetizado a partir de polimerização por abertura de anel aberto de ϵ -caprolactona. Pode ser degradado por fungos e enzimaticamente, contudo suas aplicações são limitada pelo seu relativo baixo peso molecular e propriedades físicas pobres (CHANDRA *et al.*, 1998). É um material semicristalino com média de temperatura de fusão entre 59° a 64°C e temperatura de transição vítrea entre -70°C e -60°C, dependendo do seu grau de cristalinidade. Produtos hidrolíticos ϵ -ácido hidroxicapróico, derivados pela cadeia polimérica de ligação estão mostrados na FIG. 3.9. Esta clivagem randômica da cadeia polimérica provoca um decréscimo inicial do peso molecular que atinge 5000g/mol. A perda de peso inicia-se pela difusão de pequenos fragmentos.

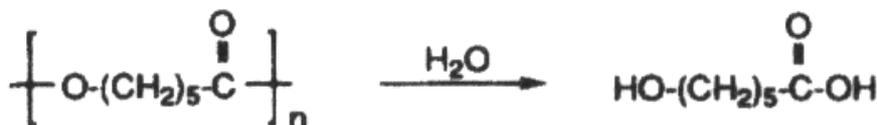


FIG. 3.9 - Mecanismo de hidrólise do poli (ϵ -caprolactona)

3.3.4.2. Poliuretanos

Os poliuretanos podem ser considerados possuidores de ambas as estruturas: a de poliésteres e poliamidas. Sua susceptibilidade à biodegradação pode ser similar à dos poliésteres e poliamidas. Geralmente a biodegradabilidade dos poliuretanos é dependente do tipo de precursor, se são poliésteres ou poliéteres. Os poliuretanos baseados em poliéteres são resistentes à biodegradação, enquanto os poliuretanos poliésteres são prontamente atacados. A série de poliuretanos derivados do poli-(caprolactona) com diisocianato alifático, com vários pesos moleculares, é mais rapidamente degradável do que os derivados do diisocianato aromático (MERKLI *et al.*, 1998).

3.3.5. Degradação dos polímeros

Ainda não há um consenso para diferenciar a definição de bioerosão e biodegradação. De acordo com Williams, biodegradação é a clivagem biológica da estrutura polimérica. GRAHAM e NOOD diferenciam sistemas biodegradáveis como aqueles capazes de sofrer erosão e, depois de certo tempo, produzir produtos solúveis que são excretados por vias normais. De acordo com a classificação proposta por Heller para biodegradação de polímeros, a erosão de alguns polímeros nem sempre produz moléculas suficientemente pequenas para serem eliminadas pelo corpo. Três tipos de mecanismo para degradação por erosão são mostrados na FIG. 3.10 (MERKLI *et al.*, 1998).

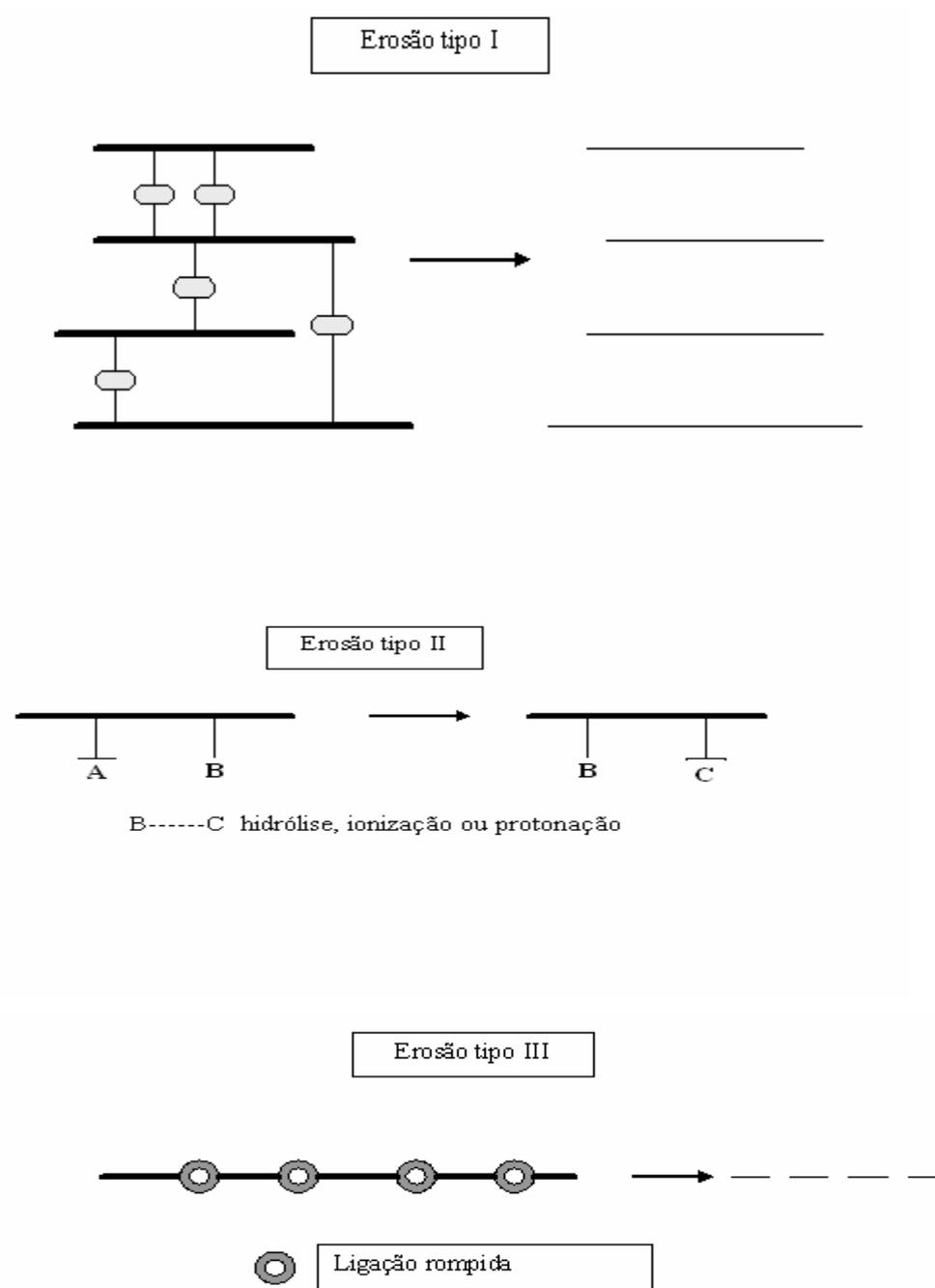


FIG.3.10 - Mecanismo de erosão de polímeros

FONTE: MERKLI, A. et al, 1998.

(i) Erosão do tipo I aparece em polímeros solúveis em água, como as gelatinas, colágenos, poliacrilamidas, poli(álcool vinílico). Eles têm sido imobilizados por

introdução de ligações cruzadas formando rede. Resultam então em um material altamente hidrofílico e, com tal propriedade, é utilizado para administrar drogas.

(ii) Erosão do tipo II, aparece em polímeros lineares, os quais são inicialmente insolúveis em água, tornando-se solúveis pela hidrólise, ionização ou protonação, sem clivagem de cadeia. Sendo assim, a média de erosão destes polímeros é altamente dependente do pH. A erosão estaciona caso os valores de pH sejam alcançados, devendo dar continuidade, uma vez removidos os íons de hidrogênio da superfície do material. Nessa situação, a taxa de erosão é determinada pela remoção de íons de hidrogênio.

(iii) Erosão do tipo III é característica de polímeros insolúveis em água, que são hidrolisados em pequenas moléculas solúveis por clivagem de cadeia (MERKLI *et al.*, 1998).

Desde que a maior parte das reações catalisadas por enzimas ocorre em meio aquoso, o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos polímeros sintéticos afeta grandemente sua biodegradabilidade. Polímeros contendo ambos os segmentos hidrofóbicos mais os hidrofílicos, parecem ter maior capacidade de biodegradação do que polímeros contendo somente um desses segmentos. (CHANDRA *et al.*, 1998; GRIFFITH, 2000). Dentre os fatores que afetam a biodegradação dos polímeros, devem ser citados a estrutura e morfologia do polímero, radiação e tratamento químico pelos quais essas estruturas são submetidas e, finalmente, o peso molecular característico de cada polímero. Similarmente às macromoléculas naturais como proteínas, celulose, e amido, os polímeros sintéticos biodegradáveis possuem ligações como amida, amina, éster, uréia e uretano, susceptíveis à biodegradação por microorganismos e enzimas hidrolíticas. Há tentativas de substituição de ligações adjacentes por grupos benzil, hidroxila, carboxila, metila e fenil, na esperança de aumentar a biodegradabilidade. Na estereoquímica foi observado que polímeros éster-urea utilizados na forma L-isômero foram degradados mais rapidamente que D.L-isômeros. (CHANDRA *et al.*, 1998). A diferença morfológica entre proteínas e polímeros sintéticos é que essas proteínas não possuem unidades repetitivas ao longo da cadeia. Essa irregularidade resulta em cadeias menos cristalizáveis, sendo que essa propriedade contribui para aumentar a biodegradabilidade de uma proteína. A biodegradabilidade de um polímero está relacionada diretamente com seu grau de proporção das partes cristalinas e amorfas. Essa seletividade pode ser atribuída ao empacotamento menos ordenado da região amorfa, que permite acesso fácil das enzimas nas cadeias poliméricas. Tamanho, forma e números de cristais, todos têm grande efeito na mobilidade da cadeia da

região amorfa que afeta a taxa de degradação. As interferências da fotólise provocada pela luz ultravioleta e irradiação por raios gama, geram radicais e/ou íons que direcionam para clivagem e ligações cruzadas, ocorrendo, então, a oxidação. Conseqüentemente, essas mudanças no material suscetível à biodegradação podem ocorrer em estágios diferentes: nas fases imediata, avançada ou tardia, dependendo do tempo de exposição, principalmente em caso dos raios gama. A degradação é caracterizada por várias maneiras: perda de massa, perda de massa molar, perda de resistência. A degradação dos polímeros acontece pela clivagem randômica das cadeias. É comum a diminuição da massa molar e propriedades mecânicas antes de ocorrer o decréscimo do peso (GRIFFITH, 2000). O processo de biodegradação é dificultado, ou mesmo inexistente, em plásticos como PE, PP, PS, por endoenzimas de microorganismos, devido ao alto peso molecular desses materiais. Primeiramente deve acontecer uma fotodegradação ou degradação química para abaixar o peso molecular do material, deixando-o em condições de penetração pela membrana do microorganismo, e assim disponibilizando-o para uma clivagem por enzimas intracelulares próprias (CHANDRA *et al.*, 1998).

3.3.6. Efeitos da modificação química da estrutura e da superfície do polímero

Aspectos desejáveis na química dos biomateriais incluem a interação específica com componentes da matriz extracelular, fator de crescimento em receptores da superfície celular. Entretanto, é muito difícil controlar as propriedades de superfície da maioria dos materiais sintéticos usando engenharia de tecido, isto é, a adsorção de proteínas específicas sobre a superfície do material, que usualmente define a característica fenotípica das células em contato com o material. Importantes parâmetros como força de adesão celular, taxa de migração celular e taxa de proliferação celular são fortemente dependentes da concentração e conformação de proteínas adsorvidas na superfície do material. Adesão de proteínas como fibronectina, vitronectina e colágeno têm um papel efetivo na promoção de adesão celular na superfície do biomaterial. Vários trabalhos demonstraram que pequenas seqüências de peptídeos como GRG.DS adsorvidos na superfície do polímero podem duplicar a adesão celular na interface (WANG *et al.*, 2003; HERSEL *et al.*, 2003; VERIER *et al.*, 2002; GRIFFITH, 2000; DILLOW *et al.*, 2001). Características da superfície do material polimérico influenciam a resposta osteogênica. Elas abrangem duas categorias fundamentais: a topografia e a química da superfície. Inicialmente, há um efeito que está relacionado com o diâmetro do poro que influencia o comportamento dos osteoblastos. Isto pode

ser observado usando diferentes ensaios *in vitro* para verificar a aderência, proliferação e diferenciação celular. Vance *et al.* (2004) concluíram que, mudanças nas propriedades dos PLGA, PCL, PU, como química de superfície, molhamento, rugosidades da superfície, influenciam a funcionalidade dos fibroblastos, demonstrando que estas alterações podem direcionar as aplicações desses materiais. WACHEM *et al.* (2002) imobilizaram colágeno na superfície de PU e concluíram que isto aumentou consideravelmente a integração dos tecidos ao biomaterial. Outros estudos com o propósito de melhorar as propriedades mecânicas de compressão e flexural das matrizes de ancoragem dispersaram uma fase inorgânica de nanopartículas na matriz polimérica. Esse preenchimento de reforço para polímeros é estável, facilmente se dispersa no material como também mantém ligação covalente com a matriz. HORCH *et al.*, (2004) dispersaram partículas de diacrililoil lisina alumoxane demonstrando um aumento de três vezes mais o módulo flexural em comparação ao polímero natural. Um estudo realizado por LEE (2003), com a mesma intenção, dispersou partículas de (MMT)- argila organofílica montmorilonita em matriz de PLLA. O resultado foi um aumento no módulo de elasticidade que, de 121,2 MPa, passou para 170,1 MPa, sugerindo um aumento de 40%. As propriedades mecânicas dos compósitos resultantes da dispersão da argila no polímero são atribuídas ao acoplamento entre a enorme área superficial da argila $\sim 760\text{m}^2/\text{g}$ e a matriz polimérica que facilitou a transferência de tensão para a fase inorgânica (AYRES, E., 2002).

A interação de partículas em nanoescala com uma segunda fase dá origem a uma categoria de materiais conhecida como nanocompósitos.

A mistura de uma ou mais fases possibilita a obtenção de um compósito com uma combinação de propriedades que não poderia ser encontrada em nenhum dos componentes isoladamente. O emprego de compósitos carregados com partículas inorgânicas, não somente melhora as propriedades físicas dos materiais, como também é capaz de chegar a materiais de alto desempenho com um custo mais baixo. (AYRES, E., 2002).

A dispersão das micropartículas pode criar três tipos de interação entre as fases, dependendo da natureza dos componentes utilizados e do método de preparação. Quando o polímero não está apto a se intercalar entre as lâminas do silicato, um compósito de fases separadas é obtido, cujas propriedades são parecidas com as dos tradicionais microcompósitos. Outra estrutura é a intercalação de cadeia polimérica

estendida entre lamelas de silicato, resultando em uma morfologia multilamelar bem ordenada. Um terceiro tipo, em que as camadas do silicato estão completa e uniformemente dispersas na matriz polimérica, formando uma estrutura esfoliada ou delaminada também pode ser observado. (Discacciati, 2005). (FIG. 3.11)

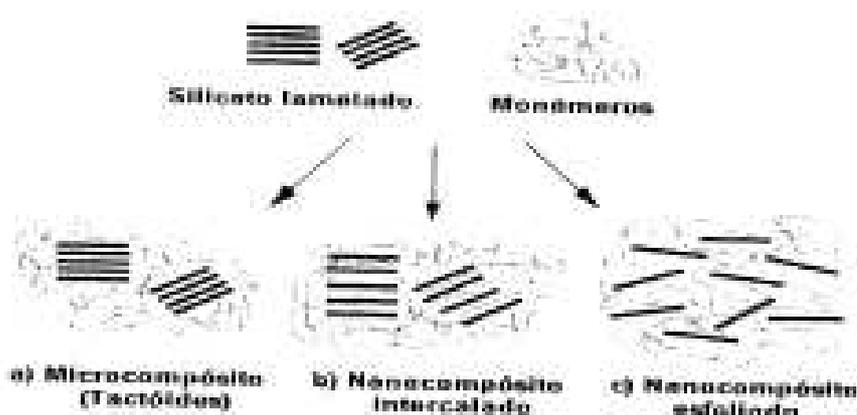


FIG. 3.11 - Tipos de compósitos

A princípio, estes silicatos não se compatibilizariam com polímeros, entretanto, modificações nas camadas ou galerias das argilas podem criar um ambiente que sirva para viabilizar a compatibilização entre polímero e argila.

A modificação na argila é baseada na incorporação de amônio quaternário com estrutura: $N^+ (CH_2 - CH_2 - OH)_2 (CH_3) T$ onde T representa um grupo alquil de, aproximadamente, 65% $C_{18} H_{37}$, 30% $C_{16} H_{33}$ e 5% de $C_{14} H_{29}$ (PATTANAYAK *et al.*, 2005).

A troca iônica com íons alquilamônio do tipo $N^+ R_4$ é um método bem conhecido que possibilita a dispersão das argilas em solventes orgânicos tornando-as compatíveis com materiais hidrofóbicos.

Uma outra característica importante desse sistema é que os cátions alquila amina protonada podem catalisar os processos de polimerização intragaleria. Com isso, há

um aumento da velocidade de polimerização intragaleria em relação ao restante do polímero (AYRES, 2002).

A maioria dos polímeros possui propriedades mecânicas compatíveis com tecidos moles, onde são usados para regeneração de tecido injuriado. Entretanto, eles são mecanicamente fracos quando usados para regeneração de tecidos duros. A tentativa de esfoliar partículas em nanoescala de compostos inorgânicos em fase de matriz de polímero orgânico pode melhorar consideravelmente suas propriedades.

Resultados podem ser observados quando matriz polimérica é utilizada para regeneração óssea, onde a degradação gradual do material é substituída pelo tecido em espaços vazios e, ao mesmo tempo, é necessária, da parte do polímero, uma resistência maior temporariamente às cargas aplicadas originadas das tensões funcionais em um transplante *in vivo* (LEE *et al.*, 2003).

3.3.7. Desenho das matrizes poliméricas

Seleção e síntese das matrizes porosas apropriadas a cada aplicação são governadas pelas propriedades físicas, propriedade de transporte de massa, e requisitos de interação biológica para cada aplicação específica. Essas propriedades ou variados desenhos são especificados pela indicação na aplicação das matrizes e meio ambiente onde são implantadas. A capacidade de regeneração de tecidos está ligada às propriedades físicas do material, que reflete no sucesso das matrizes. As propriedades físicas incluem mecanismos na formação de géis, características mecânicas e comportamento de degradação. Nas matrizes com propriedades desejáveis, deve-se observar propriedades mecânicas em níveis macroscópico e microscópico. Macroscopicamente, a matriz deve suportar e prover estabilidade para os tecidos, manter forma e função, em seu volume. No nível microscópico, evidências sugerem que crescimento, diferenciação e formação de tecido são dependentes do estímulo mecânico para as células. Como consequência, a matriz de suporte deve ser capaz de responder às cargas específicas e transmiti-las de maneira adequada às células e tecidos vizinhos. A performance mecânica da matriz depende da especificação, caracterização e controle das propriedades mecânicas incluindo elasticidade, compressibilidade, comportamento viscoelástico, força e tensão de tração. A cinética desejada da degradação está relacionada com a aplicação do material na engenharia de tecido. Deve-se levar em consideração o tipo de clivagem

da molécula, tamanho de resíduos provenientes da diminuição da massa molar, e cinética das reações. (JEANIE *et al.*, 2003). As matrizes de suporte aplicadas à engenharia de tecidos necessitam de condições apropriadas para transporte de gases, nutrientes, proteínas, células e produtos degradados fora e/ou dentro das matrizes. Neste caso, pelo menos inicialmente, o que interessa é o processo de difusão. Nas matrizes de suporte, a taxa de difusão e distância de difusão da molécula depende da interação dos materiais usados com as moléculas difundidas. Conseqüentemente, a taxa de difusão será afetada pelo peso molecular e tamanho das moléculas comparadas com estes poros, no caso de 3D. O suprimento de oxigênio, nutriente e remoção de produtos degradados são essenciais para a sobrevivência dessas células. A maioria das células e propriedades de transporte de massa *in vivo* subsiste em meio ambiente de rede para ancoragem com poros de, no mínimo, 100µm. Distâncias maiores podem ser requeridas para transporte, se houver outras necessidades como a angiogênese. Os biomateriais empregados na engenharia de tecido devem ter características não tóxicas e não induzir uma inflamação aguda ou crônica de encapsulamento indesejado. Contudo, pode-se, através da incorporação de fatores comuns da matriz extracelular (ECM) à matriz porosa de suporte, fazer acelerar e especificar a adesão, proliferação e diferenciação das células. Estes fatores se identificam como as (BMPs₂), proteínas morfogênicas de osso, fatores de transformação de crescimento β (TGF. β), e receptores de membrana celular altamente específicos. Uma importante proteína originária da EMC composta de três aminoácidos, arginina-glicina-acido aspártico (GRGDS), cumpre esse papel na primeira fase de interação na interface do material e tecido. Outros peptídeos comuns incluem os receptores específicos para fibronectina (REDV) arginina-ácido glutâmico-ácido aspártico-valina. Receptor para a laminina (YIGSR) tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina. (JEANIE *et al.*, 2003).

3.4. METABOLISMO ÓSSEO

Novos desenvolvimentos na área de biologia óssea, fisiologia, e pesquisas ortopédicas têm sido direcionados para obter informações que envolvam mecanismos de transdução e estimulação mecânica para células ósseas. Esses mecanismos implicam no processo contínuo de remodelamento ósseo que envolve osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, para traduzir os sinais mecânicos externos. (SIKAVITSAS *et al.*, 2001). O metabolismo ósseo é um processo de remodelação dinâmico e contínuo que é normalmente mantido pelo balanço acoplado entre reabsorção de osso antigo

ou injuriado e formação de osso novo. No nível microscópico, o metabolismo sempre ocorre na superfície óssea em sítios localizados, o qual é chamado de BMU (unidade de remodelamento ósseo). Mudanças podem ocorrer rapidamente quando a taxa de variação do “turnover” é aumentada, comprometendo assim a integridade funcional do osso com o tempo (CHISTENSON. 1997). Osteoblastos são células derivadas da fusão de linhagem dos monócitos que são normalmente multinucleadas. São células ativas com sítios para secreção de enzimas e prótons, essenciais para o processo de remodelamento. A membrana do osteoblasto, em seu ambiente, responde de maneira fisiológica e regulatória a várias funções celulares, já que tem receptores para hormônios e outras substâncias. Osteoblastos são maquinários biológicos que envolvem formação óssea. Depois da lacuna provocada pela erosão dos osteoclastos, essas células reconstroem matriz óssea nos sítios. São derivados de células precursoras do sangue e histologicamente têm um núcleo e uma extensa rede de retículo endoplasmático rugoso, organelas que são responsáveis pela síntese de proteínas na matriz óssea. Nesse estágio, acontece o aprisionamento de alguns osteoblastos pela matriz, transformando-os em osteócitos. Os osteócitos são considerados metabolicamente inativos, entretanto têm um papel importante como iniciador do ciclo ósseo, detectando microfraturas, ou outras alterações, repassando essas informações, através de sinalização específica aos osteoblastos. (CHRISTENSON, 1997). A influência da (ECM) matriz extracelular no processo do metabolismo ósseo sendo entendida à medida que intrincados mecanismos foram sendo desvendados. As moléculas originadas da ECM passaram a ter comprometimento no comportamento das células. LANZA *et al.* (1997) propuseram: um modelo, “reciprocidade dinâmica” entre ECM por um lado e citoesqueleto e matriz nuclear por outro. Neste modelo, moléculas da ECM interagem com receptores da superfície das células, que transmitem sinais para moléculas do citoplasma. Esses sinais iniciam uma cascata de eventos através do citoesqueleto até o núcleo, resultando na expressão específica de genes, os quais produzem efeitos de retorno que afetam a ECM de várias formas. Essa interação, ECM-célula, participa diretamente na promoção da adesão, migração, crescimento, diferenciação e morte programada das células, como também na modulação das atividades das citocinas e fatores de crescimento, ativando sinalizações intracelulares (LANZA *et al.*, 1997).

3.4.1. Composição e diversidade da ECM/célula

A matriz extracelular e a célula possuem grande diversidade de componentes que têm como finalidade suas sobrevivências e proliferação. Dentre os principais componentes bioquímicos relacionados com o metabolismo ósseo podem ser citados:

- a) osteocalcina - proteína não colágena (NCP). Pode ser usada para inibir a mineralização;
- b) osteonectina - glicoproteína que liga cálcio, hidroxiapatita e colágeno, sugerindo que é um nucleador de mineralização de matriz;
- c) fosfatase alcalina - polipeptídeo secretado por osteoblastos. Promove a formação de cristais. Ele é inibido por glicocorticóide e hormônio da paratireóide (PTH);
- d) fibronectina - Polipeptídeo com regiões para ligações com colágeno, fibrina e células. Os osteoblastos usam a fibronectina para adesão;
- e) TGF β - Fator de transformação e crescimento β , o qual modula a síntese de fibronectina, trambospondina e inibe enzimas que degradam a ECM. Causa a diferenciação dos MSCs para condrócitos e pode induzir a proliferação de condrócitos e osteoblastos;
- f) osteopontina - proteína conjugada ao ácido siálico e está ligada à adesão de células na matriz óssea. Sua síntese é aumentada pela vitamina D e TGF β . Sua diminuição está ligada à dexametasona e PTH;
- g) BMP - Proteína formadora de osso. É da família das citocinas, que estimula a proliferação de condrócitos e osteoblastos e causa aumento na produção de matriz em cada tipo de célula. É reconhecida como indutora para diferenciação do MSC para osteoblastos;
- h) FGF - Fator de crescimento de fibroblastos.que faz parte da família de fator de crescimento o qual estimula a proliferação de MSCs, osteoblastos, condrócitos. Tem propriedades angiogênicas;
- i) IGF - Fator de crescimento ligado à insulina. Estimula proliferação de osteoblastos e condrócitos. Induz secreção de matriz para essas células;
- j) PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas. Dependendo de sua concentração pode induzir proliferação de osteoblastos e condrócitos como também reabsorção óssea;
- k) PTH - Hormônio da paratireóide. É um polipeptídeo de cadeia simples e causa liberação de cálcio da matriz óssea, induz também a depreciação dos osteoblastos, e inibe a função dos osteoblastos;

- l) estrogênio - Hormônio complexo que interfere no processo de decréscimo da reabsorção óssea pelos osteoblastos;
- m) dexametasona - Corticosteróide que promove a diferenciação rápida de condrócitos fazendo-os secretarem fosfatase alcalina, sugerindo ser importante na calcificação de cartilagem;
- n) tiroxina - Hormônio da tireóide que estimula a reabsorção óssea;
- o) calcitonina - Polipeptídeo que abaixa o nível de cálcio no sangue, pela inibição da "função osteoblásticas";
- p) prostaglandina - Família dos ácidos graxos que desempenha papel duplo no balanço aposição/reabsorção;
- q) interleucina (IL-1) - Estimula a proliferação de osteoblastos. (SIKAVITSAS *et al.*, 2001).

Os primeiros receptores achados para ECM foram as integrinas (FIG. 3.12). Esses receptores fazem parte da família dos heterodímeros transmembrânicos. São proteínas compostas por duas subunidades, α e β . São conhecidas, pelo menos, 15 α e 8 β subunidades. Elas formam pares e possuem uma variedade muito grande de combinações entre as cadeias. Algumas integrinas são receptoras, bastante específicas enquanto outras se ligam a vários diferentes epítopes. Elas se distribuem em domínios de ligação extracelular e intracelular. O domínio citoplasmático das integrinas interage com o citoesqueleto, sugerindo a transdução. Recentemente, estudos têm demonstrado a indução direta de sinais bioquímicos dentro das células. Uma característica interessante é que várias moléculas da matriz extracelular contêm uma seqüência de aminoácidos: um tripeptídeo RGD em suas estruturas, que lhes permitem ligar diretamente aos receptores da superfície das células. A presença desse e de outros peptídeos são comuns para as lamininas, trombina, tenacina, fibrinogênio, vitronectina, colágeno I e VI, osteopontina.

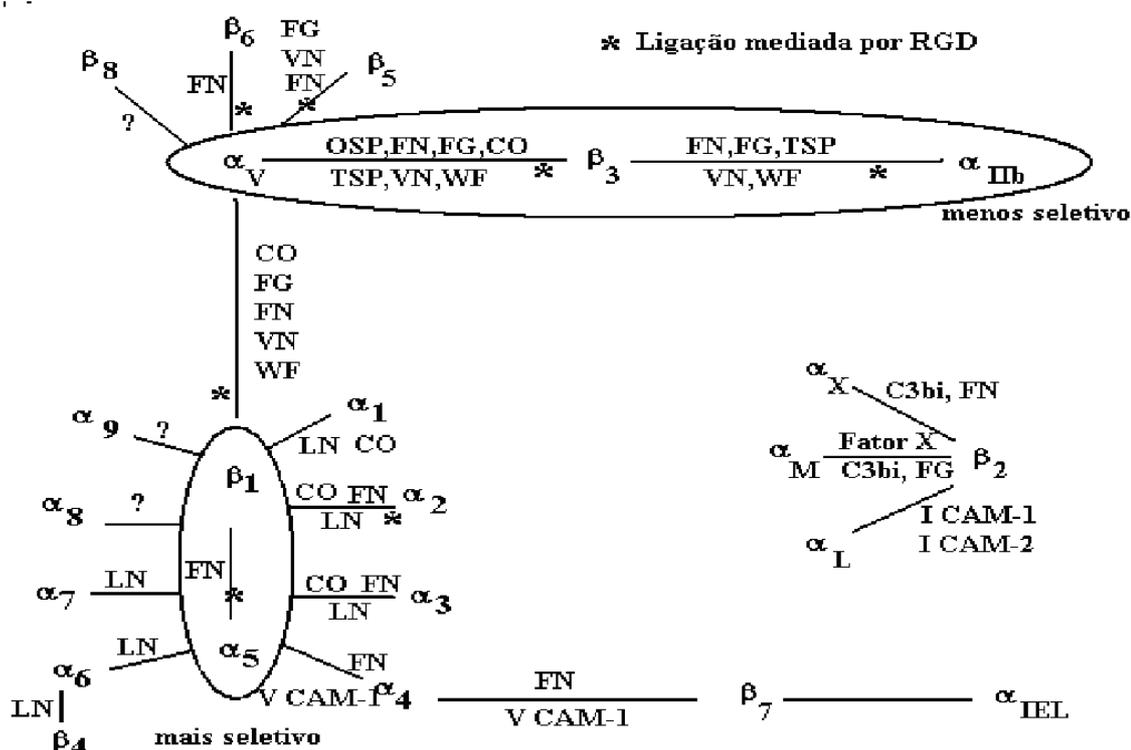


FIG. 3.12 - Família das integrinas de receptores, e sua composição heterodimérica com seus ligantes extracelulares. β_1 e β_2 - média adesão cel/matriz; β_2 - envolve adesão de FN, LN, CO; β_3 - FG, VNF, TSP, VN. Abreviações: CO- colágeno; C₃bi- Complemento; FG- Fibrinogênio; FN- Fibronectina; ICAM 1- Molécula de adesão intercelular; α_N - Caminina; TSP- Tronspodina; VCAM 1- Molécula de adesão de célula vascular; VN- Vitronectina; VNF- Vou willebrand fator; OSP- Osteopontina. Fonte: Principles of Tissue Engineering, 1997.

A adesão de células pode ser dividida em três graus de adesividade, segundo LEE *et al.* (2004): (i) Adesividade imediata significa uma deposição de células, mas sem espalhamento. (ii) Adesividade intermediária caracterizada pelo espalhamento das células, mas sem a indução de fibras nem adesão focal. (iii) Adesividade tardia indica espalhamento de células com fibras tensionadas e adesão focal. A adesividade imediata é a mais importante, pois se trata da primeira etapa para a adesão nos polímeros (FIG. 3.13). Esta adesão biológica pelas células é mediada principalmente pelas integrinas que estão envolvidas nos processos de cicatrização, invasão de tumores e inflamação. Elas têm a capacidade de reconhecer proteínas adsorvidas na superfície do material como RGD. Além desses resultados, TSUCHIYA *et al.* (2001) demonstraram a importância da fibronectina para a adesão das células em matrizes porosas. Isto se traduz na grande presença de integrinas que respondem por estes

domínios: α_1 , α_3 , α_5 , α_6 , e β_1 . Confirmando estes resultados, STEPHANSSON *et al.* (2002) realizaram pesquisas com osteoblastos e concluíram a dependência da fibronectina e, conseqüentemente, seu receptor $\alpha_5\beta_1$, para a definição do fenótipo, expressão gênica e mineralização da matriz. Esta análise foi feita através de ensaios da fosfatase alcalina, PCR e experimento com anticorpo bloqueados HFN7.1. Por outro lado, DAMSKY (1999) concluiu que qualquer perturbação que altera a organização tridimensional da fibronectina ou propriedades mecânicas da matriz madura de osteoblastos pode disparar, ainda de forma desconhecida, o mecanismo de apoptose sugerindo, mais uma vez, a importância do β_1 receptor da fibronectina na sobrevivência do processo de desenvolvimento do “ciclo da vida” dos osteoblastos. ANSELME, (2000) e CHING- HSINKV *et al.* (2002) observaram alto nível de integrinas expressado na cultura de osteoblastos humanos tais como: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$ e, em muito menor quantidade, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, sendo que a subunidade β_1 estava predominantemente envolvida na adesão do colágeno, lamina e, principalmente, da fibronectina.

NICOLOVSKI *et al.* (2000) confirmam os mesmos achados de ANSELME (2000), como, também, constataram a essencial importância da presença do Ca^{++} , Mg^{++} no funcionamento da integrina. Parece que os íons induzem a mudança conformacional da integrina, necessária para a exposição dos sítios ativos ligantes.

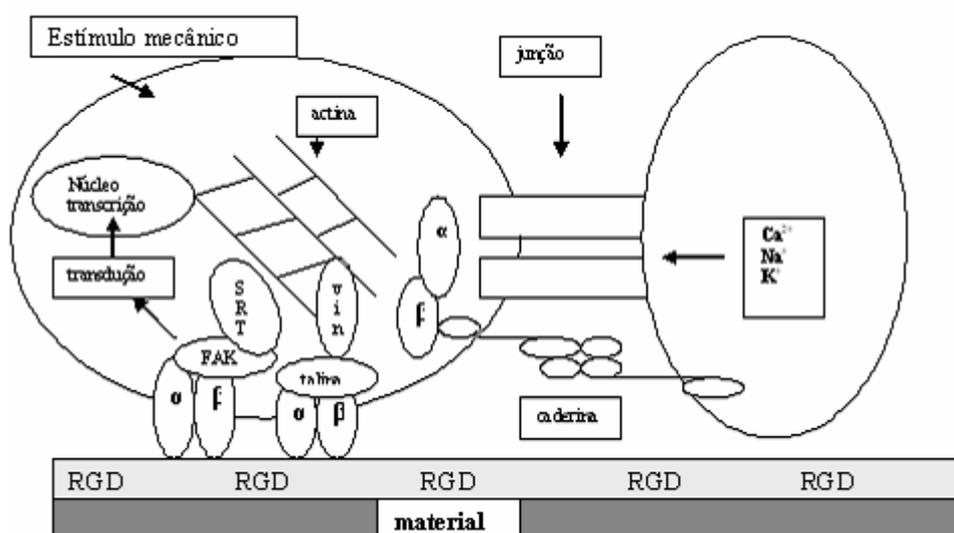


FIG. 3.13 - Representação das proteínas da célula envolvida na adesão celular no biomaterial

FONTE: K. ANSELME, 2000.

Com a intenção de demonstrar a importância dos componentes da ECM no sucesso da adesão de osteoblastos, AMIN. *et al.* (2003) compararam três substratos de matrizes poliméricas (PLGA), poli(ácido lático co-glicólico), (PLA) poli(ácido lático) e (TCPS) cultura em poliestireno e concluíram a superioridade da aderência dos osteoblastos no substrato que produziu maior nível de moléculas da ECM e melhor organização no citoesqueleto. O PLGA provavelmente favorecido pela sua composição específica, foi o material que apresentou melhor resultado. A fibronectina é uma macromolécula que contribui para a organização estrutural da ECM e interação com células. É uma glicoproteína dímera adesiva, com ligações dissulfídicas. Contém três tipos de domínios múltiplos de repetição, FN₁, FN₂, FN₃. A atividade biológica mais importante da fibronectina é sua interação com células. Sua versatilidade nestas interações é explicada pela atividade de vários módulos. No módulo FN₃ na 10ª posição aparece a seqüência de Arg-Gly-Asp que interage com a integrina $\alpha_1\beta_5$. No módulo FN₁ se ligam receptores do sistema de coagulação heparina I e fibrina I; já no módulo FN₂ se liga o colágeno e sulfato de condroitina.

3.4.2. Mecanismo de transdução

Os biomateriais, uma vez em contato com tecidos do corpo humano, estimulam resposta interativa que ocorrerá na interface material/tecido. Esta interação se dá através de células com o meio externo via proteínas transmembrânicas, as quais repassam informações de ambos os meios, externos e interno da célula. Muitas dessas proteínas são receptores caracterizados por sítios de sinalização e regulação. Quando o sítio ligante é ativado acontece a mudança da conformação do receptor ou afinidade por outras moléculas que iniciam a reação em cascata mediada por reação de enzimas, resultando na ampliação dos sinais em um processo chamado de “sinais de transdução”. Em uma função celular, temos os estágios de sobrevivência da célula, proliferação, migração e diferenciação, que são regulados por intrincada rede de sinais integrados de muitos tipos de moléculas em um processo altamente dinâmico. Duas classes desses receptores são relevantes para os biomateriais: os “fatores (solúveis) de crescimento” e “matriz extracelular (insolúveis)”. Moléculas de fator de crescimento e seus receptores têm o papel na homeostase de tecidos normais. São solúveis e peso molecular de 5.000 a 50.000g/mol. O BMP (proteína morfogênica de osso) envia sinais às células precursoras de osso que migram para os sítios injuriados, proliferaram e formam tecido ósseo. A segunda classe ECM é um gel de proteínas, proteoglicanos e polissacarídeos, na maioria insolúveis com peso molecular

tipicamente acima de 100.000g/mol, que contém regiões de domínio de várias funcionalidades incluindo o receptor mediador de adesão celular, regiões de interação com outras moléculas da ECM ou fatores de crescimento. Um sítio de grande importância para a interação com biomateriais é o sítio de adesão, que é intermediado pelo tripeptídeo arginina-glicina-aspartato (RGD) (Mw 400g/mol). Estes peptídeos interagem com receptores de superfície de classes de células chamadas integrinas. São receptoras ligantes específicas e mediam muitos aspectos do comportamento celular. A resposta estimulada bioquimicamente ou mecanicamente parece envolver fenômenos que se combinam para explicar a ativação celular. Há evidência de que as integrinas adotam pelo menos 3 (três) diferentes estágios conformacionais: repouso, estado ligante e estado aberto, sendo que este comportamento mecânico complexo sugere um tipo de sinalização transmembrânica das integrinas (HERSEL *et al.*, 2003) (FIG. 3.14).

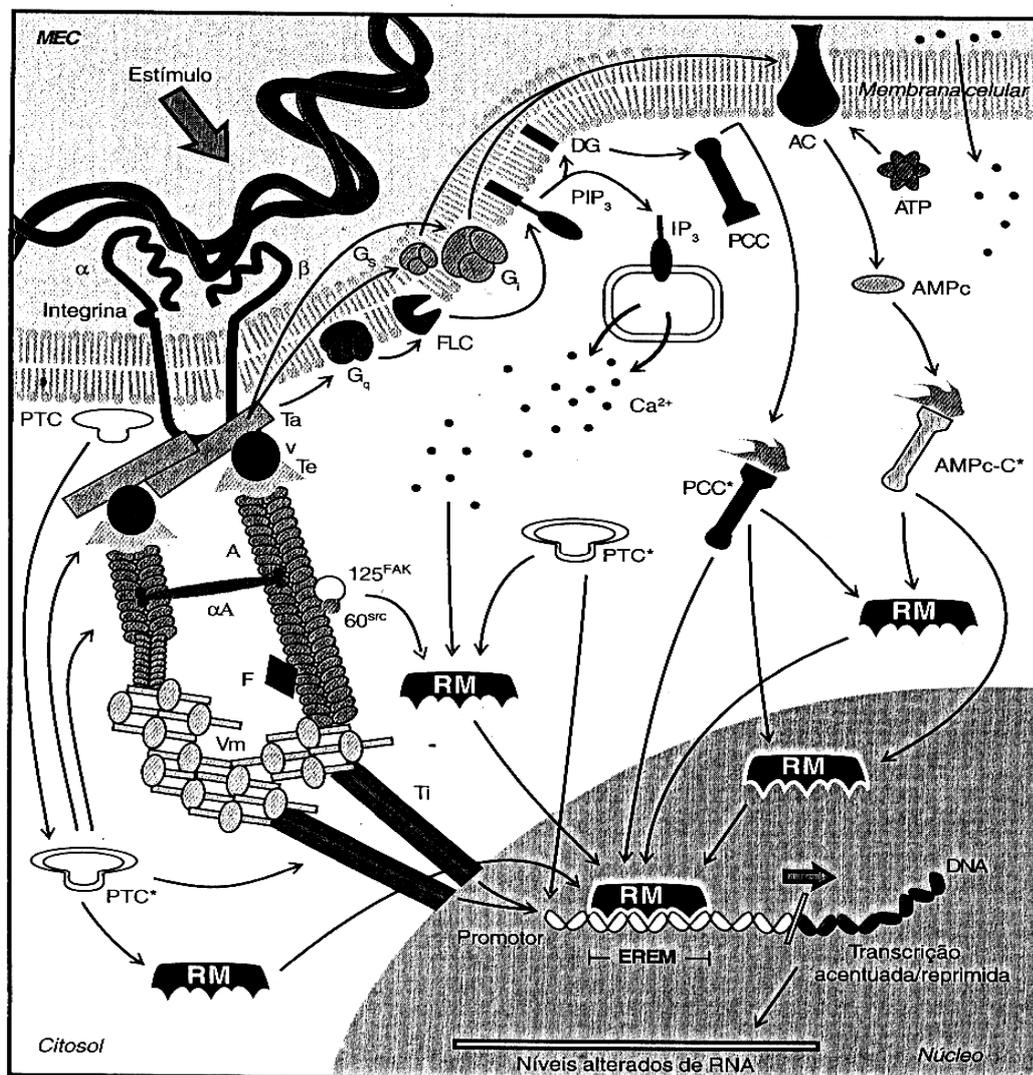


FIG. 3.14 - Modelo de transdução de sinais na célula *in vivo*

FONTE: Ciência e Prática de Oclusão, MCNEILL, C., 2000.

Perturbação sobre o tecido conjuntivo pode causar distorção da ECM. No caso, tais alterações podem estar associadas ao aparecimento de potenciais de deformação de dissipação lenta com picos piezoelétricos, podendo assim ativar os canais iônicos mecanossensitivos. Os estímulos das alterações de membrana e distorção da ECM podem ativar os receptores de membrana associados com uma série de sistemas de mensageiros secundários que iniciam a transdução dos sinais estimulados. Estes estímulos são traduzidos, subsequentemente, para os contatos focais e proteínas citoestruturais tanto física, quanto bioquimicamente. A participação da tirosina e outras proteinoquinasas, seguidas por uma série de cascatas de fosforilação, propagará a ativação intracelular. Após a ativação das proteínas citossólicas e dos mensageiros

secundários, ocorrerá ativação nuclear. Isto pode ocorrer através de alguma forma de integridade tracional, ativação nuclear física ou ativação do fator de transcrição que se ligaria às seqüências de DNA estimulando a transcrição genética.

3.4.3. Interface biomaterial/célula

Algumas proteínas ósseas têm propriedades quimiotáticas ou adesivas, porque contêm a sequênciã RGD, que é específica para fixação de células com receptores do tipo integrinas na membrana: fibronectina, osteopontina, sialoproteína óssea, trombospodin, colágeno tipo I, vitronectina. Osteoblastos humanos aderem, preferencialmente à fibronectina e fracamente à laminina e colágeno tipo V. Em contraste, não aderem ao colágeno tipo III (FIG. 3.15). A força da adesão às células de calvária de rato medido com aparato de fluxo radial foi significativamente maior com a superfície recoberta como o peptídeo RGD comparado com o RGE. O papel da conformação do peptídeo RGD na adesão de células osteoprogenitoras tem sido de alta importância. Estes experimentos demonstram, então, recurso que se pode usar para promover a adesão de células do osso em biomateriais, adsorvendo peptídeos específicos preliminarmente (ANSELME, 2000).

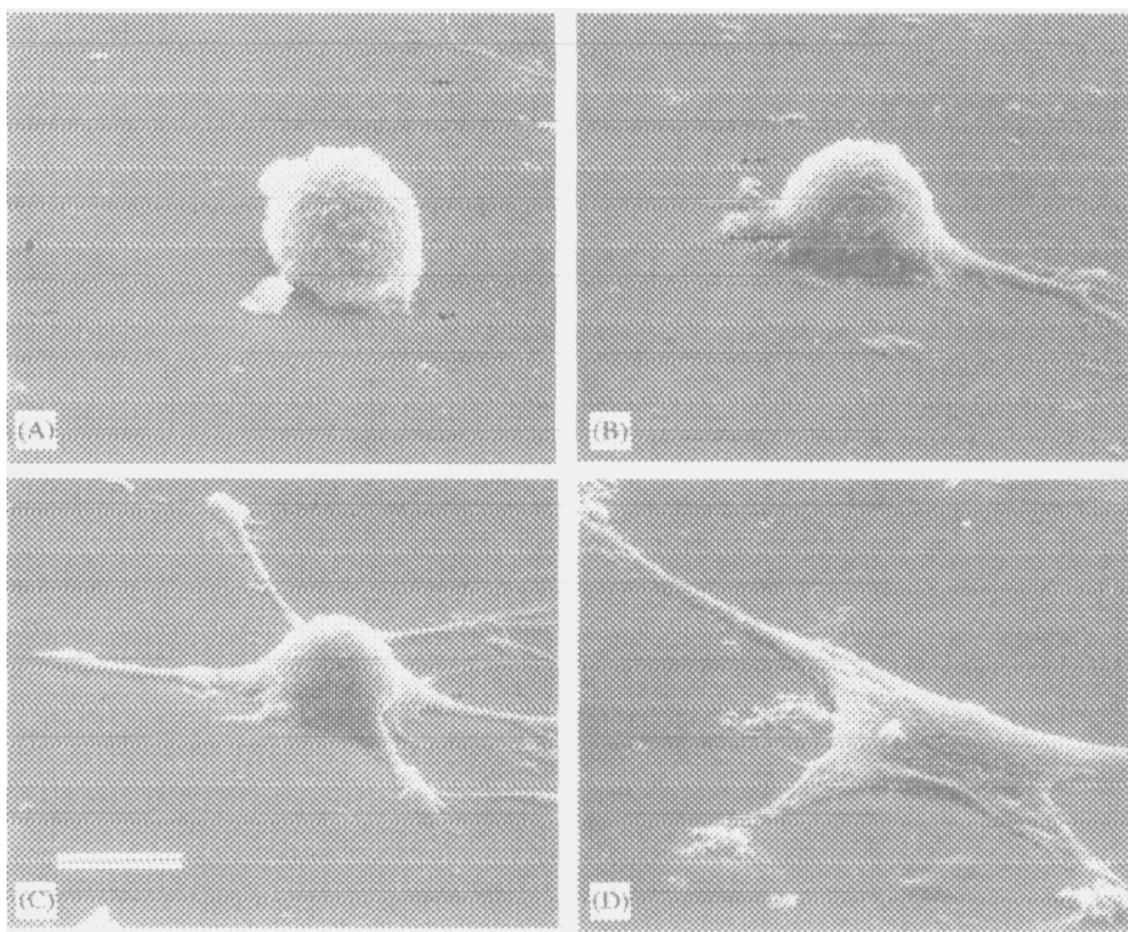


FIG. 3.15 - Adesão e espalhamento de osteoblastos na superfície do material
 FONTE: HERSEL *et al.*,2003.

O processo de adesão celular mediado por integrinas compreende uma cascata de quatro diferentes eventos (i) adesão celular, (ii) espalhamento celular, (iii) organização do citoesqueleto via actina, (iv) formação de adesão focal. Inicialmente, há o contato com a superfície e algumas ligações ocorrem, permitindo a célula resistir às forças de cisalhamento. Em seguida, o corpo da célula começa a adiantar-se e sua membrana se espalha sobre o substrato. Aparece, nesta fase, uma reorganização da actina como fibra de fusão. Finalmente, forma-se a adesão focal, onde ligações de moléculas da ECM interagem com o citoesqueleto. A adesão focal consiste em linhagem de integrinas transmembrânicas associada com outras moléculas citossólicas. Entre elas pode-se citar tetraspanins, fator de crescimento, sindecaus, lípidos, tensina, talina, runculina e quinase de adesão focal (FAK). O grande número de eventos sinalizadores seguidos de adesão focal é conhecido. Estes incluem ativação do FAK, como citado acima, (ERK) quinase extracelular reguladora, GTPases, fosfatidil inositol (PIP5), (MAPK) proteína quinase mitogênica ativadora. Entretanto, já é bem conhecido que

espalhamento celular mediado por integrina e adesão focal dispara a sobrevivência e proliferação de células dependentes de ancoragem. Neste contexto, a expressão da proteína Bcl-2 anti apoptótica induzida pela integrina $\alpha_5\beta_1$ e supressão da p53 via FAK são discutidos. Em contraste, a perda desta adesão inicial causa apoptose em muitos tipos de células nomeadas como “anoikis” que, em grego, quer dizer sem lugar. *Anoikis* podem ser induzidas na presença de moléculas ligantes da ECM não imobilizadas (FIG. 3.16).

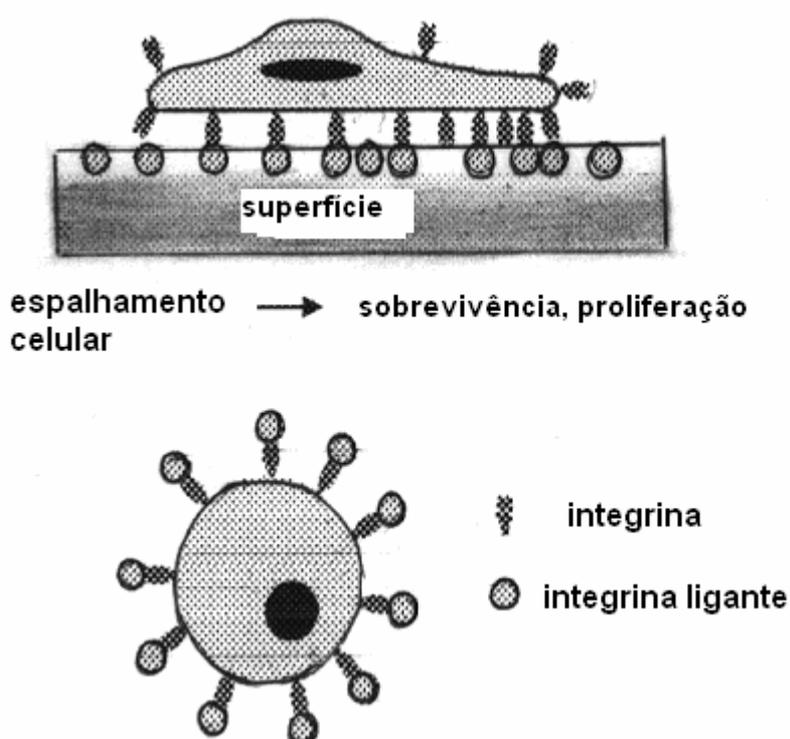


FIG. 3.16 - Efeito oposto das integrinas ligantes

Ligantes imobilizados agem com agonistas da ECM, direcionando a adesão e sobrevivência celular, enquanto ligantes não imobilizados agem como antagonistas induzindo à não adesão de células, mantendo a forma esférica e apoptose.

FONTE: U. HERSEL *et al.*, 2003.

Para se obter uma ligação estável com o RGD, estes grupos devem ser ligados ao polímero via grupo funcional como a hidroxila, amino, ou grupo de ácido carboxílico. Como alguns polímeros não têm estes grupos funcionais em sua superfície, eles são introduzidos pelas fendas, co-polimerização ou tratamento químico ou físico (MANSUR *et al.*, 2000; HERSEL, 2003). Na maioria dos casos, o peptídeo RGD é estável pela

ligação covalente de amidas. Isto é feito reagindo o grupo ácido carboxílico de superfície ativado com um peptídeo nucleofílico N-terminal e o ácido carboxílico pode ser ativado usando um reagente de acoplamento EDC (1-etil 3 (3 dimetilamino propil carbodiimida), carbodiimida (WSC), dialohexil-carbodiimida (DCC), carbonil diimidazol (CDI) (FIGS. 3.17, 3.18 e 3.19).

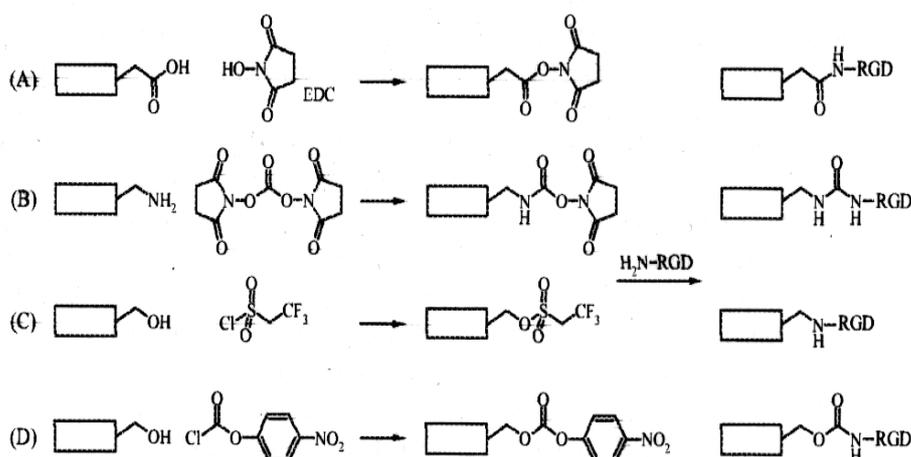


FIG. 3.17 - RGD reage via N terminal com diferentes grupos de polímeros. i) grupo carboxila com a carbodiimida e NHS para gerar o éster ativado; ii) amino grupo pré-ativado com WSC; iii) grupo hidroxila pré-ativado com tresilato; iv) grupo hidroxila pré-ativado com p.nitrofenil carbonato.

FONTE: HERSEL *et al.*, 2000.

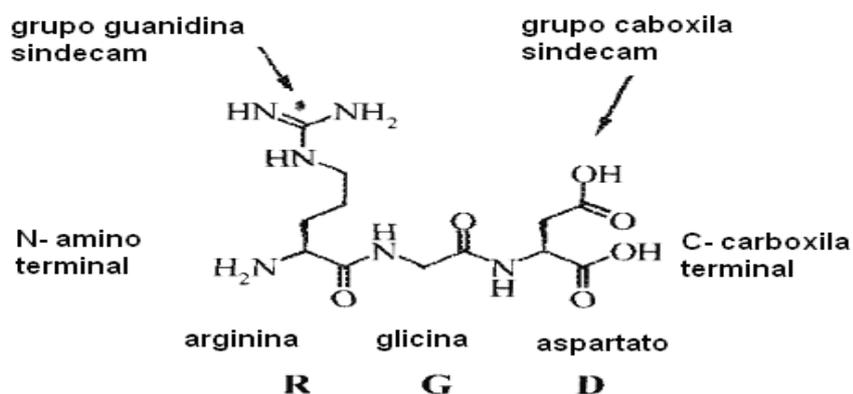


FIG. 3.18 - Sequência de RGD, fórmula molecular e nomenclatura

FONTE: U. HERSEL *et al.*, 2003.

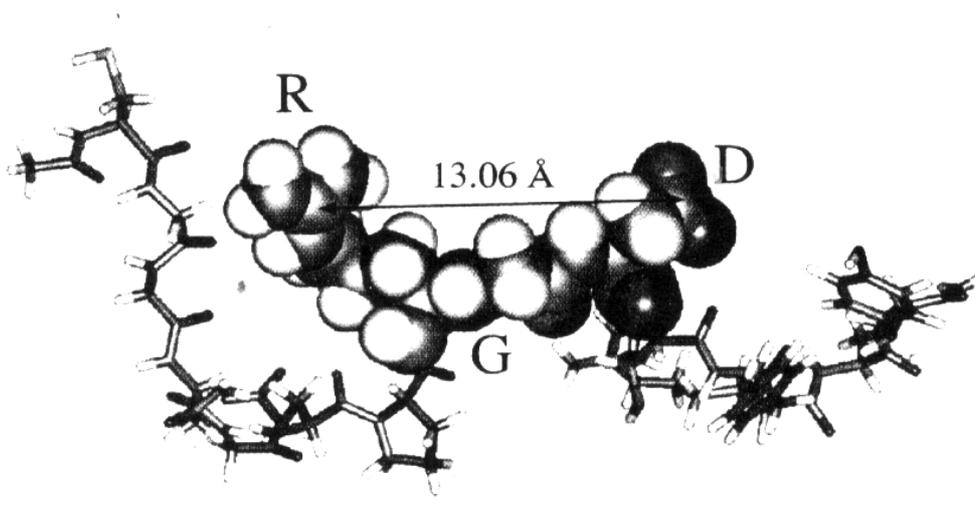


FIG. 3.19 - Representação do sítio ativo da RGD

FONTE: HERSEL *et al.*, 2003.

Algumas considerações devem ser observadas sobre o peptídeo RGD no processo *in vitro*:

- a) a adesão de células no polímero recoberto pelo peptídeo é dependente do tempo de exposição ao mesmo. Usualmente, é feito o teste de 1-4 horas após a semeadura das células;
- b) a orientação conformacional do peptídeo exerce uma forte influência na seletividade do RGD. Exemplificando, se a conformação do RGD for mais encurtada e dobrada, há um aumento da afinidade pela integrina $\alpha_v\beta_3$ enquanto, se a conformação se apresentar mais linear, sua afinidade preferencial passa a ser pela integrina $\alpha_{11b}\beta_3$. (VERRIER *et al.*, 2002) (fig. 3.18);
- c) a adesão celular na superfície do material é função da concentração do RGD adsorvido;
- d) a adesão celular mediada por integrinas depende da ocupância e linhagem do receptor presente na superfície;
- e) alto nível de densidade de RGD na superfície leva a uma redução da velocidade de migração celular que pode ser explicado pela força de arrasto das células para a superfície;
- f) a direção da migração celular pode ser governada pela distribuição do RGD na superfície, já que as células se movem em direção à superfície onde se encontra densidade mais alta de RGD.

A migração celular é um processo altamente complexo. Além da atração das células para adesão, as integrinas desempenham ainda uma função de migração celular, como agregar a adesão focal, frente às células, propiciar a mecanotransdução entre as forças contráteis das células sobre o substrato, enquanto o corpo da célula se move, e, por fim, desagregar o contato focal após estabilização da célula (HERSEL *et al.*, 2003).

3.5. CULTIVO DE CÉLULAS

Há três formas principais de estratégias terapêuticas para tratamento de tecidos injuriados em paciente: (i) implante de células de cultura; (ii) implante de células agregadas *in vitro* em matrizes; (iii) e regeneração *in situ*. Para implantes, as células individuais ou grandes agregados celulares do paciente ou doador são injetados diretamente no tecido injuriado ou são combinados com matriz degradável *in vitro*, e então implantados. Para implantação do tecido, é usado um crescimento *in vitro* de tecido completo em 3D, com suas células tendo alcançado a maturidade. Para regeneração *in situ*, a matriz é implantada diretamente dentro do tecido injuriado que estimula as células do próprio corpo a promoverem uma reparação do tecido local. Fonte de células podem ser autólogas (originadas do próprio paciente); células alógenas (originadas de doadores humanos as quais não são imunologicamente idênticas) e células xenogênicas (células originadas de espécies diferentes). Por cada categoria, pode-se delinear se as células são adultas ou embriogênicas (ambas são capazes de regenerarem e diferenciarem em variedades de linhagem de células) (GRAFFITH *et al.*, 2002). Com a limitação do uso de células embriogênicas, uma opção é a utilização na engenharia de tecido da MSC, linhagem de células mesenquimais. Elas estão presentes em uma variedade de tecidos durante o desenvolvimento humano e no adulto são prevalentes na medula óssea. Pode ser isolada e expandida em cultura, e estimulada a se diferenciar em osso, cartilagem, músculo, tendão, linhagem de medula e outros tecidos conectivos. Na engenharia de tecido, se constrói tecidos *in vitro* a partir dessa linhagem, reintroduzindo-as *in vivo*. Estudos avaliados concluíram que agentes indutores específicos governavam a regulação de cada via para uma linhagem específica. Este mecanismo envolve a secreção de fatores de crescimento e citocinas que, por sua vez, regulam outras proteínas, respondendo pelas características do fenótipo das células (ARNOLD; CAPLAN *et al.*, 2001). As células mesenquimais podem ser relativamente fáceis de serem isoladas usando marcadores específicos de células progenitoras do

pericondrium, periósteo, ou aspiração de medula óssea e expandida *in vitro*. Como são células raras (somente uma célula MSC por 100.000 células nucleadas), isolamento e expansão são exigidos para aumentar a população para os implantes. Essas células têm a vantagem de manter sua capacidade de diferenciar após seu crescimento de expansão (HEATH, 2000).

YOSHIKAMA *et al.* (2001) demonstraram a produção de células mesenquimais de medula a partir de cultura de medula óssea sanguínea acrescida de BMPs em sua cultura ancorada em matriz de colágeno (FIG. 3.20). No trabalho realizado por MINUTH *et al.* (1998) a experiência demonstrou que a engenharia de tecido deve ser feita em três principais etapas (Tabela III. 1). A primeira etapa é a reprodução das células feitas em cultura convencional no laboratório. Esta etapa compreende multiplicação suficiente, proliferação e espalhamento de células. A segunda etapa é a infiltração das células reproduzidas estáveis na biomatriz. Por um lado, a biomatriz é um importante requisito para o espalhamento tridimensional da célula; por outro lado, é a base para uma ótima diferenciação de tecidos (MINUTH *et al.*, 1998). A terceira etapa é a manutenção do fenótipo através do meio adequado.

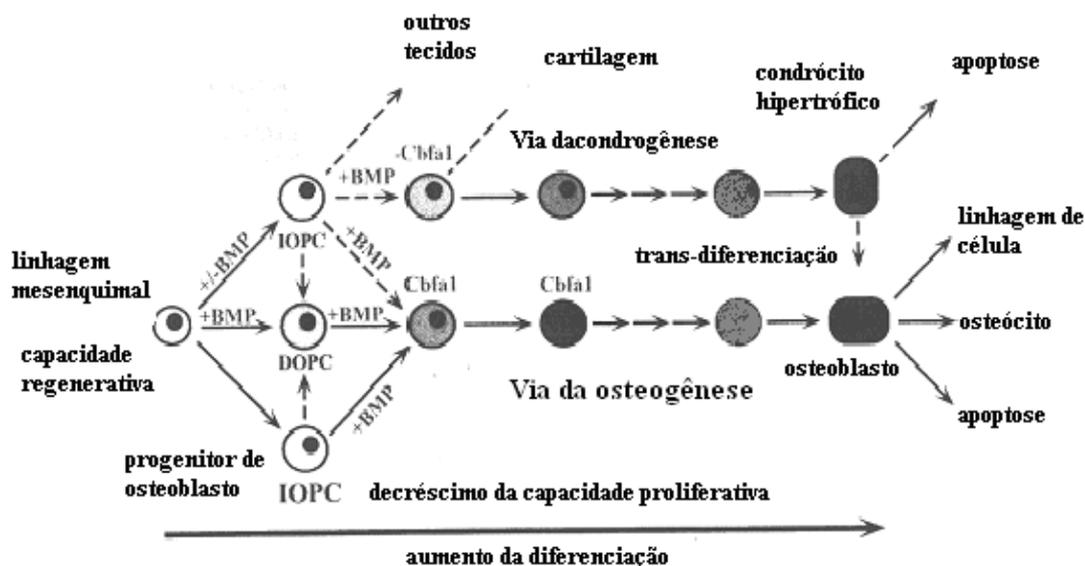


FIG. 3.20 -Modelo da diferenciação osteogênica com influência das BMPs e Cbfa1,

nos estágios iniciais da diferenciação celular. BMP: Proteína formadora de osso; DOPC: Célula osteoprogenitora determinante; IOPC: Célula precursora indutora de osso.

FONTE: BONE ENGINEERING, 2000.

TABELA III.1
Engenharia de Tecido

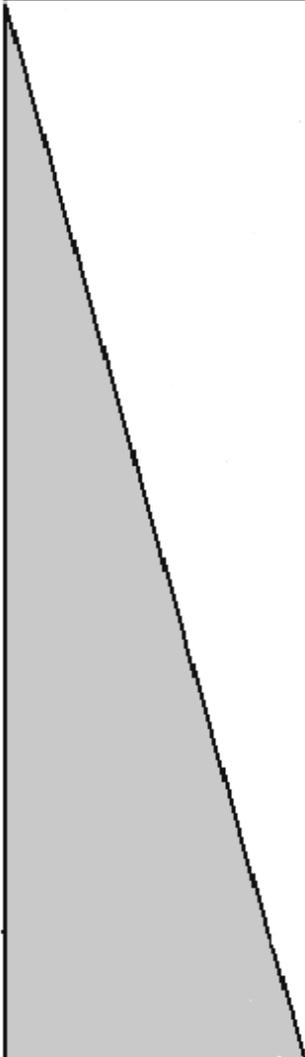
	<i>Etapa 1</i>	<i>Etapa 2</i>	<i>Etapa 3</i>
Necessidades	Multiplicação, Proliferação e Espalhamento.	Indução e Diferenciação.	Manutenção de Fenótipo.
Método	Cultura em placa de vidro.	Matriz otimizada por carreadores.	Meio de cultura estabilizado por perfusão de cultura.

FONTE: MINUTH *et al.*, 1998.

O caminho da diferenciação e proliferação a partir das células mesenquimais é complexo, contudo se conhece algum indutor nos vários estágios do mecanismo proliferativo. Durante a evolução dessas etapas mediadas por esses fatores, com frequência acontecem cruzamentos alternativos das vias de diferenciação. Condrócitos hipertróficos podem se transformar em osteoblastos que, por sua vez, podem mineralizar transformando-se em osteócito. Por interferências ainda desconhecidas, estas células osteoblásticas ou condrocitos podem se tornar apoptóticas (Fig.3.20).

Na tabela III.2 MINUTH *et al.* (1998) demonstram a relação do grau de diferenciação celular, com a dependência das necessidades para sua otimização e as implementações realizadas.

TABELA III.2
Ação sinérgica para diferenciação de tecido específico

Grau de diferenciação	necessidades	realizações
	ancoragem para otimizar a diferenciação	filtros e biomatizes porosas
	ECM otimizada	recobrimento com proteínas da ECM
	transporte de célula e tecido	manipulação adequada para carreamento de tecido
	eliminação de metabólitos e manutenção de fatores paracrine a níveis constantes	perfusão da cultura
	fatores de crescimento e diferenciação	Aditivos ligantes para matriz artificial
	proliferação versus inibição de contato	controlando o stress mitótico em meio sérico livre
	cultura a longo prazo	otimizando eletrólitos em meio de células humanas

FONTE: MINUTH et al., 1998.

HOLY et al. (1999) observaram, em seus resultados relacionados com a densidade de semeadura de células e período de cultura em matriz de PLGA, a superioridade da densidade de semeadura da ordem de 60×10^6 cel/cm³ e tempo de diferenciação ótimo em 14 dias, sendo que a mineralização acontece após terceira semana de cultivo. O mesmo resultado foi obtido com LAURENCIN *et al.* (1996) com relação ao tempo de diferenciação de células ósseas em matriz de PLGA/HA. Quando se leva em consideração a proliferação celular cultivada na matriz polimérica de vários materiais, a melhor taxa de crescimento foi observada nas duas primeiras horas após a

semeadura, acompanhada da melhor densidade de semeadura que corresponde a 1×10^5 cells/ml. (NIEDMANN-AL-AHMAD *et al.* (2002).

Durante a resposta inflamatória do tecido ao material implantado, leucócitos migram do sangue para o tecido, e macrófagos se tornam ativamente envolvidos na manutenção da resposta da inflamação crônica. O macrófago tem papel central na interação com o material implantado e com outras células. Eles estão envolvidos na adesão, ativação e secreção dentro do sítio ativo de implante. Uma vez ativados, eles secretam substâncias pro-inflamatórias, citocinas, interleucina 1 α , interleucina 1 β , interleucina 8 e fator de necrose de tumor α (TNF- α). Entretanto, monócitos/macrófagos recrutados, células T e células B secretam moléculas antiinflamatórias, incluindo IL-10 que, no ciclo, inibe a síntese de 1L-1 β , 1L-8 e TNF-1 limitando a extensão e duração da resposta inflamatória. No trabalho GRETZER *et al.* (2003), foi concluído que o PU induziu significativamente baixo número de apoptose e monócitos necróticos em cultura sem estímulo exógeno, comparando com outros materiais Ti, e PS. Esse mecanismo necessita, ainda, de estudos mais avançados direcionados às células progenitoras. Uma avaliação interessante que para ser especulada é se os diferentes precursores são recrutados quando em contato com vários tipos de materiais para a bioengenharia. Na FIG. 3.21 está sumarizada a expressão das proteínas que define sucessivos estágios de proliferação e diferenciação de osteoblastos. No estágio de diferenciação máxima, apresenta-se uma diversidade de expressão fenotípica. Observa-se a produção de osteopontina, BrdU, BSP na fase inicial de proliferação. Na fase seguinte, aparece um aumento de ALP. No estágio pós-proliferativo, o BrdU decresce, o nível de osteopontina vai baixando principalmente quando a via se dirige para a apoptose.

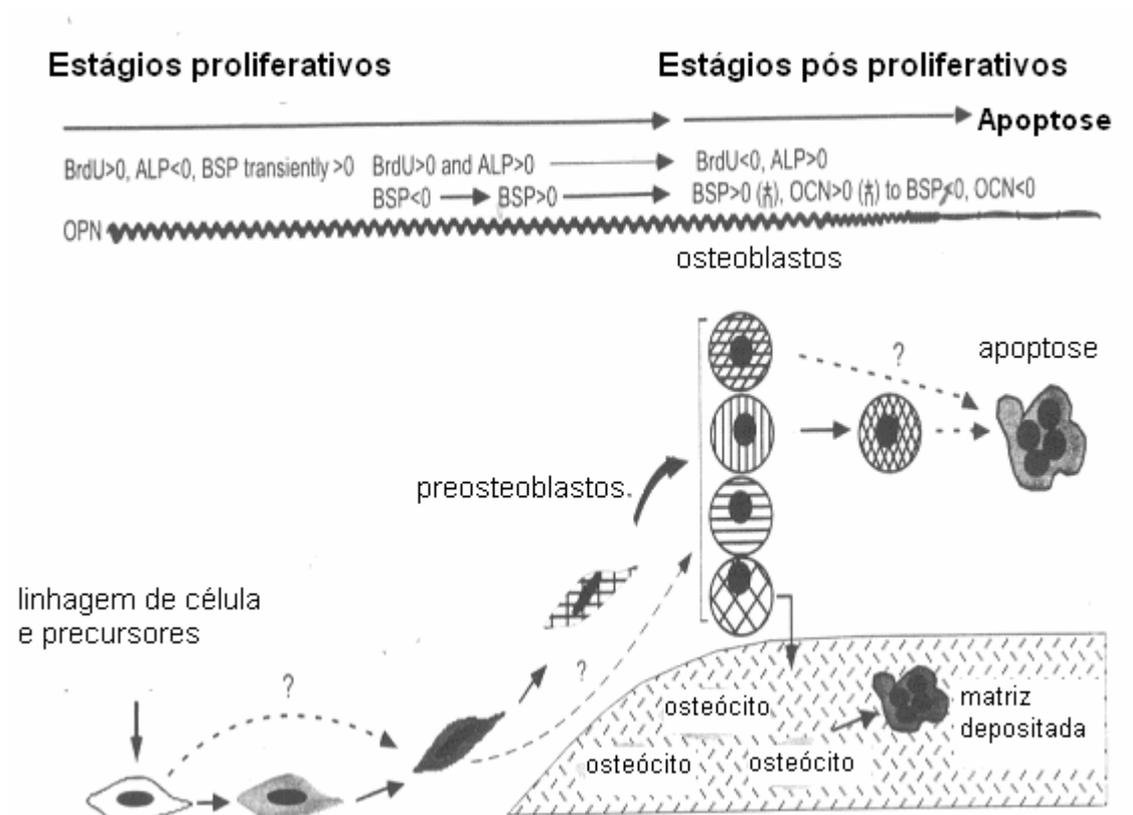


FIG. 3.21 - Sumário esquematizado da relação entre proteínas de expressão e diversidade de fenótipos expressos
 FONTE: BONE ENGINEERING, 2000.

Em estudos *in vitro* as BMPs e seus três subgrupos, BMP₂ ou ₄, BMP₋₃, BMP₋₇, têm demonstrado que estas citocinas induzem a diferenciação de células mesenquimais em várias linhagens de células (cartilagem, osso, tecido adiposo). Células de calvária de rato mostraram resposta aumentada para osteogênese quando BMPs são adicionadas na cultura. Interessante citar que membros da superfamília das TGFβs são achados em alta concentração em osso como as BMPs que são produzidas pelos osteoblastos. Geralmente as TGF-βs estimulam a expressão de proteínas da matriz por células osteoblásticas enquanto as BMPs não o fazem. O efeito anabólico das TGFβs é aumentado pela supressão da atividade degradativa da matriz através da inibição da metaloproteínase (MMP). Através da expressão transgênica de ratos, constatou-se o controle da TGF-β₂ pelo promotor da osteocalcina. Os múltiplos membros da superfamília das TGFβs estão envolvidos no controle da esquelotogênese e homeostase óssea (ENGINEERING, 2000).

A formação de osso sobre implantes segue os mesmos processos de diferenciação que ocorrem na formação de osso normal (FIG. 3.22). Forma-se sobre a superfície do

implante a mesma camada de cimento observada no processo normal. Após esta etapa, acontece a maturação e mineralização da matriz extracelular entremeando a matriz porosa do material. Outras proteínas, incluindo proteoglicanos, ácido glicolisilático, fibrilas de colágeno, cristais minerais e proteínas não colágenas como osteopontina e sialoproteína são essenciais para a mineralização dos tecidos. A osteocalcina, que representa menos de 15% das proteínas não colágenas, está envolvida no mecanismo de remodelamento ósseo. Ela é dependente da vitamina K, como sua antagonista. Há indicação de que a osteocalcina está envolvida na regulação da maturação mineral. Entretanto, a regulação da expressão gênica da OCN pelos hormônios osteotrópicos, como a vitamina D3 e PTH, juntamente com a habilidade do segmento terminal carboxila, age na quimioatração para precursores de osteoblastos, sugerindo sua influência na reabsorção óssea.

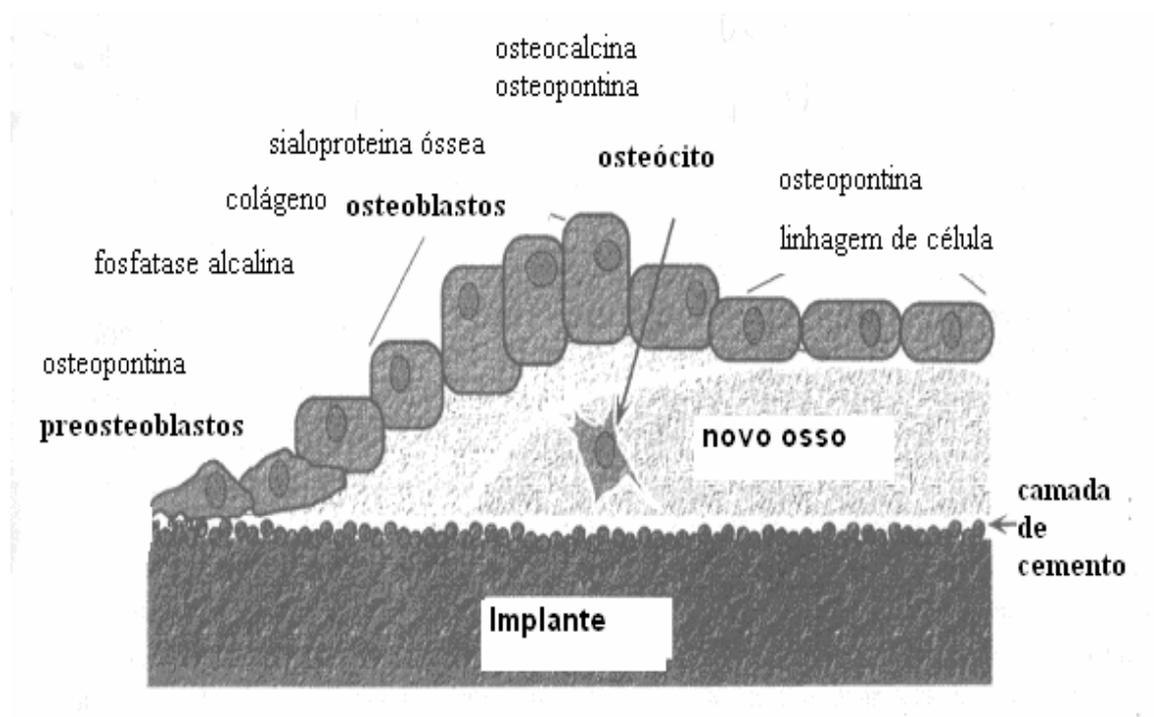


FIG. 3.22 - Formação óssea sobre a superfície do implante

FONTE: BONE ENGINEERING, 2000.

Na FIG. 3.22, pode-se observar o papel importante da osteopontina. Ela está associada na primeira fase de deposição inicial da camada de cimento. Subseqüentemente, sua expressão é importante na formação inicial da mineralização,

juntamente com a osteocalcina. Finalmente a OSP é um componente proeminente na matriz orgânica formada na superfície óssea, beneficiando a linhagem de células e lacunas de osteócitos vizinhos (FIG. 3.23).

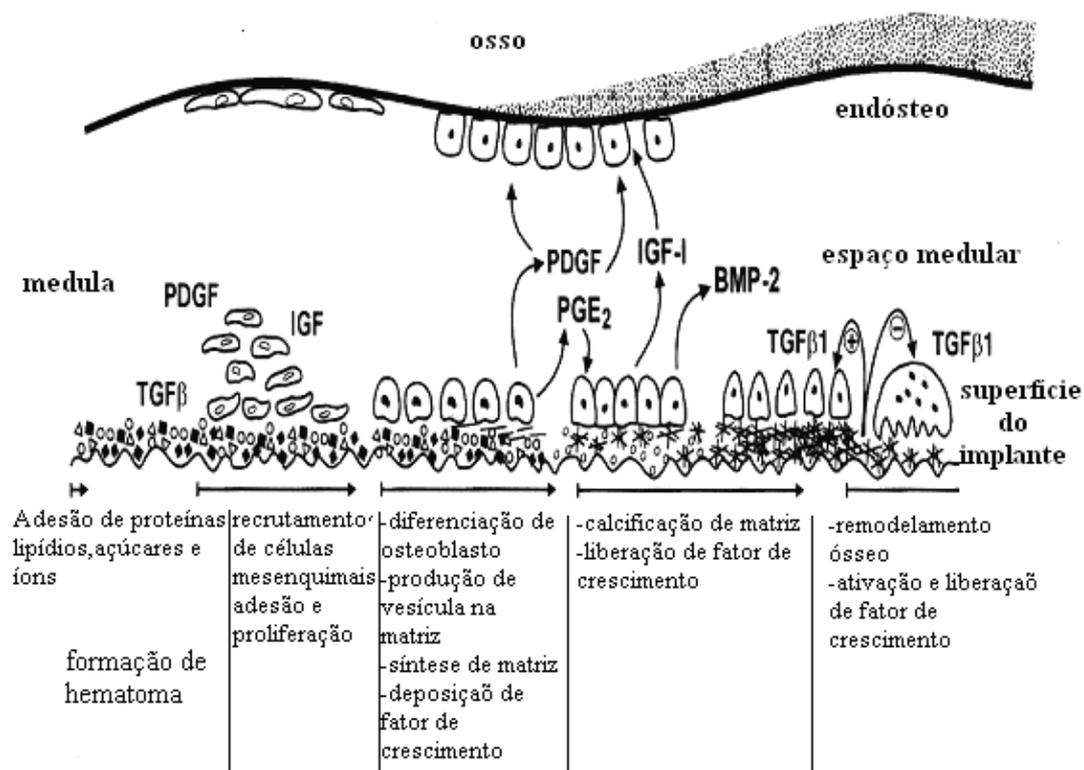


FIG. 3.23 - Esquema da seqüência dos fatores que induzem aglutinação de moléculas na superfície do implante

FONTE: BONE ENGINEERING, 2000.

3.6. VIABILIDADE

A cultura de células em matrizes sintéticas poliméricas deve ser avaliada em sua compatibilidade para com o material. Algumas técnicas de ensaios possuem uma boa sensibilidade para medir funcionalidade, estrutura das células ósseas, e citotoxicidade. A redução do sal de tetrazolium (MTT) tem sido extensivamente usada para demonstrar a capacidade de redução dos tecidos à proliferação quantitativa das células e sua citotoxicidade. Ele tem sido usado como ensaio específico para a funcionalidade mitocondrial e proliferação celular. (BERRIDGE, 1993). O teste MTT, desenvolvido por Mosmann, consiste em um ensaio colorimétrico baseado na formação de um composto púrpura em células com atividade metabólica intacta (FISCHER *et al.*, 2003). Outros testes utilizados por pesquisadores incluem a atividade da fosfatase alcalina, produção de colágeno e apoptose. Fosfatase alcalina é baseada na clivagem do grupo fosfato pela fosfatase alcalina presente nas células. Esta reação produz prótons que reduzem NBT para um precipitado púrpura. Este precipitado, após remoção do sobrenadante e solubilizado, é incubado e, por fim, sofre medição através de densidade óptica em 595nm. A produção de colágeno pelo osteoblasto é analisada pelo ensaio de SIRCOL. Este método está baseado na propriedade seletiva de ligação entre Syrius-rede e o tripeptídeo (gly-x-y). Por fim, o colágeno é solubilizado e medido pela análise de densidade óptica a 595nm, usando método comparativo entre concentração conhecida de colágeno tipo I e o cálculo da amostra baseado em regressão linear (VALERIO *et al.*, 2004). A funcionalidade dos osteoblastos se traduz no sucesso da resposta tecidual em contato com o biomaterial. A quantificação da osteocalcina usando anticorpo monoclonal em cultura de célula é uma forma adequada de verificar a indução de mineralização prematura do tecido ósseo neoformado (WIEDMANN-AL-AHMAD *et al.*, 2002). Para se obter visualizações do tecido cultivado em laboratório, autores fazem uso da técnica de laser confocal de varredura sobrepondo vantagens quando comparado à microscopia eletrônica de varredura. A estrutura e morfologia celular da amostra podem ser estudadas em vários níveis de profundidade com razoáveis detalhes. (ATTWIA *et al.*, 1995). O grau de degeneração e morte celular se traduz em insucesso da resposta do tecido à interação com o biomaterial. Essa avaliação medida pelo teste da apoptose leva à demonstração de falência de implante. É caracterizado pela detecção de fragmentos de DNA clivados, pela Dnase ativada, por uma cascata de caspases. É uma técnica de coloração chamada TUNEL que cora seletivamente e detecta apenas aquelas células que entraram em apoptose. Testes de avaliação de especificidade e afinidade para a

etapa inicial da adesão celular ao biomaterial são quantificadas pela técnica de imunofluorescência de anticorpo monoclonal TGF β_1 e β_1 (IMUNOBIOLOGIA, 2001).

3.7. ESTERILIZAÇÃO

Usualmente a esterilização de materiais aplicados à medicina é feita com sistema de autoclavagem (alta pressão) com secagem a quente. As técnicas mais comuns para esterilizar matriz de colágeno são o EO (óxido de etileno gasoso ou irradiação gama). O estudo realizado por NOAH *et al.* (2002) mostrou o impacto do processo de esterilização sobre a matriz do colágeno preparado para a engenharia de tecido. A esterilização com raios gama demonstrou ser mais simples e efetiva para esterilizar materiais sem produzir substâncias tóxicas; entretanto, este processo quebra ligações químicas, diminuindo a resistência da matriz de colágeno. Um trabalho de MASSON *et al.* (1997), realizado com nanopartículas de PCL esterilizadas com raios Gama (2,5 M Rad), usando o cobre como fonte, provocou depolimerização do PCL, deixando-o quebradiço, provavelmente provocado pela separação da fase cristalina. Revelou, também, uma acentuada instabilidade em sua estrutura indicada pela rápida degradação enzimática, uma vez em contato com o tecido. Por outro lado, a esterilização com infiltração de EO manteve as propriedades mecânicas e físicas da matriz, mas com alto risco de resíduos tóxicos. Esses resíduos sofreram uma redução a níveis compatíveis após duas a três semanas de aeração. (STAVRIDIS *et al.*, 2003 e RHAMAKRISHNA *et al.*, 2001). Outro método citado por CHANDRA *et al.* (1998) é a fotólise por raios ultravioleta, mas esta técnica gera radical livre e/ou íons que, freqüentemente, se direcionam para romper ligações, favorecendo a oxidação. Trabalhos realizados por CIAPETTI *et al.* (2003), KENAR *et al.* (2006) demonstraram a eficiência da esterilização em etanol 70% por 12 horas e lavagens múltiplas em PBS estéril.

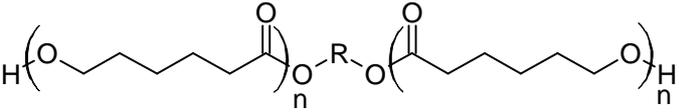
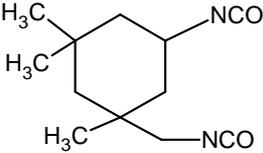
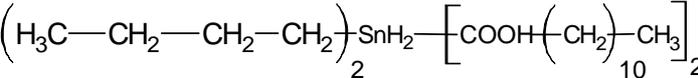
4. MATERIAIS

4.1. MATERIAL PESQUISADO

Para a síntese dos polímeros biodegradáveis utilizados neste experimento foram usados:

- a) PCL 1250 (Polysciences);
- b) PCL 2000 (Polysciences);
- c) Closite 30B (*Southerw Clay Products*);
- d) IPDI (isoforona diisocianato) (Bayer);
- e) Dibutil dilaurato de estanho (Liocat 118, Miracema Nuodex) - catalisador;
- f) Sulfato de condroitina A. Sal de sódio de traquéia de boi (Sigma - Aldrich);
- g) GRGDS (Sigma - Aldrich);
- h) PBS;
- i) HCL 1 N (Labsynth - Prod., SP);
- j) Etileno diamina (VETEC Química, RJ. Br.);
- k) ISO Propanol (Labsynth Prod., SP);
- l) WSC (Sigma Aldrich);
- m) Água deionizada;
- n) Purga;
- o) N₂;
- p) N dibutilamina;
- q) Metanol (Labsynth, Prod. SP);
- r) Azul de bromofenol;
- s) Vidraria.

Tabela IV.1 - Estrutura química dos reagentes utilizada na preparação do pré-polímero

<p>PCL 1250 policaprolactona diol Aspecto: Massa molar teórica: 1250g /mol Fornecedor: Polyscience.</p>	
<p>PCL 2000 policaprolactona diol Aspecto: Massa molar teórica: 2000g /mol Fornecedor: Polyscience.</p>	
<p>IPDI isoforona diisocianato. Aspecto: Líquido transparente eq.= 111,1 Bayer</p>	
<p>Dibutil dilaurato de estanho Aspecto: líquido viscoso amarelado Massa molar: 631,55g /mol Nome comercial: Liocat 118 Miracema Nuoclex</p>	
<p>Closite 30B Montmorilonita modificada com sal ternário de amônio Aspecto: pó branco Valor do espaçamento °001: 18,5 Å Fornecedor: Southern Clay Products (USA)</p>	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{T} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH} \end{array}$

4.2. OUTROS MATERIAIS E REAGENTES PARA ENSAIOS *IN VITRO*

São eles:

- a) ratos neonatos (Wistar. C. Bioterismo, 1 CB, UFMG);
- b) material cirúrgico;
- c) frascos e placas de cultura celular;
- d) pipetas de vidro;
- e) pipetadores automáticos;
- f) ponteiras descartáveis de 10, 200 e 1000 μ l;
- g) tubos Falcon de 15 e 50ml;
- h) tubos ependorfs de 500, 1500, 2000 μ l;
- i) anestésico;
- j) antibiótico e antimicótico;
- k) Kit para evidenciação de fosfatase alcalina GIBCO (BRL, NY, USA);
- l) Espectrofotômetro ELx 800 universal < Microplate Reader - Bio - Tek instruments, Inc. USA;
- m) SDS - (American Bioanalytical, Matick, USA);
- n) Kit para evidenciação de colágeno SIRCOL (Biocolor, Newtonabbey, NI);
- o) Kit para ensaio de MTT (Chemicon, Temecula, USA);
- p) tampão fosfato em várias concentrações;
- q) tripsina/EDTA;
- r) colagenase;
- s) meio de cultura RPMI (Sigma, ST. Louis, USA);
- t) soro Fetal Bovino (FBS) (Gibco BRL, NY, USA).

4.3. MATERIAL PARA ENSAIO *IN VIVO*

Foram utilizados:

- a) camundongos (Swiss, 8 semanas, C. Bioterismo ICB, UFMG);
- b) material cirúrgico estéril;
- c) reagentes para fixação e preparação do material para microscopia técnica hematoxilina /cosina;
- d) fotos realizadas com microcâmera JVC TK C720V;
- e) captura de fotos microscópio Axiolab/CARL Z/ESS

5. METODOLOGIA

5.1. SÍNTESE DE POLIURETANO

O poliuretano foi sintetizado a partir da fusão dos polióis poli (ϵ - caprolactona) de pesos moleculares 1250 (50% > 30,23 gramas) e 2000 (50% > 48,33 gramas) em balão à temperatura de 70°C. Em presença de N₂ e agitação constante, acrescentou-se o IPDI (21,44 gramas) e solução catalisadora a 10% (0,2 catalisador para 1,8 de acetona) (GUELCHER *et al.*, 2005).

Após a homogeneização da mistura, dispersou-se lentamente o MMT, mantendo a agitação por 2 (duas) horas à temperatura constante.

Completado o tempo protocolar, foi feita a dosagem de NCO pelo método da N-dibutilamina.

$$\text{PCL - 1250} \rightarrow 30,23 \rightarrow \text{eq. } \frac{625}{\text{eq}} = \underline{m} = 0,048368$$

$$\text{PCL - 2000} \rightarrow 48,33 \rightarrow \text{eq. } \frac{1000}{\text{eq}} = \underline{m} = 0,04833$$

$$1\text{PDI} \rightarrow 21,44 \rightarrow \text{eq} = 111,1 = 0,1929792$$

$$\text{n}^\circ \text{ eq de OH } \frac{\quad}{\text{n}^\circ \text{ eq}} \text{ PCL 1250} + \frac{\quad}{\text{n}^\circ \text{ eq}} \text{ PCL 2000} = 0,096698$$

$$\text{n}^\circ \text{ eq de NCO} = 0,1929792 \rightarrow \frac{\text{NCO}}{\text{OH}} = 1,99$$

$$\text{Cálculo do NCO teórico} = \text{n}^\circ \text{ eq de NCO} - \text{n}^\circ \text{ eq do total OH} = 0,0962812$$

$$\% \text{ de NCO teórico} = \frac{\text{n}^\circ \text{ eq excessos} \times \text{eq NCO}}{m} \times 100 = \frac{0,0962812 \times 42 \times 100}{100g} = 4,04$$

O procedimento consiste em misturar 50ml de N-dibutilamina com 10 gramas da amostra do material. Agitar e aquecer até o início da ebulição. Esfriar e adicionar 100ml de metanol. Titular com HCl 1 N.

Peso da amostra 9,78 gramas

$$\% \text{ NCO} = \frac{(47 - 37,3) \times 1,0005 \times 4,202}{9,78}$$

$$\% \text{ NCO} = 4,16$$

$$\% \text{ NCO} = \frac{(V \text{ branco} - V \text{ amostra}) \times f \times 4,202}{\text{peso da amostra}}$$

. f = fator do HCl 1 IN (especificado no frasco do reagente)

Com o resultado de 4,16, próximo do % NCO teórico, calcula-se a quantidade de H₂O para adicionar ao polímero com o objetivo de formar espuma através da reação de desprendimento de CO₂

$$\text{H}_2\text{O} = \frac{\text{Peso do PU} \times \% \text{ NCO} \times \text{eq H}_2\text{O}}{\text{eq NCO} \times 100}$$

$$\text{H}_2\text{O} = \frac{80 \times 4,16 \times 18}{42 \times 100} = 1,42 \text{ gramas H}_2\text{O}$$

A mistura da água ao material provoca reação imediata de liberação de gás originando uma matriz porosa. O material então é vazado em moldes previamente definidos e mantido em estufa por 24 horas a 70°C - 80°C de temperatura (FIG. 5.24) (AYRES, 2002 e SPAANS *et al.*, 2000).

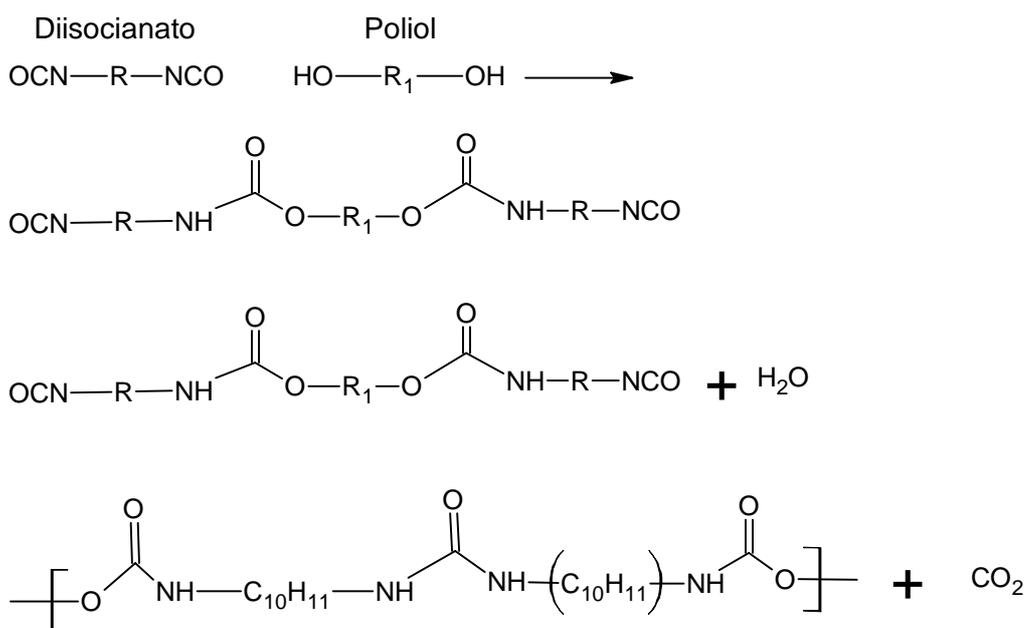


FIG. 5.1 -.Estrutura do poliuretano e seus intermediários

5.2. IMOBILIZAÇÃO DO GRGDS E SC

A matriz porosa foi cortada em formato de cubos com arestas de 3 mm a 5 mm aproximadamente, com o devido cuidado de retirar as superfícies que fizeram contato com o molde e com o ar.

A primeira etapa foi a limpeza do material em etanol e água deionizada na proporção de 1/1 por 2 (duas) horas. O objetivo deste procedimento é a remoção de impurezas produzidas pelo corte e gorduras impregnadas durante a manipulação (YABIN ZHU *et al.*, 2002).

Segundo o protocolo, para se obter uma ligação forte entre o peptídeo/sc e a superfície do polímero é necessária induzir um condicionamento da carbonila com subsequente imobilização das biomacromoléculas através da aminólise (YABIN ZHU *et al.*, 2002).

A ativação das ligações foi realizada através da imersão das amostras em uma solução de etilenodiamina (4 gramas para 100ml em isopropanol) por 10 minutos a 37°C sob agitação leve. Em seguida, lavou-se com água deionizada por 24 horas (ORBORNE *et al.*, 1999).

A segunda etapa foi a obtenção de uma ligação intermediária entre uma amina disponível na superfície do material por uma extremidade e o peptídeo /sc por outra.

Produziu-se uma solução de 0,1g de WSC em 100ml de água deionizada com o pH ajustado entre 4-5.

Acrescentou-se HCl 1 N para equilibrar o pH da solução. Fez-se a imersão das amostras por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação leve. Lavou-se várias vezes com água deionizada.

A terceira e última etapa foi a exposição de todo o complexo em uma solução de 0,001 M de GRGDS em PBS por 2 (duas) horas à temperatura ambiente sob agitação leve (YANG *et al.*, 2005). Lavou-se com PBS por 15 minutos e, logo depois, em HCL 1 N por mais 15 minutos. Foi usado o mesmo procedimento para propiciar a ligação com

SC, inclusive a mesma concentração de 0,001 M de SC (YOON *et al.*, 2004 e DENG *et al.*, 2005).

Concentrações: 4,58mg SC para 70ml PBS e 4,90mg de GRGDS.

5.3. ADSORÇÃO DO GRGDS /SC

O mesmo material preparado para a imobilização de GRGDS/SC foi usado para sofrer uma adsorção superficial com ligações fracas nas mesmas soluções, sem contudo, sofrer qualquer tipo de tratamento químico específico. Foram imersos nas soluções GRGDS/SC em concentrações 0,001 M por 24 horas na geladeira.

Neste estágio do experimento, as amostras foram assim distribuídas:

- 1 amostra de PU/MMT com SC adsorvido;
- 1 amostra de PU/MMT com GRGDS adsorvido;
- 1 amostra de PU/MMT com SC imobilizado;
- 1 amostra de PU/MMT com GRGDS imobilizado.

5.4. ESTERILIZAÇÃO

Foram usados 4 (quatro) tipos diferentes de esterilização para este material, assim classificados:

- a) amostra de PU/MMT sem tratamento, foi esterilizada com raios Gama na medida de 12.000 rad. (CDTN - CNEN, Gama Cell - fonte Co 60);
- b) amostra de PU/MMT sem tratamento foi esterilizada em autoclave por 30 minutos a 121°C;
- c) amostra de PU/MMT com SC adsorvido foi esterilizada pelo método do etanol 70%;
- d) amostra de PU/MMT com SC adsorvido foi esterilizada pelo método de óxido de etileno;
- e) amostra de PU/MMT com GRGDS adsorvido foi esterilizada com etanol 70%;

- f) amostra de PU/MMT com GRGDS adsorvido foi esterilizada com óxido de etileno;
- g) amostra de PU/MMT com SC imobilizado foi esterilizada com etanol 70%;
- h) amostra de PU/MMT com GRGDS imobilizado foi esterilizada com óxido de etileno.

A esterilização pelo método do etanol consiste em imersão da matriz porosa em uma solução de etanol /água deionizada na proporção 70 /30 por 24 horas e subsequente lavagem exaustiva com PBS e filtro estéreis dentro do fluxo laminar, tendo o cuidado de mantê-las em PBS e bem vedadas até o momento do plaqueamento em células (CIAPETTI *et al.*, 2003).

A técnica de esterilização com óxido de etileno foi realizado pelo Hospital Vera Cruz de Belo Horizonte.

A esterilização com raios Gama foi obtida junto ao departamento CDTN - CNEN com aparelhagem Gama Cell - fonte C_o 60.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ DE PU

5.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise através da MEV foi utilizada para a observação da interconectividade e tamanho dos poros da matriz: a marca do equipamento utilizado foi Jeol, modelo JSM - 6360 LV.

5.5.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Foi realizada análise das amostras por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com método de reflexão total atenuada (ATR). O espectômetro usado foi o Paragon 1000, da Perkin Elmer, cobrindo a faixa de 650 a 4000cm⁻¹.

5.6. CULTIVO DE OSTEOLASTO

5.6.1. Isolamento e cultura

A captação de células osteoblásticas para a cultura e plaqueamento seguiu o protocolo utilizado pelo laboratório de imunologia e biologia celular da UFMG, caracterizado pelas seguintes etapas:

- a) sacrificar 6 ratos neonatos (3 a 5 dias) e expor a calvária, após feito o escalpo; limpar os ossos parietais e todos os tecidos aderidos e dissecar;
- b) dentro do fluxo - colocar os ossos dissecados dentro dos tubos Falcon (15ml) contendo, aproximadamente, 10ml em cada um de PBS estéril à temperatura ambiente. Picotar levemente as bordas dos fragmentos na placa de Petri;
- c) mergulhar os ossos em solução 1% de tripsina /0,5% EDTA em Ducks salina por 15 minutos a 37°C na estufa fechada;
- d) descartar a tripsina e colocar na colagenase 0,2% por 20 minutos a 37°C;
- e) descartar a colagenase e células do passo anterior e repetir o procedimento com a colagenase (20 minutos a 37°C);
- f) transferir as amostras para outro banho de colagenase (20 minutos , /37°C) e guardar as células do segundo banho;
- g) centrifugar as células do segundo banho por 5 (cinco) minutos a 800 rpm. Descartar o sobrenadante e ressuspender em um meio preparado (5ml) e transferir para a placa de cultura. Incubar em CO₂ por algumas horas e depois aspirar e adicionar o meio de cultura cuidadosamente (5ml de meio) para eliminar células não aderidas. Recolocar o meio (5ml);
- h) transferir as amostras para o quarto banho (20 min.) a 37°C e guardar as células do terceiro banho;
- i) repetir a etapa g para as células do terceiro banho;
- j) repetir a etapa g para as células do quarto banho.

Manter as garrafas com células plaqueadas em meio em uma estufa para cultura a 37°C, 5% CO₂ e atmosfera 95% de ar. O crescimento será aguardado até a confluência para que possam ser repicadas.

Meio de cultura RPMI

- 1 frasco de RPMI
- 10ml de antibiótico e antimicótico em 1/100 (PSA)
- 1,5ml de gentamicina (200 micromolares)
- 26,7ml de bicarbonato 7,5%

5.6.2. Repicagem, contagem e plaqueamento

As células indicadas para cultivo "*in vitro*" são as originadas do crescimento da primeira confluência, isto é, células da passagem 2 (P₂). A repicagem, conseqüentemente, aumenta também o nº de células disponíveis para o experimento. Seguindo os passos do protocolo de repicagem:

- a) lavagem com PBS de 2 caixas de cultura (T₂₅) confluentes de cultura de osteoblastos > 5ml por caixa (duas vezes);
- b) colocar 1ml de tripsina em cada caixa, agitar e controlar visualmente ao microscópio o destacamento das células da caixa;
- c) acrescentar 9ml de meio de cultura e ressuspender várias vezes;
- d) aspirar 5ml e colocar em outra caixa de cultura;
- e) incubar.

Após a confluência das células nesta etapa, faz-se o plaqueamento e semeadura em poços de cultura (24 poços) com o material com a densidade de 5×10^4 cel / μ L contados em hemocitômetro.

As unidades individuais de polímero foram manipuladas dentro do fluxo e inseridas dentro de cada poço com meio de cultura.

A placa de cultura foi previamente incubada por 1 (uma) hora para que as células em suspensão entrassem no processo de adesão na placa.

Foram plaqueados 3 (três) poços de controle e triplicatas de 3 (três) poços. Foi feita a leitura após a incubação por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂.

Os cubos de, aproximadamente, 2 a 3 mm de amostra de matriz de poliuretano com 5% de argila Closite 30B foram esterilizados com raios Gama a 12000 rad. e inseridos previamente em meio de cultura.

5.6.3. Ensaio *in vivo*

As amostras de PU foram implantadas em camundongos em triplicata com as seguintes considerações:

- a) cada tipo de amostra foi implantado subcutaneamente no dorso de camundongos fêmeas através de anestesia e cirurgia com posterior sutura;
- b) após 10 dias, cada camundongo com um tipo de amostra foi sacrificado por deslocamento cervical e foi retirada cada peça de PU com reabertura cirúrgica e fixada em formalina. Foram feitas duas lâminas com 5 cortes de cada material e corada com a técnica para HE (hematoxilina eosina);
- c) após 14 dias, foi feito o mesmo procedimento com mais 10 amostras, sendo estas fixadas em glutaraldeído 2,5%, para tratamento posterior com tetróxido de ósmio com finalidade de visualização em MEV; (SANTIAGO *et al.*, 2006).
- d) após 29 dias foram retiradas as últimas 10 amostras e processadas para lâminas histológicas (HE).

5.6.4. Ensaio de MTT

O ensaio de MTT (placa de 24 poços) para o cultivo "in vitro" de osteoblasto seguiu o seguinte protocolo:

- a) aspirar todo o meio;
- b) colocar 210µL de MTT (5mg /mL);
- c) incubar a placa 2 (duas) horas em estufa a 37°C, 5% CO₂;
- d) observar no microscópio a formação de cristais;
- e) colocar 210µL de 10%SDS-HCl;
- f) incubar a placa *overnight* em estufa a 37°C, 5%CO₂;
- g) retirar 100µL de cada poço e ler a 595nm;
- h) branco: 170µL de meio + 170 MTT.

Soluções

- a) MTT estéril: 5mg /mL em PBS, filtrar com membrana 0,22 e manter a 4°C, no escuro;
- b) SDS 10%-HCl: 10g de SDS em 100mL de água + 333µL de HCl concentrado (colocar 100µL de HCl concentrado para cada 30mL de solução. Manter a temperatura ambiente e colocar timerosal para evitar a contaminação.

5.6.5. Ensaio de fosfatase alcalina

A leitura de fosfatase alcalina (placa de 24 poços) foi feita nas células.

F.A. célula:

- a) aspirar todo o meio e reservar em um *ependorf*;
- b) lavar a placa 2X com PBS 0,15M estéril;
- c) colocar 200µL da solução de BCIP /NBT;
- d) incubar a placa 2 (duas) horas em estufa a 37°C, 5%CO₂;
- e) observar no microscópio;
- f) colocar 200µL de SDS - 10%HCl;
- g) incubar a placa *overnight* em estufa a 37°C, 5%CO₂;
- h) retirar 100µL de cada poço e ler a 595nm;
- i) branco: 100µL NBT /BCIP + 105µL SDS.

Soluções

- a) solução de BCIP /NBT - 4,4µL NBT + 3.3µL BCIP + 1mL de tampão da fosfatase alcalina; preparar na hora;
- b) SDS 10%-HCl - idem MTT;
- c) Tampão da fosfatase alcalina (100mM MgCl₂, pH 9.5):

Tris-HCl (MW 157.60)	- 15.80 g
NaCl (MW 58.44)	5.80 g
MgCl ₂ (MW 203.31)	1.02 g
Água destilada	900 ml

Ajustar o pH para 9,5 e completar o volume para 1l. Estocar a temperatura ambiente.

5.6.6. Ensaio de colágeno

A dosagem de colágeno foi medida somente no sobrenadante de acordo com o protocolo:

Dosagem de colágeno (placa de 24 poços)

No sobrenadante celular

Tubos *ependorf* 1,5ml

- a) Padrão - colocar nos tubos 25, 50, 75, 100mg de colágeno em duplicata. Ajustar o volume para 100 μ L com ácido acético 0,5 M. Fazer duplicatas;
- b) amostras - colocar de 10 a 100 μ L do sobrenadante celular e completar o volume para 100 μ L com ácido acético 0,5 M;
- c) adicionar 1ml de Sircol Red em cada tubo. Incubar por 30 minutos a 37°C sob agitação;
- d) centrifugar os tubos a 5000 rotações por minuto, por 5 minutos, para compactar o precipitado no fundo do tubo;
- e) descartar a solução corante do sobrenadante e secar bem o tubo;
- f) adicionar 1 ml de NaOH 0,5M até solubilizar o pellet;
- g) retirar 100 μ L e ler a 540nm;
- h) branco da amostra: NaOH 0,5M.

Soluções

- a) HCl 0,01 N: 120 μ L de HCl + 100ml de H₂O;
- b) Sircol Red: dissolver 1mg /ml de Sircol Red em solução aquosa saturada de ácido pícrico;
- c) NaOH 0,5M - 2g em 100ml de água deionizada;
- d) Ácido acético 0,5M - 2,86ml de ácido acético glacial em 100ml de água.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi usado o T-teste para análise estatística dos ensaios de MTT e colágeno com resultado de $P < 0,05$ (alta confiabilidade).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. MEV

As fotos feitas através da microscopia eletrônica de varredura com aumentos de 25x, 50x e 1000x, FIGS. 6.1a 6.1b e 6.1c, mostram uma alta interconectividade entre poros do nanocompósito, sendo este um pré-requisito para a proliferação celular de tecidos (SUSAN *et al.*,1997).

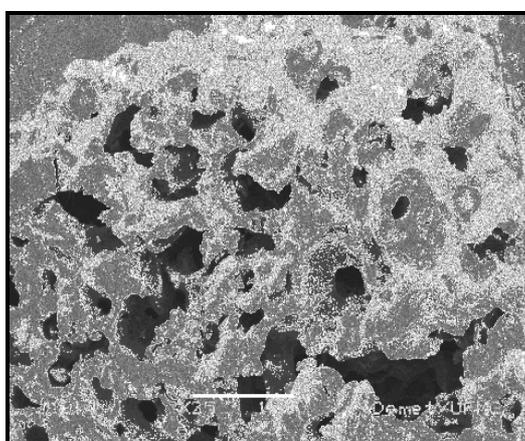


FIGURA 6.1a - PU - DI 25x

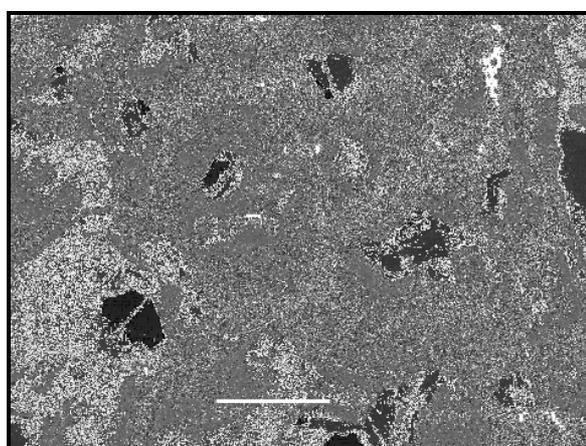


FIGURA 6.1b - PU -DI 50x

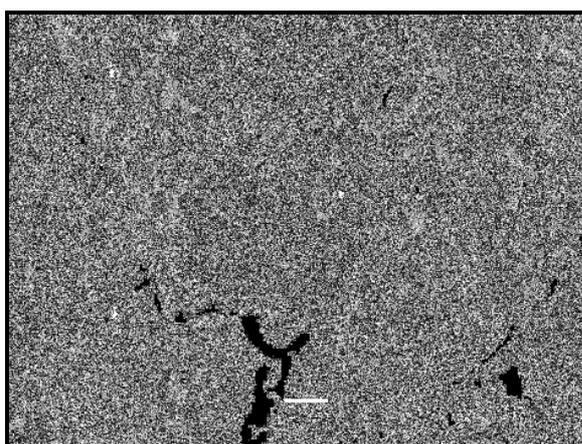


FIGURA 6.1c - PU - DI 1000x - Estrutura em MEV da matriz de poliuretano indicando alta interconectividade e porosidade adequada para regeneração de tecido.

O tamanho dos poros variou entre 184 μ m a 327 μ m, como mostrado na FIG. 6.1b. Os achados demonstraram que o tamanho médio do poro suficiente para promover adesão, infiltração e proliferação celular óssea é de, no mínimo, 100 μ m (SUSAN *et al.*, 1997).

Com 21 dias de material implantado no dorso de camundongos, foi feita retirada e preparação dos materiais para a microscopia eletrônica. Nas FIGS. 6.2, 6.3, 6.4 e 6.5 aparecem colônias de células agregadas ao material não tratado quimicamente, visualizando, também, revestimento superficial de fibras características da matriz extracelular. Esse fato sugere uma boa compatibilidade do material com tecido vivo. Deve ser ressaltado que na FIG. 6.2 foi feita a imagem do corte no interior do PU, isto é, encontra-se grande quantidade de células que migraram e proliferaram para o interior dos poros da matriz polimérica, concluindo que esse material com estas características macroscópicas da sua estrutura, permite, além da compatibilidade, migração celular para dentro das estruturas porosas.

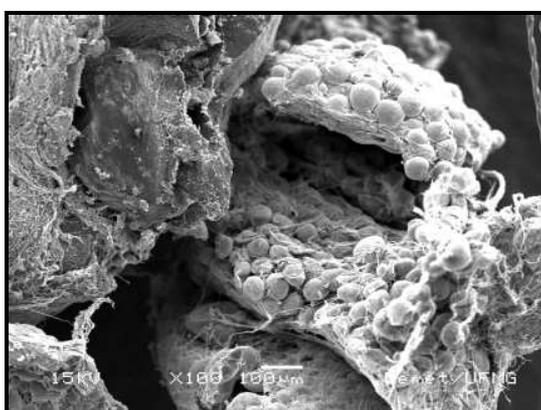


FIG. 6.2 - 100x - Poros com colonização de células

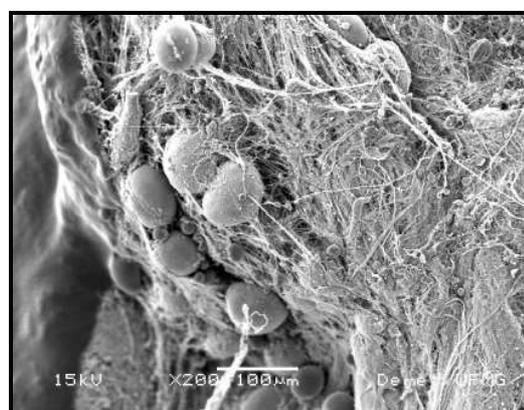


FIG. 6.3 - 200x - Rede de fibras e células agregadas ao material

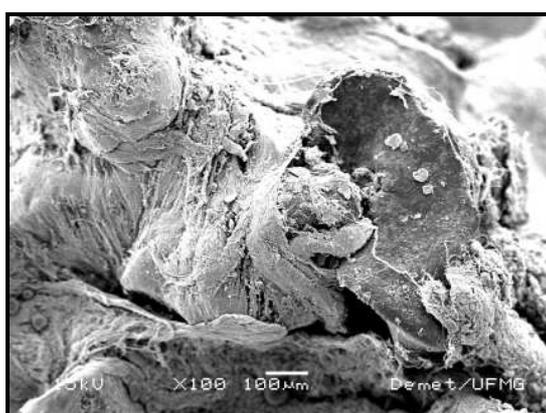


FIGURA 6.4 - 100x - Fibras revestindo o material polimérico

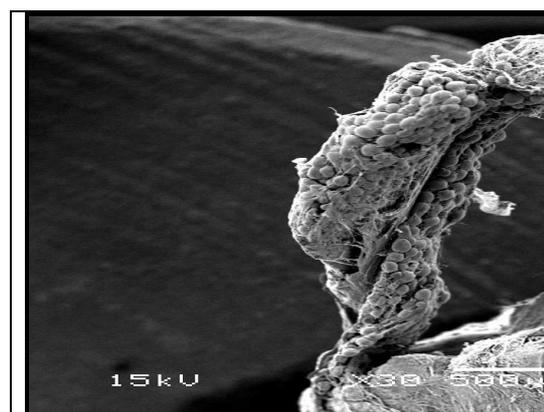


FIG. 6.5 - 30x - Um apêndice do PU todo envolvido por células

Nas figuras 6.6, 6.7, 6.8 e 6.9 observam-se poros do PU tratado (submetido ao tratamento químico para imobilização de peptídeos GRGDS e SC) com presença de uma massa de tecido necrótico, sem presença de estruturas celulares definidas.

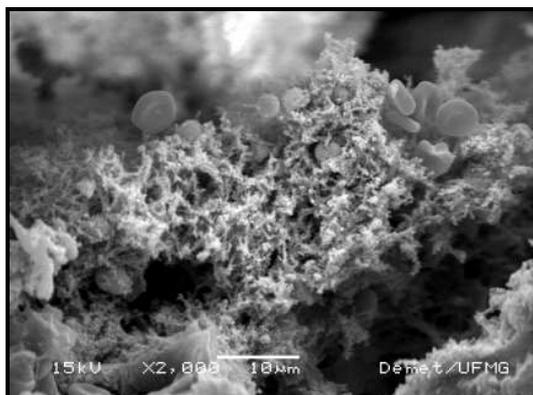


FIG. 6.6 - 2000x - Tecido necrótico e hemácias

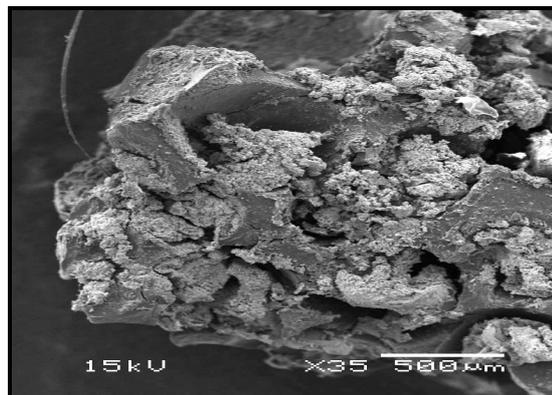


FIG. 6.7 - 35x - Poros com tecido necrótico em amostras tratadas

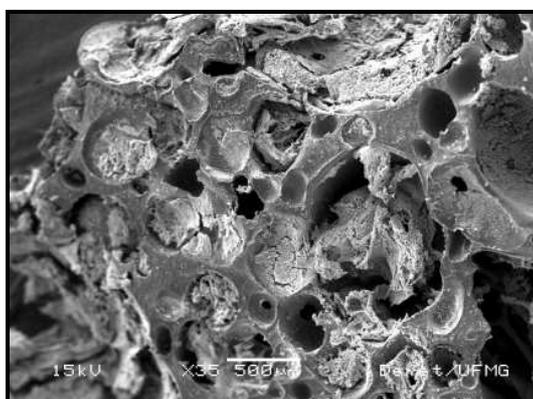


FIG. 6.8 - 35x - Poros com tecido necrótico em amostras tratadas

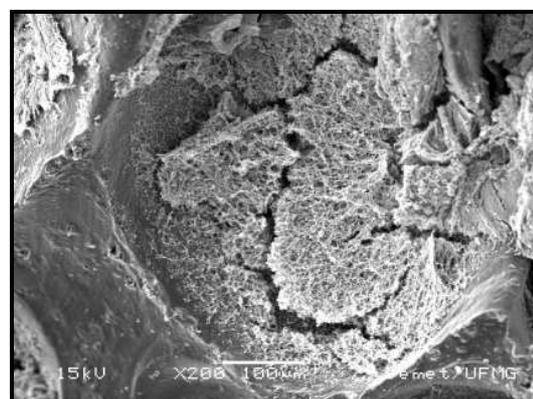


FIG. 6.9 - 200x - Poro em escala aumentada com tecido degenerado em seu interior

Amostras preparadas aos 21 dias de implantação

6.2. DIFRAÇÃO DE RX

PATTANAYAK *et al.* (2005) e XIA CAO *et al.* (2004) demonstraram que pequenas quantidades de partículas inorgânicas dispersadas em PU (3-5 wt%) provaram ser suficiente para um enorme ganho nas propriedades mecânicas do polímero. Além desses resultados, a alteração da estrutura molecular do poliuretano com argila pode ser observada no ensaio de DRX.

O difratograma do PU puro mostrou duas bandas (FIG. 6.10): a primeira em $2\theta = 20^\circ$ difusa, representando uma certa organização da estrutura do polímero e a segunda banda em $2\theta = 45^\circ$ representando um segmento do polímero com arranjo cristalino de espaçamento entre lamelas de $2,064 \text{ \AA}$.

Superpondo os resultados do difratograma do PU puro, argila (closite 30B) (FIG. 6.11) e PU + argila, observam-se bandas de pequena intensidade características da argila pura. Observa-se, também, a modificação da principal banda (deslocamento para valores mais baixos e redução da intensidade) da argila $2\Theta = \pm 5^\circ$ e da banda do PU puro em 20° , significando uma parcial desestruturação, intercalação e esfoliação, onde parte da argila permaneceu na forma original (FIG. 6.13).

Em uma ampliação na região de $2\Theta < 10^\circ$, o pico de difração relativo aos planos (001) da argila pode ser observado com pouca intensidade assinalanda a presença de parte da argila com estrutura original (FIG. 6.13).

A interação entre argila e nanocompósito possibilitou uma maior cristalização do PU, induzida pela presença física da argila (FIGS. 6.10 e 6.12). Isto pode ser notado através da presença de picos mais definidos na DRX (FIG. 6.12).

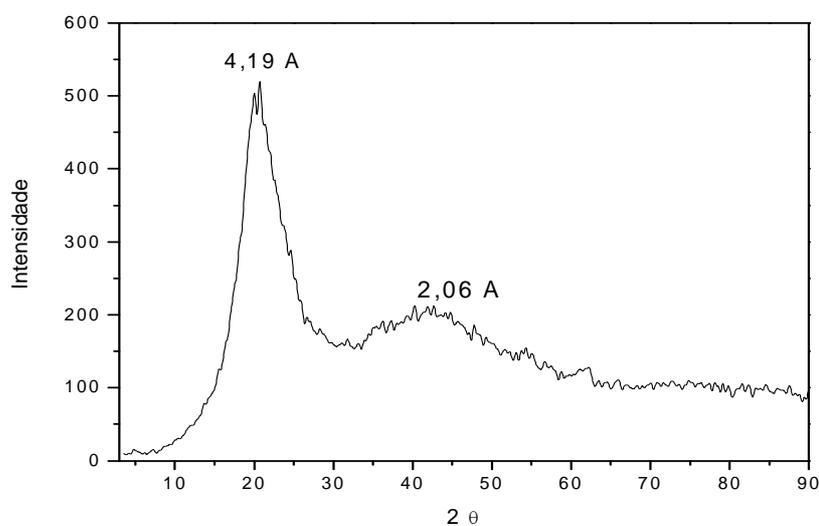


FIG. 6.10 - Estrutura molecular amorfa característica do poliuretano

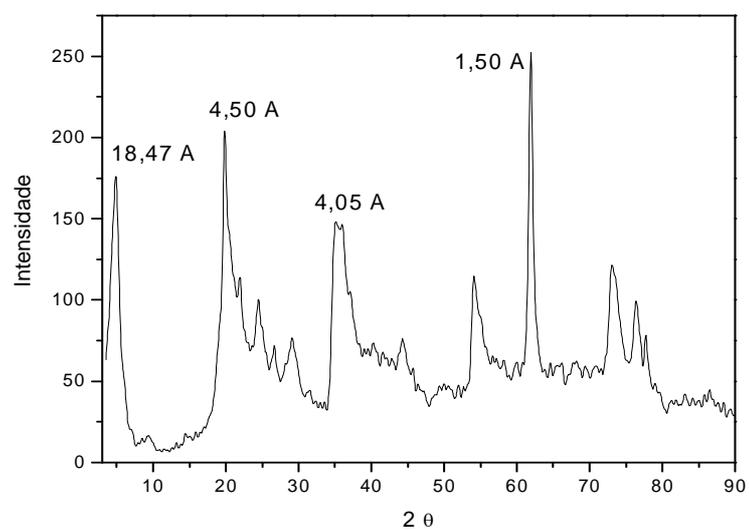


FIG. 6.11

Argila com bandas características de sua estrutura cristalina

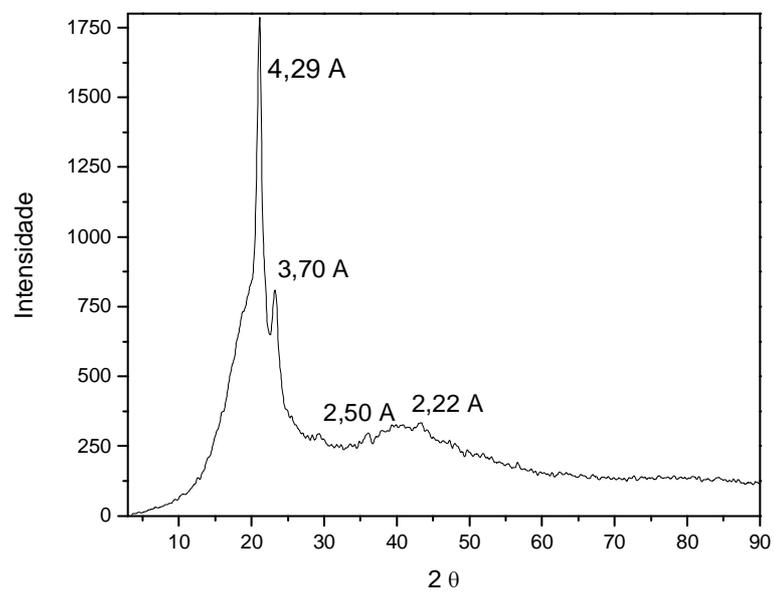


FIG. 6.12 - Maior cristalização do polímero após a incorporação do MMT

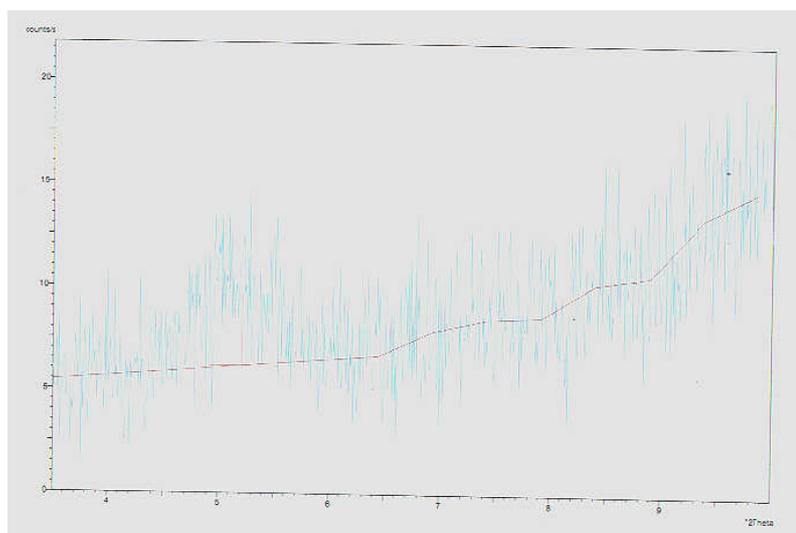


FIG. 6.13 - $2\theta < 10^\circ$ - Deslocamento da banda em valores e intensidade

6.3. ATR - FTIR

A figura 6.14 mostra os espectros de FTIR para poliuretanos biodegradáveis com e sem a presença de nanopartículas de argila. Apresentam-se regiões de absorção características da policaprolactona e ligação uretana como: carbonila da ligação uretana (1725cm^{-1}), amida (1640cm^{-1}) e ligação éter (1150cm^{-1}).

No PU sem argila aparece uma banda 1725 cm^{-1} (carbonila do uretano) e 1640 (carbonila da uréia). No nanocompósito, a altura da banda 1640cm^{-1} em relação à da banda 1725 cm^{-1} é menor. Esta observação foi atribuída ao maior número de ligações uretano devido às hidroxilas presentes na argila. Nesse caso, um número menor de grupo NCO ficaram disponíveis para formação de ligações uréia (SCHOONOVER *et al.* 2003 e HAUGEN *et al.*, 2004).

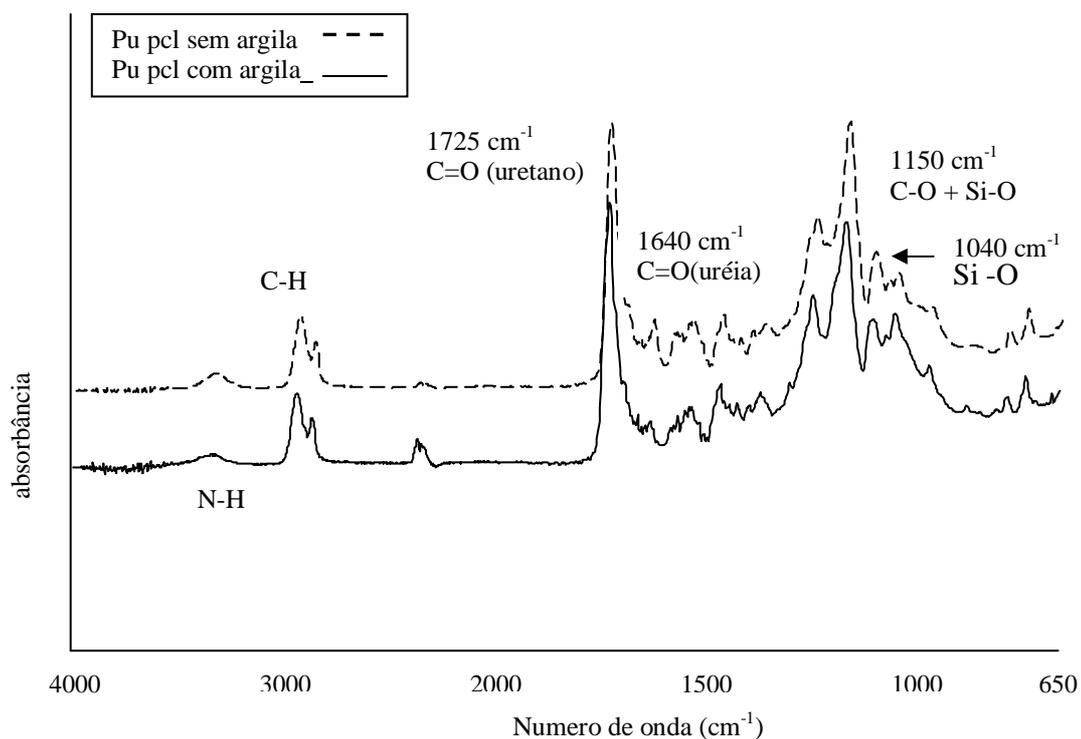


FIG. 6.14 - FTIR de PU com argila e sem argila com bandas diferenciadas em 1725cm^{-1} , 1640cm^{-1} , 1150cm^{-1} e 1040cm^{-1}

Os espectros de infravermelho confirmam ainda a incorporação da argila MMT, cuja região principal de absorção está na faixa de 1040 cm^{-1} (ligação Si - O) (ASIM P. *et al.*, 2005) (FIG. 6.15)

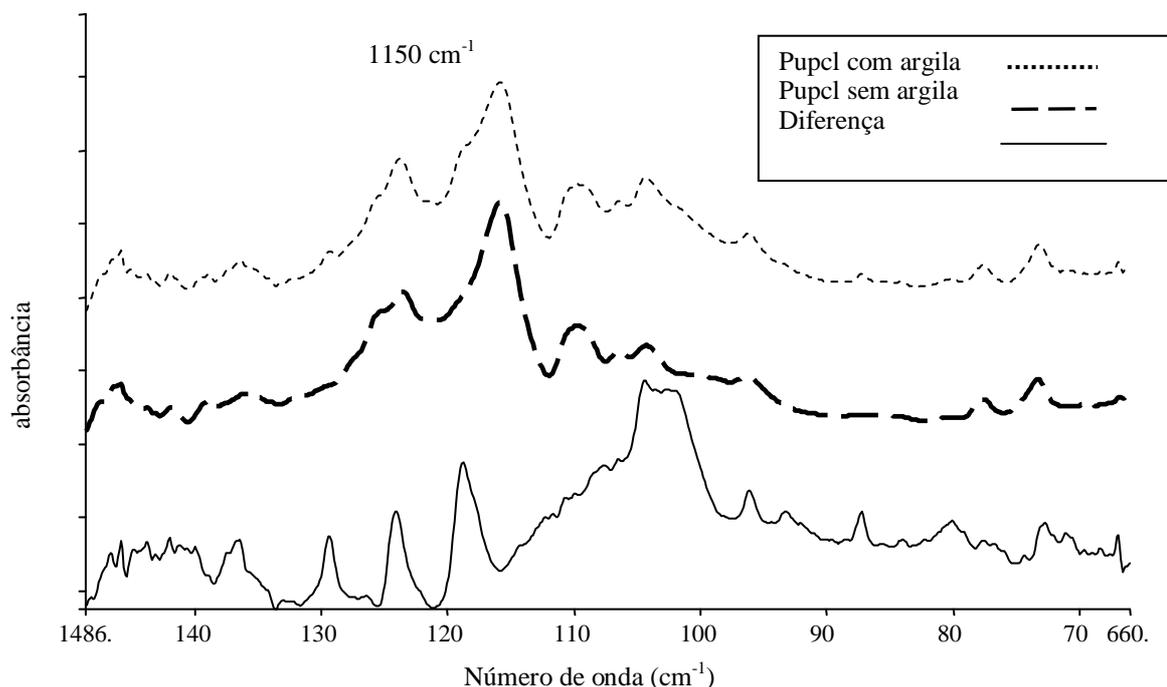


FIG. 6.15 - FTIR. Ampliação da região de ondas em 1150cm^{-1} entre PU e PU+argila

Nos espectros da FIG. 6.16, comparando-se o PU com MMT sem o tratamento e PU com MMT com tratamento para induzir ligações covalentes com o peptídeo RGD, observa-se um alargamento da banda em 1110cm^{-1} relacionado com o aumento de ligações C-O (éter) (DONG *et al.*, 2002), sugerindo algum tipo de mudança molecular processada no tratamento na matriz que resultaria em ligações covalentes do peptídeo (HO *et al.*, 2005) e/ou mesmos processos de degradação oxidativa do polímero.

Na FIG. 6.17 pode ser observada a banda em 1150cm^{-1} do PU + GRGDS com esterilização com raios gama que se apresenta com maior intensidade, sugerindo maior quantidade de ligações C-O traduzidos como degradação do material através da oxidação (HIRATA *et al.*, 1995).

Por outro lado, o PU /MMT com tratamento para induzir ligações fortes com SC, observou-se um alargamento da banda em 1150cm^{-1} , sugerindo um aumento de ligações C-O em sua estrutura, como, também, um aumento da banda em altura em 1380cm^{-1} , significando maior quantidade de ligações CH (vibração) (FIG. 6.17) (FOOT *et al.*, 2005 e WANG *et al.*, 2003).

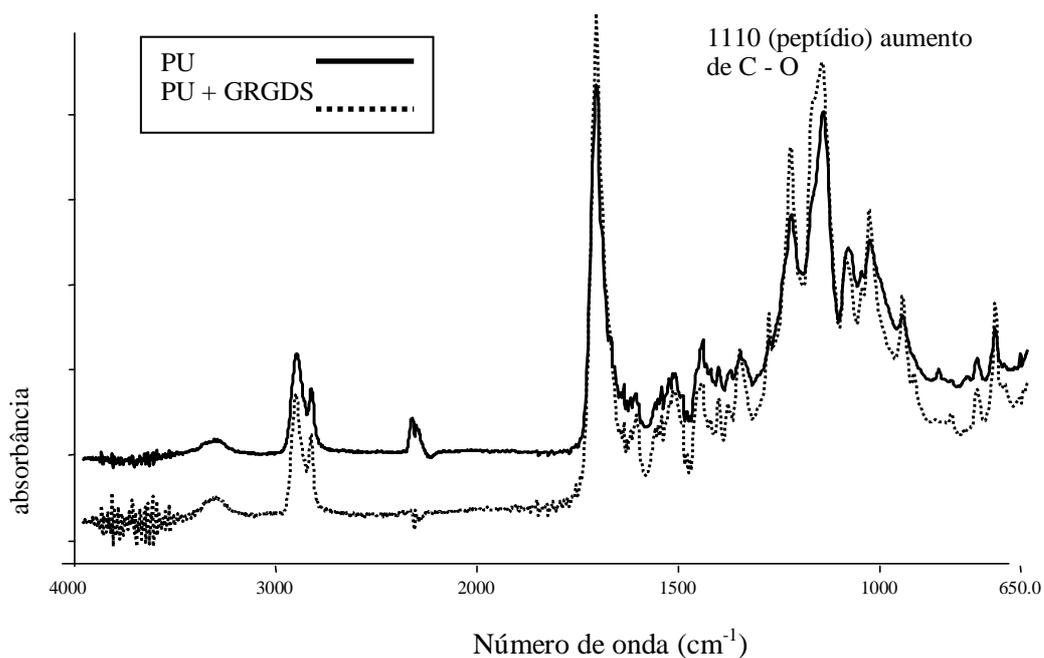


FIG. 6.16 - FTIR de PU e PU+GRGDS sugerindo diferenças entre as estruturas em 1110cm^{-1}

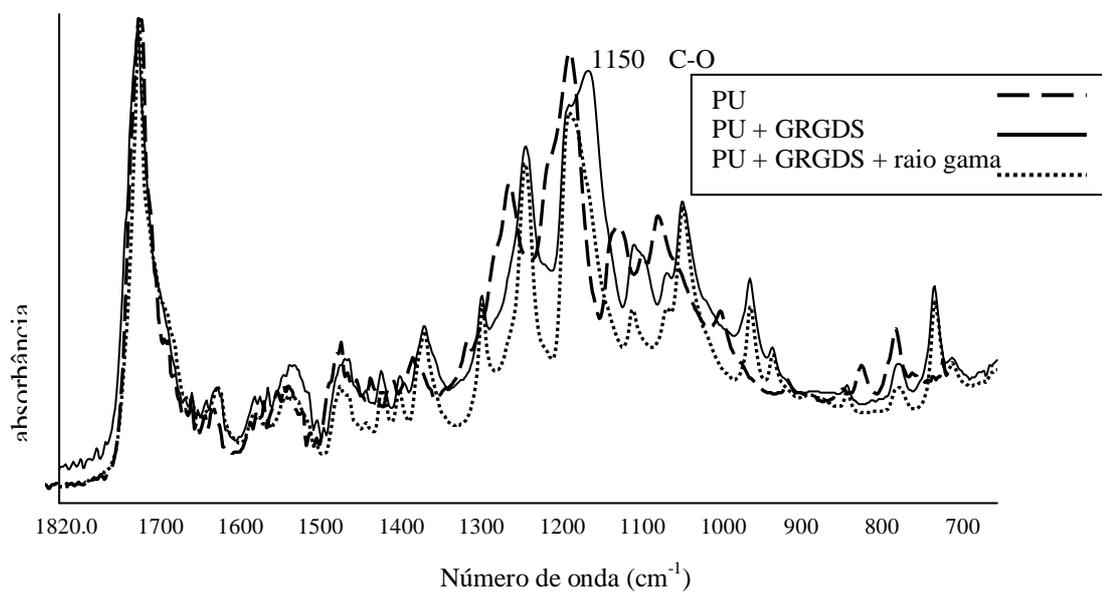


FIG. 6.17 - FTIR apresentando diferenças de bandas na região de 1150cm^{-1}

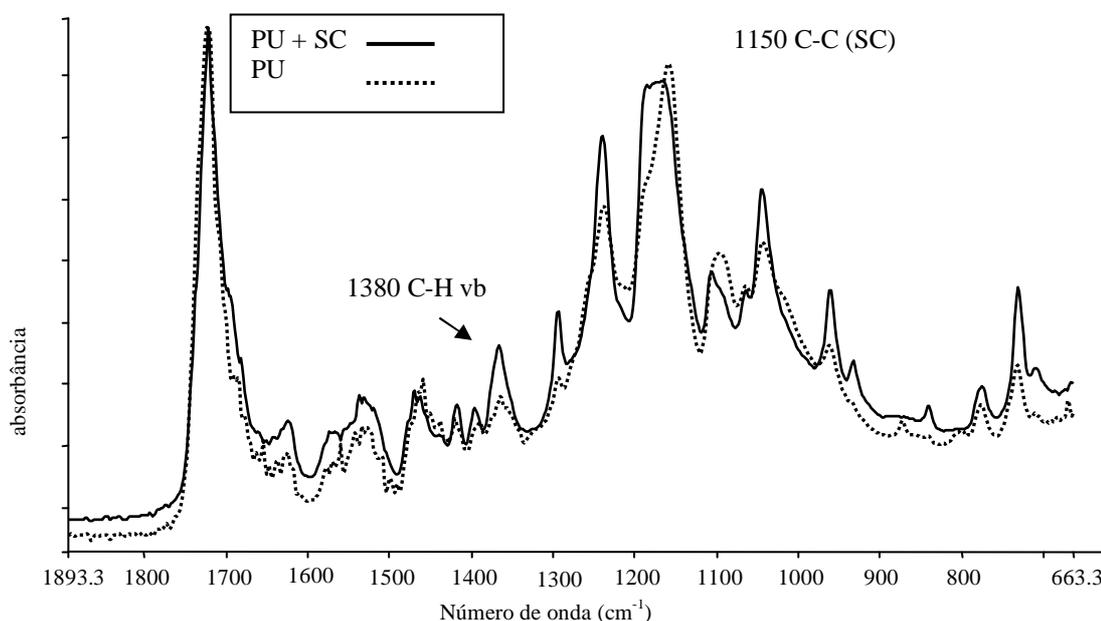


FIG. 6.18 - FTIR apresentando alargamento de banda em 1150 e 1380 cm^{-1}

6.4. CULTURA *IN VITRO*

Os resultados dos ensaios em cultura "in vitro" de osteoblastos são revelados a seguir:

O nanocompósito sem nenhum tratamento superficial e esterilizado com raios Gama promoveu proliferação e crescimento de osteoblastos, demonstrado assim através dos ensaios de MTT, fosfatase alcalina celular e colágeno (FIG. 6.19 e 6.20).

As fotos, obtidas através de microscopia ótica, mostradas nas figuras 6.21 e 6.22 demonstram a rica presença de osteoblastos tanto junto ao material como no controle.

Todos os demais materiais que sofreram tratamento específico para induzir ligações com SC e GRGDS promoveram morte celular. Este resultado pode ser explicado pelas características estruturais das matrizes, onde alguns poros, possivelmente com pouca interconectividade, retiveram em seu interior (apesar de exaustiva lixiviação), químicos utilizados para tratamento de condicionamento de superfície. Uma vez em cultura, são altamente tóxicos para as células.

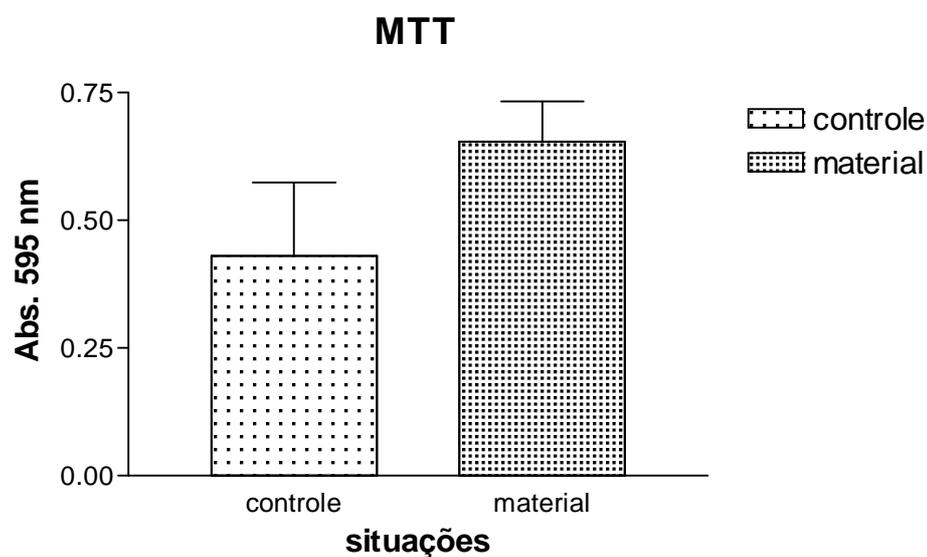


FIG. 6.19 - Teste de viabilidade do PU em osteoblastos ($P < 0,05$)

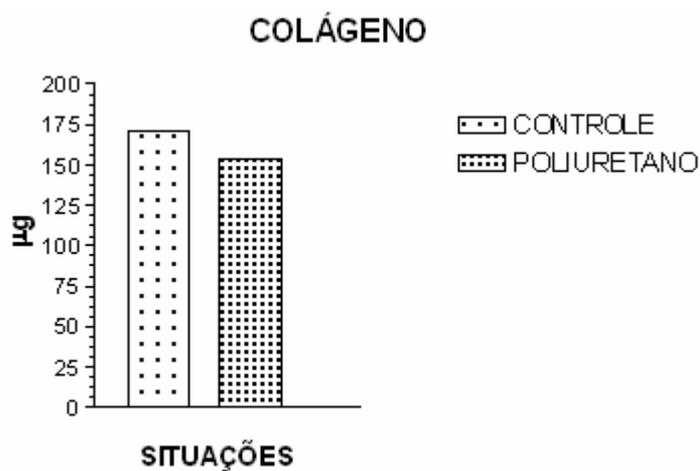


FIG. 6.20 - Produção de colágeno pelo controle e PU sem diferenças significativas ($P < 0,05$)

Mesmo levando em consideração os diferentes tipos de esterilização, podemos inferir que, em alguma etapa do processamento, a modificação química superficial contribuiu para o comprometimento da biocompatibilidade do material. Na FIG. 6.27 pode-se observar a presença de osteoblastos degenerados próximos à superfície de um poliuretano tratado quimicamente.

O ensaio MTT mostra a presença de cristais de formazam secretados pelas células osteoblásticas, significando a presença de células vivas e funcionais, tanto na cultura do controle (FIG. 6.24) como em PU com MMT (FIG. 6.23).

Depois da lise da membrana celular e solubilização dos cristais foi feita a quantificação em 595nm no espectrofotômetro. Na figura 6.19 pode ser observado um aumento significativo de 44% na proliferação de célula em relação ao controle, sugerindo uma boa viabilidade do material em contato com células do tecido ósseo ($P < 0,05$).

Da mesma forma, observa-se nas figuras 6.25 e 6.26 a produção de fosfatase alcalina secretada pelas células tanto no controle como no meio com o material. Essa enzima está envolvida na mineralização do tecido ósseo. A fosfatase alcalina presente na membrana dos preosteoblastos e osteoblastos é comumente usada como um marcador citoquímico, distingue osteoblasto do fibroblasto e, funcionalmente, atua atraindo cálcio livre circulante. Estudos demonstraram que a produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos, quando estes estão em contato com diferentes biomateriais, tem um comportamento alterado, dependendo da composição destes biomateriais (VALÉRIO, 2005).

Podemos deduzir que as células em contato com o biomaterial estão cumprindo a função de mineralizar o tecido circundante, através da secreção pelos osteoblastos de fosfatase alcalina.

A cultura nos materiais tratados, por sua vez, responderam negativamente ao ensaio de fosfatase, uma vez que as células já estavam degeneradas (FIG. 6.28).

O colágeno é a principal proteína de matriz secretada pelos osteoblastos e um importante marcador da atividade osteogênica. É viável avaliar a interação entre tecido ósseo e biomateriais com diferentes características, pela quantificação da síntese do colágeno pelos osteoblastos, que podem ser estimulados ou inibidos por substâncias liberadas pelos biomateriais no meio.

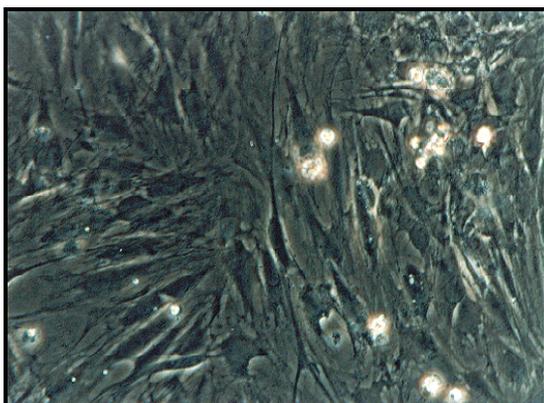


FIG. 6.21 - Osteoblastos em presença do biomaterial

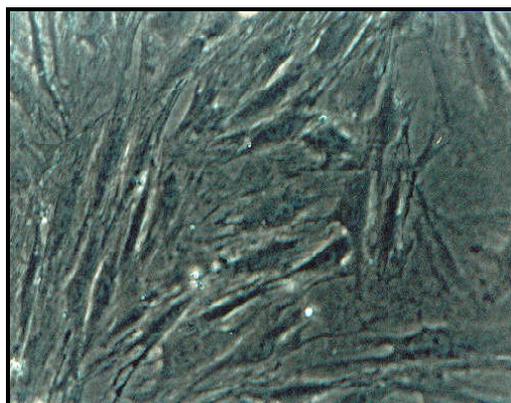


FIG. 6.22 - Osteoblastos do controle

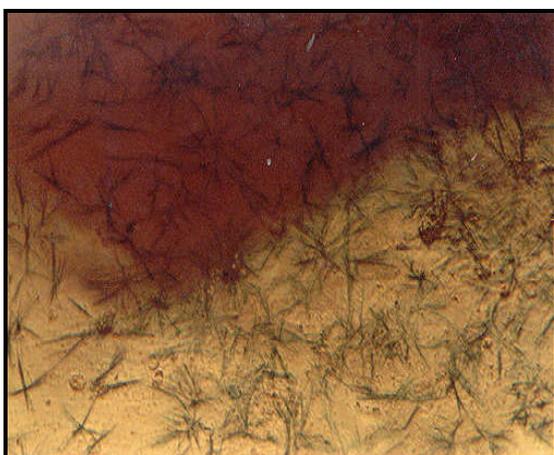


FIG. 6.23 - Ensaio de MTT em cultivo do biomaterial

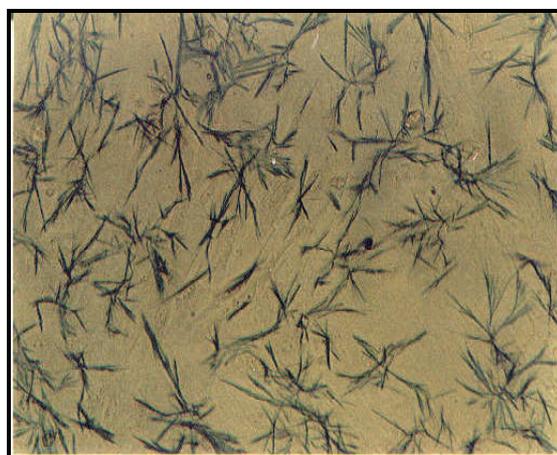


FIG. 6.24 - Ensaio de MTT da cultura do controle



FIG. 6.25 - Ensaio de FA do biomaterial

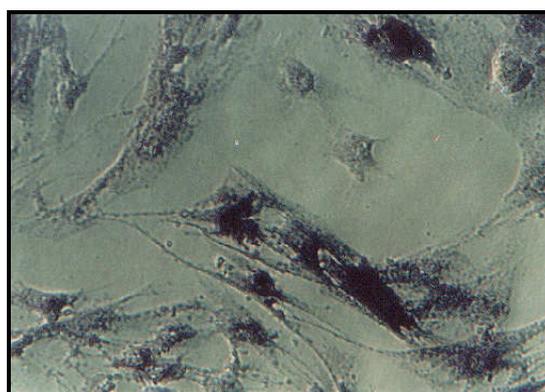


FIG. 6.26 - Ensaio de FA do controle

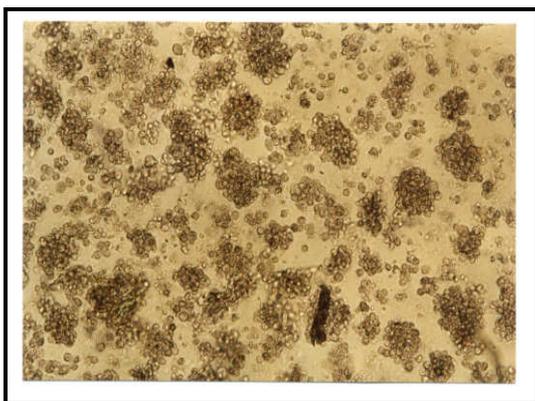


FIG. 6.27 - Osteoblastos degenerados sobre o material

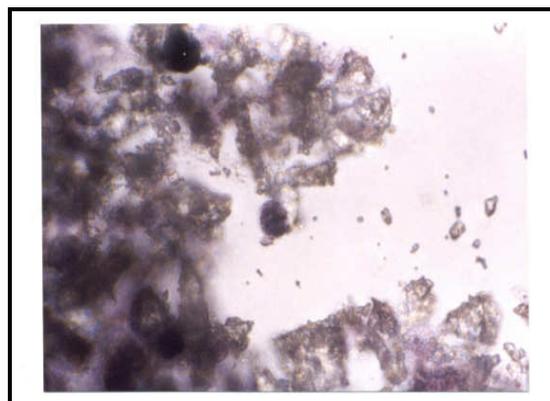


FIG. 6.28 - Ensaio de FA em osteoblastos degenerados

Na fig. 6.20 observa-se uma produção de colágeno semelhante entre produção de colágeno do osteoblasto do controle (175 μ g) e do meio com biomaterial (155 μ g). Esse ensaio demonstra que o biomaterial testado é funcional, pois induz secreção de colágeno, principal fibra constituinte da matriz extracelular.

6.5 ENSAIO *IN VIVO*

As amostras dos materiais que foram implantados subcutaneamente, foram retiradas e analisadas histologicamente com 14 dias e com 29 dias. Com 21 dias, as amostras foram retiradas e preparadas para o MEV.

Nas lâminas processadas com 14 dias pode ser observado nas figuras 6.29, 6.30 e 6.31 referentes ao nanocompósito sem tratamento e esterilizado com raio Gama, formação de um tecido onde estão presentes, linfócitos, fibroblastos, endotélio e formação angiogênica com hemácias, sugerindo uma boa biocompatibilidade do material. Nos demais materiais implantados (FIG. 6.32) observa-se tecido necrótico e hemorrágico com debris celulares, sugerindo uma alta citotoxicidade por parte dos materiais tratados quimicamente. Aos 29 dias de observação do material implantado, foram feitos cortes histológicos onde confirmam os primeiros resultados em que o PU não tratado apresentou tecido organizado e crescimento angiogênico acentuado como, também, os materiais que sofreram processo de tratamento químico apresentaram tecido necrótico (FIGS. 6.33, 6.34, 6.35 e 6.36).

As técnicas de detecção usadas neste trabalho não forneceram dados referentes à posição de ligação tridimensional (exposição de sítio ativo) das macromoléculas incorporadas ao material.

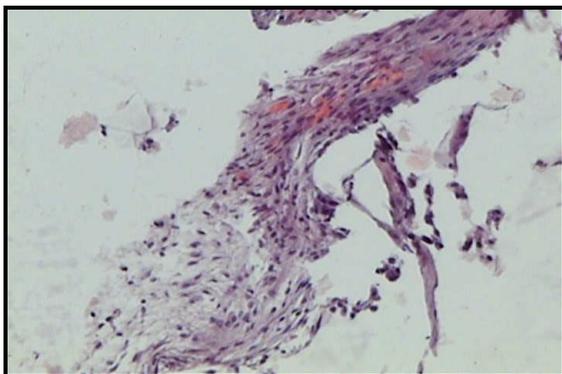


FIG. 6.29 - Tecido organizado sobre o PU (10x)

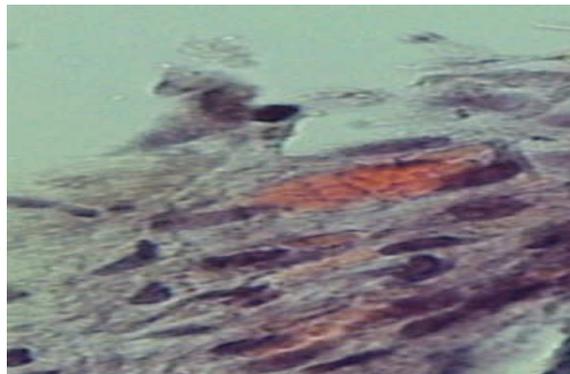


FIG. 6.30 - Tecido com grande processo de vaso angiogênese e hemácias (40x)

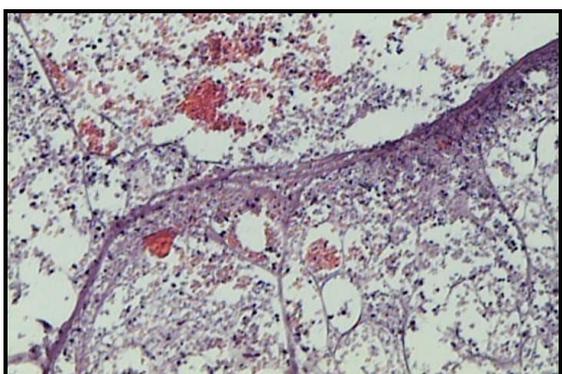


FIG. 6.31 - Tecido organizado com vaso e hemácias (20x)

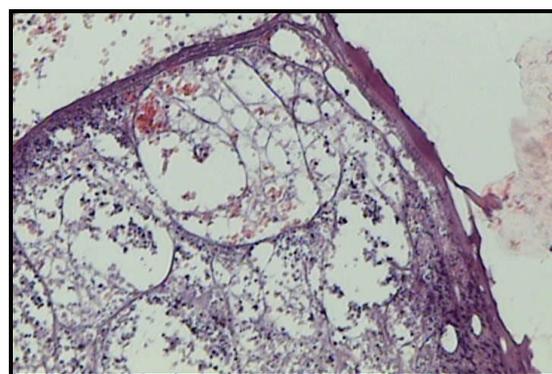
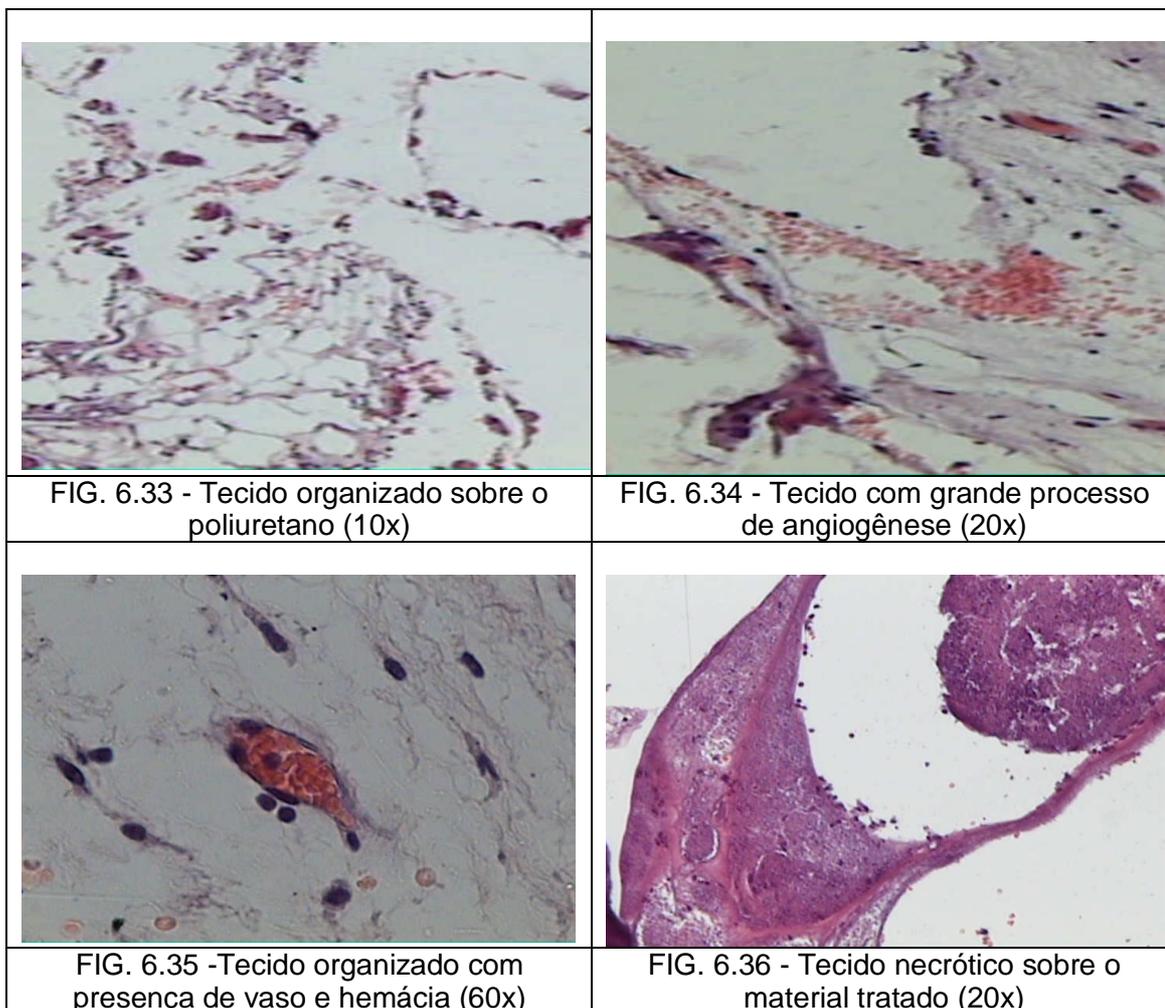


FIG. 6.32 - Tecido necrótico sobre o material tratado quimicamente - 20x

Cortes histológicos realizados aos 14 dias de implantação



Cortes histológicos realizados aos 29 dias de implantação

Nos cortes histológicos feitos com 14 dias apareceram um infiltrado inflamatório crônico moderado, traduzido como reação promovida pelo implante de um material estranho. Contudo, não houve formação de encapsulamento ou fibrose. Por outro lado, os cortes realizados com 29 dias demonstraram uma redução acentuada na reação de infiltrado crônico e grande aumento do processo angiogênico.

7. CONCLUSÃO

O procedimento de síntese usado resultou bem sucedidamente na produção de uma matriz porosa de poliuretano, assim demonstrado pelo FTIR.

A argila organofílica MMT, incorporada ao PU, sofreu esfoliação parcial e promoveu uma mais intensa cristalização do polímero que pôde ser observada pela difração de raios X.

O processamento de síntese do nanocompósito propiciou adequada interconectividade dos poros da matriz, como demonstrou o MEV, assim como, também, o tamanho dos poros se mostrou com medidas coerentes com os requisitos para proliferação celular.

Os procedimentos químicos para incorporação das macromoléculas no PU sugeriram modificações no PU, traduzidas pelo aumento e alargamento de bandas características em FTIR.

O procedimento químico usado para imobilização de macromoléculas gerou amostras com grau elevado de toxicidade, causando necrose "in vitro" e "in vivo", demonstrada pelos ensaios de viabilidade.

O nanocompósito sem tratamento superficial demonstrou ser biocompatível tanto "in vitro" como "in vivo" através dos ensaios de MTT, F.A., colágeno e cortes histológicos. O material demonstrou que a proliferação celular em cultura foi 44% maior que o grupo controle e a secreção de fosfatase alcalina celular semelhante ao mesmo.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou uma ampla colonização de células (fibroblastos), plaquetas e fibras da matriz extracelular sobre a superfície externa do PU, como, também, a migração dessas células para o interior da matriz apresentando conexão entre as matrizes extracelulares.

O nanocompósito biodegradável sintetizado a partir do PCL com incorporação de argila esfoliada demonstrou ser um material viável para utilização em engenharia de tecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. Wiedmann-al. *et al.* How to optimize seeding and culturing of human osteoblasts-like cells on various biomaterials. *Biomaterials*, v. 23, p. 3319-3328, 2002.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials-review. *Biomaterials*, v. 21, p. 667-681, 2000.

ATTAWIA, M. A.; HERBET, K. M.; LAURENCIN, C. T. Osteoblasts-like cell adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 213, p. 639-644, 1995.

ATTAWIA, Mohamed A.; JESSICA E.; DEVIN, C. A.; LAURENCIN, Cato T. Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy studies of osteoblast growth and phenotypic expression in three-dimensional degradable synthetic matrices. *J. of Biomedical Materials Research*, v. 29, p. 843-848, 1995.

AYRES, E. *Desenvolvimento de poliuretanos modificados a partir da inserção de entidades inorgânicas*. Dissertação (Mestrado). UFMG, Belo Horizonte, 2002.

BERRIDGE, Michael V.; ANSTAN. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide(MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *A of Biochemistry and Biophysics*, v. 303, p.474-432, 1993.

CAO, Xia; LEE, L. James; WIDYA, Tomy; MACOSKO, Christopher. Polyurethane/clay nanocomposites foams: processing, structure and properties. *Polymer*, São Paulo, v. 46, p. 775-783, 2005.

CAPLAN, Arnold I.; BRUDER, Scott P. *Mesenchymal stem cells: buiding blocks for molecular medicine in the 21st century trends in molecular medicine*, v. 7, p. 259-264, 2001.

CHEN, Evoping *et al.* Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science Engineering*, v. 17, p. 63-69, 2001.

CHEN, Guoping *et al.* Developmente of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, v. 17, p. 63-69, 2001.

CIAPETTI, G. *et al.* Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, v. 24, p.3815-3824, 2003.

CHRISTENSON, Robert H. Biochemical markers of bone metabolism: An overview. *Chemical Biochemistry*, v. 30, p. 573-593, 1997.

DAMSK, C. H. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone*, v. 25, p. 95-96, 1999.

DAVIES, J. E. *Bone engineering*. Toronto Canada: J. E. Davies, 2000.

DENG, Chao; TIAN, Huayu; ZHANG, Peibiao; SUN, Jing; CHEN, Xuesi; JING, Xiabin. Synthesis and characterization of RGD peptide grafted poly (ethylene glycol)-b-poly(L-glutamic acid) triblock copolymer. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 590-596, 2006.

DIAS, Regina C. M.; ORÉFICE, Rodrigo L.; GÓES, Alfredo M.; AYRES, E. Síntese e caracterização de nanocompósitos porosos biodegradáveis baseados em poliuretanos para aplicação em engenharia de tecido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 8. *Anais...*

DILLON, Angela K. *et al.* Adhesion of $\alpha_3\beta_1$ receptors to biomimetic substrates constructed from peptide amphiles. *Biomaterials*, v. 22, p. 1493-1505, 2001.

DISCACCIATI, José A.C. *Síntese, evolução estrutural e propriedades de polímeros modificados por nanocomponentes minerais para aplicação odontológica*. Tese (Doutorado), 2005.

DISCOVERING ARCHAEOLOGY, USA, N. Y., v. 1, p. 6, 1999.

DRURY, Jeanie L.; MOONEY, David J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, v. 24, p. 4337-4351, 2003.

EL-AMIN, S. F.; LU, H. H.; KHAN, Y.; BUREMS, J.; MICHEL, J.; TUAN, R. S.; LAURENCIN, C. T. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 24, p. 1213-1221, 2003.

FISCHER, Dagmar; LI, Uxin; AHLEMEYER, Barbara; KRIEGLSTEIN, Josef; KISSEL, Thomas. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, v. 24, p. 1121-1131, 2003.

FOOT, M.; MULHOLLAND, M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 397-407, 2005.

FREYMAN, T. M. *et al.* Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science*, v. 46, p. 273-282, 2001.

GORNA, K; GOGOLEWSKI, S. The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of biodegradable polyurethanes for medical applications. *Polymer degradation and stability*, v. 79, p. 465-474, 2003.

GRETZER, C. *et al.* Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly(urethane urea), polystyrene and titanium in vitro. *Biomaterials*, v. 24, p. 2843-2852, 2003.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. *Acta Mater.*, v. 48, p. 263-277, 2000.

GRIFFITH, Linda G. *et al.* Tissue engineering current challenges and expanding opportunities. *Science*, v. 295, p. 1009-1010, 2002.

GUELCHER, Scott A.; GALLAGHER, Katie M.; DIDIER, Jonathan E.; KLINEDINST, Derek B.; DOCTOR, John S.; GOLDSTEIN, Aaron S.; WILKES, Garth L.; BECKMAN, Eric J.; HOLLINGER, Jeffrey O. Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. *Actabiomaterialia*, v. 1, p. 471-484, 2005.

GUGALA, Zbignien; GOGOLEWSKI, Synester. Protein adsorption, attachment, growth and activity of primary rat osteoblasts of polylactide membranes with defined surface characteristics. *Biomaterials*, v. 25, p. 2341-2351, 2004.

HENTZE, H. P.; ANTONIETTI, M. Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications. *Molecular Biotechnology*, v. 90, p. 27-53, 2002.

HAUGEN, H.; RIED, V.; BRUNNER, M.; WILL, J.; WINTERMANTEL, E. Water as foaming agent for open cell polyurethane structures. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, p. 343-346, 2004.

HEATH, CAROLE A. Cells tissue engineering tibtech. *Features*, v. 18, p. 17-19, 2000.

HERSEL, Ulrich; DAHMEN, Claudia; KESSLER, Horst. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, v. 24, p. 4385-4415, 2003.

HING, C.; HSIN, K.V. *et al.* Large-scale gene expression analysis of osteoblasts cultured on three different Ti- GAR – 4V surface treatments. *Biomaterials*, v. 23, p. 4193-4202, 2002.

HIRATA, Noriko; MATSUMOTO, Ken Ichi; INISHITA, Takashi; TAKENAKA, Yoshimori; SUMA, Yasunori; SHINTANI, Hideharu. Gamma - Ray irradiation, autoclave and ethylene oxide sterilization to thermosetting polyurethane: sterilization to polyurethane. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 46, n. 3, p. 377-381, 1995.

HO, Ming-Hua; WANG, Da-Ming; HSIEH, Hsyue-Jen; LIU, Hwa-Chang; HSIEN, Tzu-Yang; LAI, Juin-Yih; HOU, Lein-Tuan. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, p. 3197-3206, 2005.

HOLY, Chantal E. *et al.* Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture perud. *J. Biomed Mater Res*, v. 51, p. 376-382, 1999.

HORCH, Adam R. *et al.* Nanoreinforcement of poly(propylene fundrate). Based networks with surface modified alumoxane nanoparticles for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 1990-1998, 2004.

HOW, Qingpu *et al.* Porous polymeric strutures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt beaching technique. *Biomaterials*, v. 24, p. 1937-1947, 2003.

HUIHSU, Sean *et al.* Biocompatibility of poly(ϵ -caprolactona)poly(ethylene glycol) diblock copolymers with nanophase separation. *Biomaterials*, v. 10, p. 01-061, 2004.

ISHAUG, Susan L.; CRANE, Genevieve M.; MILLER, Michael J.; YASKO, Alan W.; YASZEMSKI, Michael J.; MIKOS, Antonios G. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomedical Materials Research*, v. 36, p. 17-28, 1997.

JANEWAY, Charles A. *et al.* *Imunobiologia*. 5. ed. São Paulo: ARTMED, 2001.

KENAR, Halime; KOSE, Gamze Torum; HASIRCI, Vasif. Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films. *Biomaterials*, v. 27, p. 885-895, 2006.

LAURENCIN, Cato T.; ATTAWIA, Mohamed A.; ELGENDY, Honda E.; HERBERT, Kelly M. Tissue engineering bone regeneration using degradable polymers. The formation of mineralized matrices. *Bone*, v. 19, p. 935-995, 1996.

LEE, Jin Woo; KIM, Yun Hee; PARK, Ki Dong; JEE, Kyoung Soo; SHIN, Jung Woog; HAHN, Soo Bong. Importance of integrin β 1-mediated cell attachment on biodegradable polymers under serum depletion in mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Biomaterials*, v. 25, p. 1901-1909, 2004.

LEE, Jong Hoon *et al.* Thermal and mechanical characteristics of poly(l-lacti acid) nanocomposite scaffold. *Biomaterials*, v. 24, p. 2773-2778, 2003.

LIND, Martin *et al.* Transforming growth factor- β 1 adsorbed to tricalciumphosphate coated implants increases peri-implant bone remodeling. *Biomaterials*, v. 22, p. 189-193, 2001.

MANSUR, Herman S. *et al.* Sol gel silica based networks with controlled chemical properties. *J. Non- Crystalline Solids*, v. 273, p. 109-115, 2000.

MASSOM, V.; MAURIN, F.; H. FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Influence of sterilization processes on poly(ϵ -caprolactone) nanospheres. *Biomaterials*, v. 18, p. 327-335, 1997.

MERKLI, A. *et al.* Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Prog. Polym. Sci*, v. 23, p. 563-580, 1998.

MINUTH, Will W.; SITTINGER, Michael; KLOTH, Sabine. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res.*, v. 291, p. 1-11, 1998.

NICOLOVSKI, Janeta *et al.* Smooth muscle cell adhesion to tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, v. 21, p. 2025-2032, 2000.

NOAH, Ernst Magnus; CHEN, Jingsong; JIAO, Xiang Yang; HESCHEL, Ingo; PALLUA, Nobert. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 23, p. 2855-2861, 2002.

OSBORNE, C.S.; REID, W. H.; GRANT, M. H. Investigation into the biological stability of collagen/chondroitin-6-sulphate gels and their contraction by fibroblasts and keratinocytes: the effect of crosslinking agents and diamines. *Biomaterials*, v. 20, p. 283-290, 1999.

PALLU, S. Verrier; BAREILLE, R.; JONECZYK, A.; DARD, Meyer, M.; AMEDÉE, J. Function of linear and cyclic GRGDS containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials*, v. 23, p. 585-596, 2002.

PATTANAYAK; Asim; JANA, Sadhan, C. Synthesis of thermoplastic polyurethane nanocomposites of reactive nanoclay by bulk polymerization methods. *Polymer*, v. 46, p. 3275-3288, 2005.

PATTANAYAK; Asim.; JANA, Sadhan, C. Thermoplastic polyurethane nanocomposites of reactive silicate days: effects of soft segments on properties. *Polymer*, v. 46, p. 5183-5193, 2005.

RAMAKRISNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LONG, Kam W. Biomedical applications of polymer - composite materials: a review. *Composites science and technology*, 2001, p. 1189-1224.

RATNER, Buddy, D.; HOFFMAN, Allan S. *Biomaterials science. an introduction to materials in medicine*, 1996.

REVISTA INFORME DENTAL CAPITAL, BELO HORIZONTE, ano IV; 12. ed. Sabe, 2000.

SANTIAGO, Lizzie Y.; NOWAK, Richard W.; RUBIN, J. Peter; MARRA, Kacey G. Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell applications. *Biomaterials*, 2006. (article in press).

SCHOONOVER, Jon R.; DATTELBAUM, Dana M.; OSBORN, Jill C.; BRIDGEWATER, Jon S.; KENNEY, John W. *Spectrochimica Acta*, v. 59, p. 309-319, 2003.

SCIENTIFIC AMERICAN, N.Y. USA, v. 227, 1, 1997.

SCIENTIFIC AMERICAN, BRASIL, ano 2, 24, 2004.

SEAL, B.L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration- review. *Mat. Science and Engineering*, v. 34, p. 147-230, 2001.

SERRANO, M. C. *et al.* In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using I.929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, 2004.

SHIN, Heungsoo; ZYGOURAKIS, Kyriacos; CARSON, Mary C. Farach; YASZEMSKI, Michael J.; MIKOS, Antonios G. Attachment, proliferation and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide. *Biomaterials*, v. 25, p. 895-906, 2004.

SPAANS, C. J.; BELGRAVER, V. W.; RIENSTRA, O.; GROOT, J. H. de.; VETH, R. P. H.; PENNING, A. J. Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials*, v. 21, p. 2453-2460, 2000.

STEPHANSSON, Sean N. *et al.* Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. *Biomaterials*, v. 23, p. 2527-2534, 2002.

STAVRIDIS, M. *et al.* The influence of surface patterning and/or sterilization on the hemocompatibility of polycaprolactones. *Materials Science and Engineering*, v. 23, p. 359-365, 2003.

TSUCHIYA Kohei; CHEN, Guoping; USHIDA, Takachi; MATSUNO, Tkeo; TATEISHI, Tetsuya. Effects of cell adhesion molecules on adhesion of chondrocytes, ligament cells and mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering*, v. 17, p. 79-82, 2001.

VALÉRIO, Patricia *et al.* The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, v. 25, p. 2941-2948, 2004.

VANCE, Rylie J. *et al.* Decreased fibroblast cell density on chemically degraded polylactide-co-glycolic acid, polyurethane, and poly(caprolactone). *Biomaterials*, v. 25, p. 2095-2103, 2004.

WACHEN, P. B. Van. *et al.* (Electron) Microscopic observations on tissue integration of collagen-immobilized polyurethane. *Biomaterials*, v. 23, p. 1401-1409, 2002.

WANG, Dong-an; JI, Jian; SUN, Yong-Hong; SHEN, Jia-Cong; FENG, Lin-Xian; ELISSEEFF, Jennifer H. In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via Poly(ethylene oxide) coupling polymers for human endothelial cell growth. *Biomacromolecules*, v. 3, p. 1286-1295, 2002.

WANG, Li-Fang; SHEN, Shiao-Shun; LU, Shui-Chun. Synthesis and characterization of chondroitin sulfate-methacrylate hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, p. 389-396, 2003.

YANG, Fan; WILLIAMS, Christopher G.; WANG, Dong-an; LEE, Hyukjin; MANSON, Paul N.; ELISSEEFF, Jennifer. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, v. 26, p. 5991-5998, 2005.

YOON, Jun Jin; SONG, Soon Ho; LEE, Doo Sung; PARK, Tae Gwan. Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method. *Biomaterials*, v. 25, p. 5613-5620, 2004.

YOSHIKAWA, Tarafumi *et al.* Bone and soft tissue regeneration by bone marrow mesenchymal cells. *M. Science and Engineering*, v. C17, p. 19-26, 2001

WANG, Yu-Chi *et al.* A chemical surface modification of chitosan by glycoconjugates to enhance the cell- biomaterials interaction. *Biomaterials*, v. 4, p. 224-231, 2003.

ZHANG, Jian Ying *et al.* A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials*, v. 21, p. 1247-1258, 2000.

ZHU, Yabin; GAO, Changyou; XINGYV, Liv; XINGYV, Jiacong; SHEN, Jiacong. Surface modification of Polycaprolactone membrane via Aminolysis and biomacromolecule Immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells. *Biomacromolecules*, v. 3, p. 1312-1319, 2002.