

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

**OSTEOGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS EM
MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO-
CO-3-HIDROXIVALERATO
UTILIZANDO MEIO SUPLEMENTADO COM SORO
HUMANO**

Ana Cláudia Chagas de Paula

Belo Horizonte

2011

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

**OSTEOGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS EM
MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO-
CO-3-HIDROXIVALERATO
UTILIZANDO MEIO SUPLEMENTADO COM SORO
HUMANO**

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

Orientada: Ana Cláudia Chagas de Paula
Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

2011

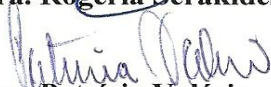


Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615




ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA CLÁUDIA CHAGAS DE PAULA. Aos oito dias do mês de agosto de 2011 às 9:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Osteogênese de células-tronco humanas em matriz tridimensional de POLI-3-hidroxitirato-CO-3-hidroxi valerato utilizando meio suplementado com soro humano” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Rogéria Serakides da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Patrícia Valério da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 8 de agosto de 2011.


 Dra. Rogéria Serakides – UFMG


 Dra. Patrícia Valério – UFMG


 Dr. Alfredo Miranda de Góes – orientador - UFMG


 Prof. Maria Elena de Lima
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

*Aos meus amados pais e irmã.
Aos meus amigos e
professores, em especial ao
Prof. Dr. Alfredo Miranda de
Góes.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e santo protetor, São Geraldo Majela, que sempre me ampararam nos momentos de fraqueza e me auxiliaram a descobrir o caminho do conhecimento, colocando em meu caminho as pessoas certas e maravilhosas que tanto me ajudaram!

Aos meus pais queridos e minha irmã, que sempre me apoiaram em tudo e me fizeram sentir a pessoa mais amada! Amo vocês!

À Eunice e ao Peco, por todo o carinho dedicado.

A toda minha família pelo exemplo e amor, e principalmente à madrinha Carminha, que além do amor, é um exemplo de professora, obrigada por dividir seu conhecimento. Agradeço também à prima Marília, pela amizade além de tudo!

À Katia e ao Claret pelo apoio e carinho.

Ao prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes pela oportunidade, confiança, orientação e amizade. Grande pensador e grande idealizador. Foi um ano e meio de muito aprendizado. Muito obrigada!

À Alessandra Zonari, não é possível expressar satisfatoriamente agradecimento a tudo que você já fez por mim. Eu não escolheria outra parceira de experimentos. Quanto aprendi com a Alê! Sempre que precisei, ela estava ao meu lado. Muito obrigada amiga!

À Dra. Silviene Novikoff, para mim um verdadeiro anjo! É difícil expressar em palavras o quanto admiro esse exemplo de profissional dedicada e amiga! Muito obrigada Sil! Sempre pude contar com ela nos momentos mais difíceis e decisivos deste meu mestrado. Obrigada pela contribuição nesse projeto.

Ao prof. Dr. Dawidson Assis Gomes, pela contribuição científica na minha formação para Mestre.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária e a profa. Dra. Rogéria Serakides e Jankerle pela disponibilidade, que viabilizaram parte deste projeto.

Aos prof(a)s. Dr(s) Hélio Chiarini-Garcia e Gerluza Aparecida Borges Silva pela contribuição neste projeto. E aos técnicos, respectivamente, Maria Luiza e Francisco pelo auxílio.

Ao Dr. Selmo Gerber e aos doadores da Clínica Origen pela colaboração na coleta dos produtos de lipoaspiração.

À PHB Industrial S.A. pelo fornecimento do polímero.

Ao 3B's Research Group: Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, grupo de Pesquisa do Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa em Portugal. Em especial ao prof. Dr. Rui Reis e ao Dr. Vitor M. Correlo.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, em especial a profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) - pela irradiação das matrizes tridimensionais.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) - prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia e a técnica Ivete, pelo auxílio com a microscopia eletrônica de varredura.

Ao Centro de Microscopia da UFMG.

A todas as amigas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pelos ensinamentos, boa convivência e apoio. Ana Carolina, Anne, Carolzinha, Carol Andrade, Carol Melo, Ciça, Cíntia, Cris, Elis, Estefânia, Jerusa, Ju Lott, Lílian, Luiza, Marina, Maira, Naira, Natássia, Raissa e Vivi. E aos amigos Pedro e Arthur.

Em especial, as amigas Alexandra e Thaís, foram muitos experimentos, conversas, trapalhadas e gargalhadas, momentos inesquecíveis. Muito obrigada!!!!

À Betinha pela ajuda e carinho, alegrando todos os dias do laboratório.

A todos os meus amigos, que também marcaram minha vida e meus estudos, em especial: Daniela, Jana, Karime, Karolina, Lelius, Marina, Pataxó, Ricardo e Vanessa. A todos os amigos da farmácia 05.1.

Aos amigos do mestrado por toda assistência durante o curso, em especial à Ana Carolina Dias.

A todos os meus professores e em especial à profa. Dra. Vera Lúcia de Miranda Guarda, que contribuiu muito para meu aprendizado.

À Tanare pela amizade e ensinamentos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto pela minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A todos os professores do programa, em especial a profa Dra. Maria Helena de Lima Perez Garcia, pela atenção e apoio, e a todos os funcionários do departamento.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

"Toda verdade é provisória – esta é, talvez a única certeza que fica quando observamos a maneira pela qual o conhecimento humano é construído no curso da história"

(José Carlos de Azeredo)

RESUMO

A Engenharia de Tecidos é uma ciência multidisciplinar que oferece uma estratégia para contornar os principais problemas relacionados aos procedimentos terapêuticos e regenerativo do osso. Neste contexto, as células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) são uma fonte abundante e atrativa para serem cultivadas em matrizes tridimensionais sob estímulo de fatores específicos. Uma expansão *ex vivo* dessas células é necessária antes da aplicação clínica e atualmente os meios de cultura celular utilizam soro fetal bovino (SFB). No entanto, soro animal não é um suplemento seguro para meio de cultura, aumentando o risco de desenvolver resposta imunológica severa no receptor e transmissão de microorganismos patogênicos. Sendo ainda um desafio estabelecer um meio de cultura celular padrão que seja seguro. Dessa forma o objetivo deste estudo é avaliar a possibilidade de utilizar um *pool* de soro alogênico humano (SH alo) substituindo o SFB como suplemento para o meio de cultura das hASC. Assim como, cultivá-las nessas condições em matrizes tridimensionais de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (PHB-HV), desenvolvidas pela técnica de *freeze drying*, com intuito de utilizá-las no campo da engenharia de tecido ósseo. Os resultados demonstraram que as hASC cultivadas em DMEM suplementado com SH alo apresentaram uma maior proliferação, mas mantiveram as características imunofenotípicas das células-tronco mesenquimais e foram capazes de diferenciar em células da linhagem osteogênica. As matrizes tridimensionais de PHB-HV desenvolvidas mostraram uma estrutura adequada permitindo a adesão e proliferação das hASC. Além disso, as hASC foram capazes de diferenciar em células da linhagem osteogênica. Todos os resultados indicaram que o SH alo pode ser um suplemento promissor para o meio de expansão e diferenciação *ex vivo* das hASC e as matrizes tridimensionais de PHB-HV associadas a estas células e meio de cultura suplementado com SH alo e fatores osteogênicos são adequadas para induzir a osteogênese. Preliminarmente, esse constructo parece ser viável e seguro para utilização na engenharia de tecido ósseo.

Palavras chave: células-tronco, soro humano, poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato, osso, engenharia de tecidos

ABSTRACT

Tissue Engineering is a multidisciplinary science that offers a strategy to circumvent the major problems related with bone regenerative and therapeutic procedures. In its context, the human adipose stem cells (hASC) are an attractive and abundant cell source to be cultured in scaffolds under specific factors stimulus. An *ex vivo* expansion of these cells is necessary before clinical application and currently, cell culture medium use fetal calf serum (FCS). However, animal serum is not a safety supplement for culture medium, raising the risk of trigger severe immune response and transmission of pathogenic microorganisms to the recipient. So the challenge is to establish standard and reliable cell culture medium. Therefore, the aim of this study is evaluate the possibility of using a pool of allogeneic human serum (allo HS) rather than FCS as supplement of the culture medium for hASC. As well as seeding these cells on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-HV) scaffolds, developed by freeze drying technique, in order to be used in bone tissue engineering field. The results showed that hASC cultured in DMEM supplemented with allo HS had an increased proliferation but maintained the immunophenotype characteristic for mesenchymal stem cell and the cells were capable of differentiate into osteogenic lineage. The scaffolds of PHB-HV developed showed an adequate structure allowing adhesion and proliferation of hASC. Moreover the hASC were capable of differentiate into osteogenic lineage. All these results indicate that allo HS may be a promising supplement for *ex vivo* expansion and differentiation medium of hASC and the PHB-HV scaffolds associated with hASC and medium supplemented with allo HS and osteogenic factors are suitable to induce bone formation. At first, this construct seems useful and safety to bone tissue engineering.

Keywords: stem cell, human serum, poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, bone, tissue engineering

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via metabólica clássica envolvida na síntese de PHA	7
Figura 2. Estrutura química do PHB-HV	9
Figura 3. Gráfico de tamanho <i>versus</i> granulosidade - citometria de fluxo.....	22
Figura 4. Curva padrão para concentração de colágeno.....	28
Figura 5. Estrutura das matrizes tridimensionais de PHB-HV	37
Figura 6. Reconstrução tridimensional da matriz de PHB-HV.	38
Figura 7. Constituintes químicos da matriz tridimensional de PHB-HV	39
Figura 8. Aspectos morfológicos das hASC	40
Figura 9. Análise imunofenotípica das hASC - citometria de fluxo	41
Figura 10. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes	42
Figura 11. Média acumulada da duplicação das hASC	43
Figura 12. Curva de crescimento das hASC.....	44
Figura 13. Viabilidade e proliferação das hASC	45
Figura 14. Atividade da fosfatase alcalina das hASC	46
Figura 15. Proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica	47
Figura 16. Atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica.....	48
Figura 17. Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizado durante a indução da diferenciação osteogênica	49
Figura 18. Coloração de <i>von Kossa</i>	51

Figura 19. Marcação para osteopontina - imunofluorescência	52
Figura 20. Marcação para osteocalcina - imunofluorescência.....	53
Figura 21. Imagens da MEV das matrizes de PHB-HV colonizadas pelas hASC - visão panorâmica do interior das matrizes	54
Figura 22. Imagens da MEV das matrizes de PHB-HV colonizadas pelas hASC	55
Figura 23. Proliferação das hASC semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV.....	56
Figura 24. Proliferação das hASC semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura osteogênico	57
Figura 25. Atividade da fosfatase alcalina nas hASC semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura osteogênico	58
Figura 26. Marcação para osteopontina em secções.....	59
Figura 27. Marcação para colágeno tipo I em secções	60
Figura 28. Marcação para osteocalcina em secções.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas constituintes da parte orgânica da matriz óssea.....	2
Tabela 2. Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem.	21
Tabela 3. Anticorpos primários utilizados na marcação das células para imunofluorescência	30
Tabela 4. Anticorpos secundários utilizados na marcação para imunofluorescência.....	30
Tabela 5. Anticorpos primários utilizados na marcação das secções para imunofluorescência	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm - Micrometro

µM - Micromolar

acetil-coA - Acetil-coenzimaA

AgNO₃ - Nitrato de prata

allo SH - Allogeneic human serum

Au - Ouro

BCIP - 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina

BMSC - Células-tronco derivadas da medula óssea

BSA - Albumina de soro bovino

C - Carbono

CD - Grupamento de diferenciação

CO₂ - Dióxido de carbono

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva

EDTA - Ácido Tetracético Etilenodiamidina

EMP - Erro médio padrão

FCS - Fetal calf serum

FDA - *Food and Drugs Administration*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FL - Fluorescência

G – Força G

GMP - Boas Práticas de Manipulação

hASC - Células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo

HCl - Ácido clorídrico

HLA - Antígeno leucocitário humano

HSC - Células-tronco hematopoiéticas

HV - Hidroxivalerato

ips - Células-tronco de pluripotência induzida

KDa - Kilo Dalton

Kg - Kilograma

KGy - Kilo gray
KV - Kilovolt
L - Litro
Log - Logaritmo
M - Molar
m - Massa
M. O. - Microscópio óptico
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
mg - Micrograma
mL - Mililitro
mm - Milímetro
mM - Milimolar
MPa - Megapascal
MSC - Células-tronco mesenquimais
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
N1 - Número de células plaqueadas
N2 - Número de células ao alcançarem confluência.
NaOH - Hidróxido de sódio
NBT - Nitroblue tetrazólio clorídrico
nM - Nanomolar
O - Oxigênio
p - para
P - Passagem
P4HB - Poli-4-hidroxibutirato
PBS - Tampão fosfato salina
PE - Ficoeritrina
PHA - Polihidroxialcanoatos
PHB - Poli-3-hidroxibutirato
PHB-HHx - Poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato
PHB-HV - Poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi valerato / Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate
PHO - Polihidroxi octanoato
PLA - Poli-ácido lático
R1 - População de células - citometria de fluxo

SDS - Sulfato de sódio dodecil

SFB - Soro fetal bovino

SH alo - *Pool* de soro alogênico humano

T1 - Horário de plaqueamento das células

T2 - Horário de contagem das células

v - Volume

MEM - Meio Essencial Mínimo

B-TCP - Beta - fosfato tricálcico

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

± - Mais ou menos

°C - Grau Celsius

α - Alfa

β - Beta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Processamento das matrizes tridimensionais de PHB-HV.....	16
3.1.1. Esterilização das matrizes tridimensionais de PHB-HV	16
3.1.2. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV	17
3.1.2.1. Caracterização estrutural.....	17
3.1.2.2. Caracterização química	17
3.2. <i>Pool</i> de soro alogênico humano.....	17
3.3. Meios de cultura celular	18
3.3.1. Meio de cultura basal.....	18
3.3.2. Meio osteogênico.....	18
3.4. Isolamento e cultivo das hASC	18
3.5. Estudos básicos em culturas de hASC	20
3.5.1. Caracterização do imunofenótipo das hASC	20
3.5.1.1. Marcação celular com anticorpos primário e secundário	20
3.5.1.2. Leitura no citômetro de fluxo.....	21
3.5.2. Cinética de proliferação	22

3.5.2.1. Taxa de duplicação acumulada da população e tempo de duplicação.....	22
3.5.2.2. Curva de crescimento	23
3.5.3. Viabilidade e proliferação celular	24
3.5.4. Atividade da fosfatase alcalina	25
3.6. Diferenciação osteogênica das hASC.....	25
3.6.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica	26
3.6.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica	26
3.6.3. Avaliação da síntese de colágeno durante a indução da diferenciação osteogênica	27
3.6.4. Avaliação da mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica	28
3.6.5. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação.....	29
3.7. Colonização <i>in vitro</i> das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASC	30
3.7.1. Avaliação da colonização e adesão celular as matrizes tridimensionais de PHB-HV	31
3.7.2. Viabilidade e proliferação das hASC nas matrizes tridimensionais de PHB-HV	32
3.8. Diferenciação osteogênica das hASC associadas as matrizes tridimensionais de PHB-HV.....	32
3.8.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica	33
3.8.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica	33
3.8.3. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação.....	34

3.8.3.1. Processamento das amostras para obtenção de secções por criomicrotomia	34
3.8.3.2. Reação de imunofluorescência nas secções	34
4. RESULTADOS	37
4.1. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV	37
4.1.1. Caracterização estrutural	37
4.1.2. Caracterização química	38
4.2. Isolamento e cultivo das hASC	39
4.3. Estudos básicos em culturas de hASC	40
4.3.1. Caracterização do imunofenótipo das hASC	40
4.3.2. Cinética de proliferação	42
4.3.2.1. Duplicação acumulada da população e tempo de duplicação	42
4.3.2.2. Curva de crescimento	43
4.3.3. Viabilidade e proliferação celular	44
4.3.4. Atividade da fosfatase alcalina	45
4.5. Diferenciação osteogênica das hASC	46
4.5.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica	47
4.5.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica	48
4.5.3. Avaliação da síntese de colágeno durante a indução da diferenciação osteogênica	49
4.5.4. Avaliação da mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica	50
4.5.5. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação	50
4.6. Estudos sobre a colonização das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASC	53

4.6.1. Avaliação da colonização <i>in vitro</i> das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASC.....	53
4.6.2. Viabilidade e proliferação das hASC em matrizes tridimensionais de PHB-HV	56
4.7. Diferenciação osteogênica das hASC associadas as matrizes tridimensionais de PHB-HV.....	56
4.7.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica	57
4.7.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica	57
4.7.3. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação.....	58
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	71
7. PERSPECTIVAS.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	83

1. INTRODUÇÃO

Os ossos e cartilagens formam o sistema esquelético, proporcionando sustentação para o corpo, proteção para órgãos vitais, a base mecânica do movimento e reserva de cálcio e fosfato necessários para manutenção da homeostase, exercendo assim uma função metabólica; além de ser uma fonte de células hematopoiéticas, por alojar a medula óssea (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

Os dois tipos de osso são: cortical (representa 80% dos ossos) e esponjoso ou trabecular (representa 20% dos ossos). A arquitetura dos mesmos e proporção variam de acordo com a função (Salgado *et al.*, 2004). O osso cortical é denso e compacto com aproximadamente 10% de porosidade (Salgado *et al.*, 2004). É encontrado nos ossos longos, formando uma fina camada de osso compacto sobre todos os ossos e tem como função fornecer resistência mecânica e proteção (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Já o osso esponjoso é menos denso e mais elástico com 50-90% de porosidade. É encontrado em metáfises de ossos longos e é recoberto pelo osso cortical (Salgado *et al.*, 2004), que além de sua função metabólica também é capaz de fornecer suporte mecânico (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

A matriz óssea é constituída por 25% de parte orgânica, que compreende as células (2-5%) e osteóide (Tab. 1), 70% de parte inorgânica, composta por hidroxapatita e 5% de água (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

As células encontradas na matriz óssea são: osteoblastos, células cuboidais uninucleadas que sintetizam os componentes da matriz óssea e são responsáveis por sua mineralização; osteócitos, osteoblastos altamente especializados e com menos organelas, aprisionados pela matriz óssea, sendo o componente celular mais abundante no osso; osteoclastos, células multinucleadas, originadas de precursores hematopoiéticos, que estão envolvidas na reabsorção da matriz óssea e células mesenquimais osteoprogenitoras, que se diferenciam em osteoblastos (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

O osso é um tecido metabolicamente ativo que se encontra em constante remodelamento pela ação equilibrada entre osteoblastos (formação óssea) e osteoclastos (reabsorção óssea). Este mecanismo além de manter a

estrutura óssea de acordo com as necessidades mecânicas e ajudar a reparar microdanos ocorridos na matriz óssea, levando a renovação do osso, exerce papel importante na homeostasia de minerais (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

Tabela 1. Proteínas constituintes da parte orgânica da matriz óssea.

Proteínas	Propriedades e funções
Colágeno tipo I	Compõe 90% da matriz orgânica óssea; fornece a estrutura, na qual minerais ósseos são depositados (Mackie, 2003 e Salgado <i>et al.</i> , 2004)
Sulfato de condroitina – decorina	Proteoglicana; co-localizada com colágeno tipo I; regula a fibrogênese do colágeno (Mackie, 2003)
Sulfato de condroitina – biglicana	Proteoglicana; localização pericelular; modula a resposta de precursores de osteoblastos ao TGF- β (fator indutor de formação óssea) (Mackie, 2003)
Osteonectina/SPARC	Glicoproteínas; regulam a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Mackie, 2003)
Tenascina-C	
Fibronectina	
Membros da família da trombospondina	
Osteopontina	Glicoproteína; regula a adesão celular (osteoblasto e osteoclasto) (Sikavitsas <i>et al.</i> , 2001 e Mackie, 2003), a mineralização e está envolvida no remodelamento ósseo (Davies, 1996 e Salgado <i>et al.</i> , 2004)
Sialoproteína óssea	Glicoproteína; núcleo para mineralização e regula adesão celular (Davies, 1996)
Osteocalcina	Proteína γ -carboxilada (Gla); envolvida no remodelamento ósseo, estabiliza a matriz de hidroxiapatita e previne mineralização excessiva (Sikavitsas <i>et al.</i> , 2001; Mackie, 2003; Salgado <i>et al.</i> , 2004)
Fosfatase alcalina	Polipeptídeo; promove formação de cristais na matriz por remover inibidores de núcleos de mineralização (Sikavitsas <i>et al.</i> , 2001)

O remodelamento ósseo é regulado sistemicamente por hormônios e localmente por citocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios (Hadjidakis & Androulakis, 2006), assim como por estímulo mecânico (Sommerfeldt & Rubin, 2001). Uma disfunção nessa regulação pode causar uma variedade de doenças ósseas que resultam, em raros casos, no aumento da formação óssea como a osteopetrose (Raisz, 1999) e na maioria das vezes em excessiva degradação óssea, como na osteoporose (Kanis, 2002), hiperparatiroidismo e hipertiroidismo, doença de Paget, na doença periodontal e na imobilização (Raisz, 1999). A perda óssea ocorre também em fraturas extensas, cirurgias ortopédicas, infecções e resecção de tumores (Dimitriou *et*

al., 2011), e em desordens genéticas como na osteogênese imperfeita, na qual um dos genes para colágeno tipo I encontra-se mutado (Gajko-Galicka, 2002; Venturi *et al.*, 2006).

Com o aumento da expectativa de vida da população, há uma maior incidência de fraturas, que pode estar relacionada com a maior degradação óssea (osteoporose), assim como a fatores de risco não relacionados, dentre os quais estão: visão prejudicada, utilização de medicamentos e mobilidade comprometida (Kanis *et al.*, 2005).

A capacidade de regeneração intrínseca do osso sem formação de cicatriz, através do remodelamento ósseo, é conhecida (Sommerfeldt & Rubin, 2001). No entanto, nas situações em que esse processo encontra-se comprometido ou insuficiente, como citado anteriormente, ou que o defeito ósseo excede o tamanho crítico, resultando em sua não união, o tratamento padrão ouro, atualmente empregado, é o transplante de osso autólogo. Esse osso pode ser coletado em diversos sítios, sendo o sítio doador mais comum a crista ilíaca da pelve (Dimitriou *et al.*, 2011).

O osso autólogo (tecido do próprio paciente) combina as principais propriedades requeridas em um material para reposição óssea: (i) osteoindutor, capacidade de recrutar e estimular a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos (Giannoudis *et al.*, 2005); (ii) osteocondutor, capacidade de atuar como matriz estrutural para deposição de nova matriz óssea e (iii) osteogênese, presença de células osteoprogenitoras capazes de diferenciar em osteoblastos. Além disso, é compatível com o tecido receptor e não-imunogênico, reduzindo reações imunológicas e transmissão de doenças. No entanto, acarreta em um procedimento cirúrgico adicional ao paciente, causando desconforto e possíveis infecções (Dimitriou *et al.*, 2011), e, principalmente, apresenta a limitação da quantidade de tecido ósseo que pode ser coletada sem causar morbidade do sítio doador (Salgado *et al.*, 2004).

Diferentemente, o transplante de osso alogênico (tecido de um doador) que não envolve os problemas associados ao transplante autólogo, apresenta algumas desvantagens como diminuição da capacidade osteoindutora, escassez de doadores, assim como rejeição imunológica, transmissão de doenças e custo para a saúde pública do país (Dimitriou *et al.*, 2011).

Nesse contexto, espera-se que o desenvolvimento de substitutos ósseos possam ser uma alternativa para contornar as desvantagens citadas (Dimitriou *et al.*, 2011) tornando a medicina regenerativa um campo promissor.

A medicina regenerativa é uma área da pesquisa emergente que envolve a terapia celular e engenharia de tecidos com o objetivo de regenerar e/ou substituir órgãos e tecidos, lesados ou perdidos (Ikada, 2006).

Langer e Vacanti, em 1993, definiram a Engenharia de Tecidos, como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida no desenvolvimento de substitutos biológicos com o intuito de restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido. Ou seja, na engenharia de tecidos uma matriz estrutural, na qual são incorporadas moléculas indutoras, serve como superfície para adesão, proliferação celular, síntese de moléculas bioativas e a formação de matriz extracelular favorecendo a regeneração tecidual.

Para utilização na engenharia de tecido ósseo a matriz tridimensional deve apresentar algumas propriedades intrínsecas ao biomaterial empregado e à sua arquitetura, para que seja adequada à função destinada. Essas propriedades são:

- i. Biocompatibilidade - capacidade de integrar ao tecido hospedeiro e exercer a função que é destinada, sem causar resposta imune (Yang *et al.*, 2001).
- ii. Biodegradabilidade - capacidade de sofrer degradação em produtos não-tóxicos, por digestão enzimática ou por hidrólise e/ou formando fragmentos solúveis em água que são carregados do local (Tabata, 2009). A degradação deve ocorrer na mesma cinética em que o novo tecido é formado (Yang *et al.*, 2001 e Salgado *et al.*, 2004).
- iii. Porosidade - o tamanho dos poros deve ser adequado para permitir a penetração celular, produção da matriz extracelular e vascularização. O tamanho mínimo para o propósito da engenharia de tecido ósseo é 100 μm , sendo poros maiores que 200 μm o mais apropriado (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Uma adequada microporosidade é essencial para o crescimento de capilares (Salgado *et al.*, 2004). Os poros devem ser interconectados, permitindo a proliferação e distribuição celular através da estrutura tridimensional, difusão de nutrientes e remoção de

metabólitos, assim como a vascularização (Salgado *et al.*, 2004). Aproximadamente 80% de porosidade é o ponto de equilíbrio entre propriedades mecânicas e interconectividade ideais (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

- iv. Propriedades mecânicas - devem ser semelhantes às apresentadas pelo osso, com uma força mecânica suficiente para resistir à pressão hidrostática e manter o espaço necessário para crescimento celular e produção da matriz extracelular (Salgado *et al.*, 2004).
- v. Osteoindutor
- vi. Propriedades de superfície - química, que está relacionada à capacidade de adesão celular e topográfica, que está associada à capacidade do material ser osteocondutor (Salgado *et al.*, 2004).

Diversas técnicas têm sido empregadas para desenvolver matrizes tridimensionais com aplicação na engenharia de tecido ósseo: *solvent casting* (Murphy *et al.*, 2002), *fiber bonding*, *melt based technologies* (Yang *et al.*, 2001), *phase inversion*, *high pressure based methods*, *freeze drying* (Salgado *et al.*, 2004), *rapid prototyping technologies* (Lichte *et al.*, 2011) e *electrospinning* (Liu & Ma, 2004). A técnica de processamento escolhida deve ser consistente com as propriedades desejadas, assim como não afetar as propriedades do biomaterial (Salgado *et al.*, 2004).

A técnica de *freeze drying* tem sido muito empregada no processamento de matrizes para regeneração óssea (Mao *et al.*, 2003; Köse *et al.*, 2003; Nam & Park, 1999; Whang *et al.*, 1998; Whang *et al.*, 1995). Esta técnica baseia-se em uma indução térmica de separação de fase, na qual a temperatura de uma solução polimérica homogênea, disposta em um molde, diminui e há a formação de cristais do solvente. Uma vez separadas as fases, a fase rica em solvente, cristalizada, é removida por sublimação a vácuo deixando somente a espuma polimérica. O resultado final é a formação de matrizes altamente porosas, que podem apresentar porosidade acima de 90% e poros variando entre 20 e 200 μm . A estrutura dos poros depende das condições de pH, taxa de congelamento e pressão parcial empregadas durante o processamento (Puppi *et al.*, 2010). E por ser uma técnica muito sensível, todos os parâmetros devem ser bem controlados durante o processamento (Liu & Ma, 2004; Salgado *et al.*, 2004).

Diferentes biomateriais têm sido investigados na engenharia de tecido ósseo e a etapa de sua escolha, no desenvolvimento da matriz tridimensional, é importante, uma vez que suas características determinam as propriedades da matriz. Os biomateriais empregados em substitutos ósseos podem ser classificados em orgânicos, inorgânicos (Lichte *et al.*, 2011) e compósitos (associação de dois ou mais biomateriais) (Cheung *et al.*, 2007).

Os biomateriais inorgânicos compreendem (i) os metais, que apesar de serem biocompatíveis, moldáveis, e apresentarem alta resistência, não são biodegradáveis (Lichte *et al.*, 2011); e (ii) as cerâmicas, que são biocompatíveis, osteoindutoras e osteocondutoras, no entanto apresentam baixa estabilidade mecânica, são quebradiças e sua biodegradabilidade é difícil de ser prevista comprometendo a estabilidade da matriz (Salgado *et al.*, 2004).

Os biomateriais orgânicos compreendem os polímeros, que são biocompatíveis e biodegradáveis, apresentando um grande potencial para engenharia de tecido ósseo (Lichte *et al.*, 2011). Os polímeros podem ser classificados em (i) naturais como: colágeno, fibrinogênio, quitosana, amido, ácido hialurônico e polihidroxialcanoatos (PHA) e (ii) sintéticos como: poli(α -hidroxiácidos), poli(ϵ -caprolactona), poli(propileno fumaratos), poli(carbonatos), poli(anidridos) (Salgado *et al.*, 2004).

Os PHA são poliésteres sintetizados por diversos microorganismos (bactérias, algas verde azul e algumas plantas geneticamente modificadas) (Cheng *et al.*, 2011) sob condições de crescimento não balanceadas, com grande disponibilidade de fontes de carbono e quantidade limitada de nitrogênio, fósforo ou oxigênio.

Estes polímeros podem ser sintetizados através de quatro rotas de biossíntese conhecidas (Lee, 1996). A rota de síntese clássica é iniciada com a metabolização de fontes de carbono em acetil-CoA, catalizada por três enzimas (Fig. 1) (Singh *et al.*, 2009). Uma vez produzidos, são estocados em inclusões citoplasmáticas como reserva de energia (Verlinden *et al.*, 2007).

Após a fermentação, as células que produziram PHA são separadas por procedimentos convencionais de centrifugação, filtração ou floculação-filtração e os métodos de purificação. A purificação pode ser através da extração com solventes orgânicos (clorofórmio, cloreto de metileno e dicloroetano) ou por digestão com hidróxido de sódio (NaOH) (ambientalmente correta e de baixo

custo). O método por digestão com NaOH é vantajoso também por fornecer um alto grau de pureza na remoção de endotoxinas decorrentes da síntese por bactérias gram-negativas (Lee, 1999).

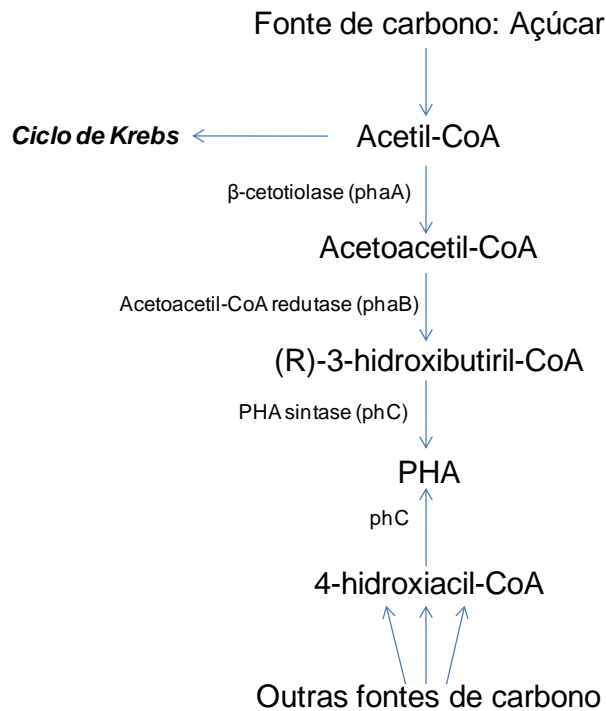


Figura 1. Via metabólica clássica envolvida na síntese de PHA (Verlinden *et al.*, 2007).

Os PHA são considerados biocompatíveis pelo fato de seu produto de degradação *in vivo*, D-3-hidroxiacilato, ser um constituinte normal do sangue humano (Köse & Kenar *et al.*, 2003), o que possibilita sua utilização médica para confecção de fios de sutura, curativos, sistema de liberação de drogas e matrizes estruturais para engenharia de tecidos (Chen & Wu, 2005).

Diversos microorganismos podem utilizar os PHA como fonte de carbono e reduzi-los, por PHA depolimerases extracelulares, em monômeros e oligômeros solúveis em água, e o produto final de degradação é o gás carbônico e água, sendo considerados, portanto, biodegradáveis. A biodegradabilidade e suas propriedades físico-químicas (semelhantes as do polipropileno) os tornam bons substitutos para o plástico petroquímico (Lee, 1996).

Há aproximadamente 150 diferentes tipos de PHA conhecidos, dentre eles o poli-3-hidroxiacilato (PHB), poli-4-hidroxiacilato (P4HB), os co-

polímeros de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (PHB-HV), poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato (PHB-HHx) e polihidroxi-octanoato (PHO) (Puppi *et al.*, 2010). Entre os PHA mais estudados e produzidos industrialmente, estão o PHB e o PHB-HV e ambos apresentam as características intrínsecas dos PHA (Köse *et al.*, 2003).

A produção industrial de PHB e PHB-HV nacional (PHB Industrial S.A.) aproveita o bagaço de cana-de-açúcar, que seria descartado pela usina sucroalcooleira, e a biomassa resultante após a extração do polímero pode ser utilizada como fertilizante na plantação de cana (Squio & Aragão, 2004).

O produto é conhecido comercialmente como Biocycle e está sendo destinado, inicialmente, a universidades, empresas e centros de pesquisa e desenvolvimento, pelo menor custo observado no mundo, 2,5 a 5 dólares /Kg, enquanto na Europa é produzido por 10 a 20 dólares /Kg (Squio & Aragão, 2004).

O PHB é um polímero termoplástico cristalino com a temperatura de transição vítrea em torno de 5 °C e temperatura de fusão em torno de 180 °C, próxima ao ponto de degradação térmica, aproximadamente 200 °C, o que o torna termicamente instável. O PHB possui propriedades mecânicas, como resistência e módulo de elasticidade, semelhantes aos polímeros sintéticos. Entretanto, a elevada fragilidade cristalina e a instabilidade térmica limitam sua aplicação (Lee, 1996). Por isso seus copolímeros em diversas proporções ou blendas com outros polímeros têm sido utilizados com o intuito de melhorar suas propriedades mecânicas (Khanna & Srivastva, 2007; Cheng *et al.*, 2011).

Através da adição de ácidos orgânicos, como ácido propiônico e ácido valérico a fonte de carbono, subunidades de 3-hidroxi-valerato (HV) são incorporadas ao PHB, formando o copolímero PHB-HV (Fig. 2), sendo o tempo de exposição aos ácidos e a concentração inicial destes responsáveis pelo conteúdo de HV. Com o aumento de unidades de HV, o polímero torna-se mais resistente (aumenta a resistência ao impacto) e flexível (diminuição no módulo de elasticidade) assim como há diminuição da temperatura de fusão, o que o torna mais processável (Lee, 1996; Khanna & Srivastava, 2007). Da mesma forma, de acordo com sua composição e quanto menos cristalino maior a sua taxa de degradação em água, mas comparado a alguns polímeros perde massa em uma cinética mais lenta (Köse & Kenar *et al.*, 2003).

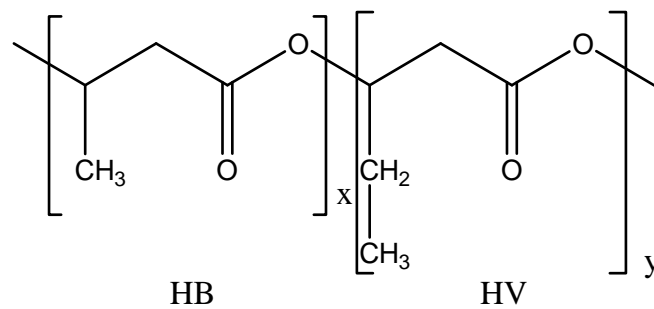


Figura 2. Estrutura química do PHB-HV (Köse & Kenar *et al.*, 2003).

O PHB-HV além de ter origem natural, biocompatibilidade e biodegradabilidade, assim como propriedades mecânicas otimizadas e termoplasticidade, apresenta outra característica interessante, a piezoelectricidade (carga que se acumula em certos biomateriais sólidos em resposta as tensões mecânicas) (Köse *et al.*, 2003). Portanto, surge como uma nova geração de polímeros com propriedades ajustáveis para aplicação na engenharia de tecidos. Sendo que os resultados já observados em estudos empregando matrizes tridimensionais de PHB-HV associados a células para reparar defeitos ósseos foram promissores (Köse *et al.*, 2003; Köse & Kenar *et al.*, 2003; Kumarasuriyar *et al.*, 2005; Tang & Wu, 2006; Huang *et al.*, 2010; Ke *et al.*, 2010).

A fonte de células empregada na engenharia de tecidos exerce um papel essencial para o seu sucesso. Estas podem ser classificadas, em relação ao tipo de doador, em autólogas (células do próprio paciente), alogênicas (células humanas de um doador) e xenogênicas (células de origem animal). As células autólogas são mais apropriadas, no contexto da engenharia de tecidos, uma vez que as células alogênicas e xenogênicas, por serem imunogênicas, tornam necessário utilizar terapia imunossupressora. No entanto, a fonte de células autólogas é limitada quando o paciente encontra-se severamente acometido por uma doença (Ikada, 2006).

E essas células também podem ser classificadas com base no grau de diferenciação em células especializadas ou células-tronco. A aplicação de células especializadas é limitada, pois não são capazes de serem expandidas e coletadas em quantidade suficiente para o tratamento clínico (Ikada, 2006). Enquanto as células-tronco são células indiferenciadas que possuem grande

capacidade de proliferação e auto-renovação e de diferenciação em linhagens especializadas, apresentando um enorme potencial para aplicação clínica (Mountford, 2008).

De acordo com seu potencial de diferenciação as células-tronco podem ser basicamente totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Wagers & Weissman, 2004).

Após a fecundação as células que formam a mórula são capazes de originar um indivíduo completo, inclusive os anexos embrionários, por isso são consideradas totipotentes (Fischbach & Fischbach, 2004).

As células-tronco embrionárias, isoladas da massa interna do blastocisto são capazes de diferenciar em células de origem dos três folhetos embrionários, sendo consideradas pluripotentes. Suas características de proliferação prolongada e pluripotência geraram enorme expectativa para seu uso terapêutico, no entanto sua capacidade de formar teratomas e envolvimento em questões éticas, políticas e religiosas, decorrente do uso do embrião, tem limitado sua utilização (Mountford, 2008). No Brasil o uso de embrião humano é regulamentado pela Lei de Biossegurança 11.105, 2005 Art.5º (Pereira, 2008).

As células-tronco de pluripotência induzida (ips) podem ser uma forma de contornar os problemas relacionados às células-tronco embrionárias. Através da reprogramação de células somáticas, por transferência nuclear de alguns fatores de transcrição (Oct3/4; Sox 2; c-myc), é possível reverter e alcançar o estado de pluripotência (Takahashi & Yamanaka, 2006), mas mesmo assim muitas questões moleculares e funcionais sobre estas células ainda são desconhecidas, sendo necessário maiores estudos (Volarevic *et al.*, 2011).

Dessa forma, uma alternativa aos problemas expostos é a utilização de células-tronco adultas, multipotentes, capazes de originar células de diversos tecidos, mas não de todos os folhetos embrionários. Essas células podem originar tipos celulares de origem embrionária diferente, por um processo denominado plasticidade (Raff, 2003). E as mais estudadas são as células-tronco hematopoiéticas (HSC) e mesenquimais (MSC).

As HSC são responsáveis pela renovação de células sanguíneas da linhagem linfóide e mielóide (Hipp & Atala, 2008).

A fração de células aderentes presentes na medula óssea, capazes de auto-renovar e diferenciar em linhagens celulares de origem mesodérmica (osteoblastos, condroblastos e adipócitos) foram primeiramente descritas por Friedenstein, em 1968, e na década de 90 popularizada como MSC, por Caplan (Lindroos *et al.*, 2011).

Células com características semelhantes às MSC da medula óssea foram isoladas em diversos tecidos: adiposo (Zuk *et al.*, 2001), pele (Toma, *et al.*, 2001), sistema nervoso (Kruger *et al.*, 2002) e líquido amniótico (De Coppi *et al.*, 2007). Dessa forma a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) definiu critérios mínimos para se classificar células como MSC (Domicini *et al.*, 2006):

- 1-aderência a superfície plástica;
- 2-multipotência, *in vitro* (capaz de diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos em condições adequadas);
- 3-devem expressar um conjunto de marcadores: CD105, CD73 e CD90; e não expressar outros: CD34, CD14, CD79a, CD19 e HLA-DR;

As células-tronco humanas derivadas da medula óssea (BMSC) são MSC viáveis para aplicação terapêutica. No entanto, o procedimento de coleta é invasivo com possível morbidade do sítio doador, sendo poucas células isoladas a partir dessa fonte.

O tecido adiposo, de origem mesodérmica, dentre suas funções de reserva energética, envolvimento no metabolismo de gorduras e alguns hormônios esteróides, é atualmente, uma fonte de células-tronco conforme proposto por Zuk *et al.*, em 2001.

Dessa forma, as células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) apresentam várias vantagens em relação as BMSC. Uma vez que o tecido adiposo subcutâneo é acessível e abundante, pode ser extraído por lipoaspiração, que é um procedimento menos invasivo que a aspiração da medula e assim, uma grande quantidade de hASC pode ser isolada. Além disso, o número de células-tronco em 1g de tecido adiposo é cerca de 500 vezes maior do que em 1g de medula óssea (Mizuno, 2009). Quando comparadas as BMSC, as hASC proliferam mais rapidamente e podem ser cultivadas por maior tempo sem senescer (Locke *et al.*, 2009).

Já foi demonstrada a capacidade das hASC em diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, assim como mioblastos, células endoteliais (Locke *et al.*, 2009) e células neuronais (Anghileri *et al.*, 2008) .

Com o avanço das pesquisas envolvendo células-tronco e sua potencial utilização clínica, é necessária uma expansão *ex vivo* dessas células e é fundamental controlar essa etapa laboratorial (Lindroos *et al.*, 2011).

Novas regulamentações da *Food and Drugs Administration* (FDA) classificam os procedimentos envolvendo células de acordo com o grau de manipulação em (i) mínima manipulação, como criopreservação de células autólogas e (ii) manipulação maior que mínima, por exemplo, expansão *ex vivo*, ativação celular, aplicação com componentes não teciduais e transplante de células ou tecidos alogênicos (Harvath , 2000 e Lindroos *et al.*, 2011).

Diferentemente da indústria farmacêutica, na qual o processamento é direcionado a uma produção em massa, na engenharia de tecidos a demanda laboratorial é por um produto, praticamente, individualizado. E por isso os protocolos de Boas Práticas de Manipulação (GMP) para utilização de células-tronco envolvem o controle de qualidade em todas as fases do processo, dentre os quais podemos citar: testes funcionais; controle da produção por testes bacteriológicos, fenotípico e visual das culturas; testes que garantam que as células não sofreram transformação (cariótipo, expressão de telomerase, c-myc, FISH) e um teste de qualidade final, incluindo viabilidade e fenotipagem, compatíveis com a rápida liberação das células (Lindroos *et al.*, 2011).

Uma questão crucial na utilização clínica das células-tronco é a escolha de uma ótima estratégia de cultivo através da elaboração de um meio de cultura ideal. Ainda não existe um consenso e, portanto, o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e o Meio Essencial Mínimo (α -MEM) são geralmente empregados e suplementados com soro fetal bovino (SFB) (Lindroos *et al.*, 2011). A condição de cultura das células *in vitro* deve ser semelhante a condição fisiológica *in vivo*, desde a superfície de cultura, temperatura, pH, osmolaridade até suporte de oxigênio e nutrientes, para manutenção do crescimento e expressão de funções metabólicas das células. Sendo o meio de cultura um dos fatores mais importante para alcançar tal similaridade (Brunner *et al.*, 2010).

O soro animal é uma mistura de inúmeros constituintes (proteínas, fatores de adesão, enzimas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, lipídeos, ácidos graxos, vitaminas, elementos traço e carboidratos) que são responsáveis por fornecer (i) fatores de crescimento e hormônios, (ii) proteínas de transporte, (iii) fatores de adesão (iv) fatores de detoxificação (v) inibidores de protease, (vi) fatores para manutenção de pH e pressão osmótica, e (vii) reduzir o *shear stress* (Brunner *et al.*, 2010).

Do ponto de vista biológico e no contexto deste trabalho, a utilização do SFB como suplemento é desvantajosa, principalmente por conter proteínas xenogênicas que podem ser internalizadas pelas células-tronco ou aderir a superfície dessas células (Spees *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Heiskanen *et al.*, 2007), podendo provocar reações imunológicas (Selvaggi *et al.*, 1997), conter endotoxinas e ser uma fonte potencial de microorganismos patogênicos (vírus, bactérias e príons) (Mannello & Tonti, 2007). Ainda por ser um suplemento mal definido apresenta variação de lote para lote (Preece & Gregory, 1982). Além disso, acarreta na morte de milhões de fetos para sua obtenção, representando um problema ético (Brunner *et al.*, 2010).

Devido aos potenciais riscos associados a exposição das células-tronco ao SFB, durante a expansão *ex vivo*, diversos estudos vem sendo conduzidos na tentativa de substituir este suplemento por soro AB (alogênico ou autólogo) (Bieback *et al.*, 2009; Kocaoemer *et al.*, 2007; Shahdadfar *et al.*, 2005; Lindroos *et al.*, 2010), plasma rico em plaquetas – trombina ativada (Bieback *et al.*, 2009; Kocaoemer *et al.*, 2007), lisado plaquetário humano (Bernardo *et al.*, 2007; Bieback *et al.*, 2009) e meios de cultura quimicamente definido, livre de soro (van der Valk *et al.*, 2010).

O risco da utilização das MSC expandidas, *ex vivo*, não está associado somente com o potencial de imunogenicidade das células expostas aos componentes dos meios, mas com o potencial de sofrerem transformação durante a expansão, levando ao acúmulo de alterações genéticas. A transformação maligna pode acarretar em taxa de proliferação aumentada, morfologia alterada, anormalidades fenotípicas e citogenéticas, além disso, podem induzir formação de tumor. Por ainda não existir evidências conclusivas a respeito, células expandidas *in vitro* são adequadas para serem utilizadas em terapias, mas recomenda-se a realização dos ensaios genéticos, funcionais e

fenotípicos rotineiramente antes de sua utilização *in vivo* (Bernardo *et al.*, 2011).

Para a utilização na engenharia de tecidos as células devem ser obtidas em grande quantidade, por procedimento pouco invasivo, ser diferenciadas em múltiplas linhagens de maneira regulada, ser transplantadas de maneira segura e efetiva para receptor autólogo ou alogênico e ser processadas de acordo com as normas de BPM (Gimble *et al.*, 2007; Lindroos *et al.*, 2011).

Vários trabalhos, descritos na literatura, demonstram a capacidade de diferenciação osteogênica de hASC promovida em matrizes de diversos biomateriais: de colágeno (Gabbay *et al.*, 2006), beta-fosfato tricálcico (β -TCP) (Hattori *et al.*, 2006) e poli-ácido láctico (PLA)/ β -TCP, PLA/ vidro bioativo (Haimi *et al.*, 2009). E do potencial uso como substitutos ósseos de matrizes tridimensionais de PHB-HV (Köse *et al.*, 2003; Köse & Kenar *et al.*, 2003; Kumarasuriyar *et al.*, 2005).

Dessa forma, hASC são células atrativas para a regeneração óssea, por estarem disponíveis em grandes quantidades em lipoaspirados. E devido à característica multipotente, é conhecida sua capacidade de diferenciação osteogênica através do enriquecimento do meio de cultura com fatores indutores já estabelecidos, como a dexametasona, o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato (Girolamo *et al.*, 2007).

Esta pesquisa envolve também a utilização de uma matriz tridimensional altamente porosa constituída do polímero natural PHB-HV, obtida pela técnica de *freeze-drying*. O PHB-HV é um polímero natural atraente por sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, assim como, por ser produzido a partir de uma matéria prima renovável e abundante, a cana-de-açúcar e a um baixo custo.

Diante do exposto, esta é a primeira pesquisa que avalia o potencial das hASC associadas a uma matriz tridimensional de PHB-HV, em sofrer diferenciação osteogênica através de um meio de cultura suplementado com *pool* de soro alogênico humano (SH alo), enriquecido com fatores de indução.

Dessa forma, a avaliação do processamento, *in vitro*, desse constructo visa buscar uma forma viável e segura de cultivo celular, adequando às normas de BPM, em etapa prévia ao transplante para receptores alogênicos na prática clínica da engenharia de tecido ósseo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho é avaliar a capacidade das hASC em diferenciar em células da linhagem osteogênica, ao serem cultivadas em meio de cultura suplementado com SH alo sobre uma matriz tridimensional de PHB-HV.

2.2. Objetivos específicos

- Processar e caracterizar as matrizes tridimensionais constituídas pelo polímero PHB-HV.
- Cultivar e caracterizar as hASC em meio de cultura suplementado com SH alo.
- Avaliar a viabilidade das hASC associadas as matrizes tridimensionais de PHB-HV.
- Avaliar a diferenciação das hASC semeadas sobre as matrizes tridimensionais de PHB-HV em células da linhagem osteogênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Processamento das matrizes tridimensionais de PHB-HV

As matrizes tridimensionais desenvolvidas são constituídas pelo PHB-HV, com conteúdo de 12% de HV, peso molecular 425.692 kDa. Este polímero foi obtido a partir da fermentação da cana-de-açúcar por bactérias do gênero *Alcaligenes*, produzido e fornecido pela PHB Industrial S/A., Serrana – SP, Brasil.

As matrizes tridimensionais de PHB-HV foram processadas pelo Grupo “3B’s *Research Group in Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics*” – Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa, Braga, Portugal.

Para o desenvolvimento das matrizes tridimensionais de PHB-HV foi utilizada a técnica de *freeze-drying*. O pó do polímero PHB-HV, sem nenhum tratamento adicional para purificação, foi dissolvido em clorofórmio (VWR International – Laboratorial Material Ltd., Portugal) à 65 °C, sob constante agitação magnética até a dissolução completa, obtendo a solução polimérica com concentração final de 7,5% PHB-HV. A esta solução polimérica foi adicionada uma fase aquosa de ácido acético (Panreac, Espanha) para obter uma emulsão, que foi congelada à -80 °C e subsequentemente liofilizada (Telstar - Terassa, Espanha) à -76,6 °C, por 94 h. As matrizes tridimensionais produzidas foram cortadas em matrizes de tamanho menor com aproximadamente 5 mm de diâmetro e 6 mm de altura.

3.1.1. Esterilização das matrizes tridimensionais de PHB-HV

Todas as matrizes tridimensionais de PHB-HV produzidas foram esterilizadas por irradiação gama, a 15 KGy, por 30 minutos. A irradiação foi realizada no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – UFMG (CDTN).

3.1.2. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV

3.1.2.1. Caracterização estrutural

As matrizes tridimensionais de PHB-HV foram analisadas para uma avaliação preliminar da sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para essas análises as amostras foram submetidas a metalização com ouro, prévia a observação ao microscópio eletrônico de varredura.

Para a análise da estrutura tridimensional interna das matrizes foi utilizado um equipamento de microtomografia computadorizada, por uma técnica não destrutiva. Imagens seriadas obtidas foram reconstruídas tridimensionalmente para analisar a microestrutura das matrizes, morfologia dos poros e determinar a porosidade e tamanho dos poros.

Teste de compressão mecânica foi realizado. E os valores descritos significam a média de análises obtidas em diferentes matrizes.

3.1.2.2. Caracterização química

As matrizes tridimensionais de PHB-HV foram analisadas através de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), com o objetivo de caracterizar e confirmar os constituintes químicos através da captação de raios-X característicos resultantes da interação do feixe primário de elétrons com a amostra. As matrizes foram submetidas a metalização com ouro, prévia, a observação ao microscópio eletrônico de varredura, através do qual as áreas a serem analisadas por EDS foram escolhidas. O espectrômetro de energia dispersiva (Quanta 200 - FEG - FEI - 2006) – Centro de Microscopia/UFMG, utilizado, fornece a informação qualitativa de cada área analisada.

3.2. Pool de soro alogênico humano

O soro humano foi obtido de doadores voluntários, entre 20 e 40 anos, submetidos à técnica de coleta de sangue convencional com tubos para coleta de sangue (VACUPLAST), a vácuo e sem anticoagulante, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer nº ETIC 0023.0.203.000-11).

O sangue total coletado foi deixado coagular espontaneamente à 4 °C e centrifugado a 252 G e 20 °C, por 15 minutos para separação do soro. O soro de diferentes doadores (pelo menos 5 doadores) foi removido dos tubos de coleta e misturado para produzir o SH alo. Posteriormente, o soro foi inativado à 56 °C, por 30 minutos e congelado à -20 °C para ser utilizado na produção do meio de cultura para as células.

3.3. Meios de cultura celular

As hASC utilizadas no presente estudo foram cultivadas em 4 condições de cultura diferentes. Para manutenção do estado indiferenciado: (i) meio de cultura basal suplementado com SFB e (ii) meio de cultura basal suplementado com SH alo. Para indução da diferenciação osteogênica: (iii) meio osteogênico suplementado com SFB (descrito nas figuras como SFB DIF) e (iv) meio osteogênico suplementado com SH alo (descrito nas figuras como SH alo DIF).

3.3.1. Meio de cultura basal

DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Cinética Química Ltda), 10% de SFB (Cripion) ou 10% de SH alo, 1000 unidades/mL de penicilina, 1 mg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich) e 60 mg/L de gentamicina (Schering-Plough).

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

3.3.2. Meio osteogênico

Aos meios de cultura basal foram adicionados os fatores indutores: 50 µg/mL de ácido ascórbico (Ecibra), 10 mM de β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich) e 0,1 µM dexametasona (Aché).

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

3.4. Isolamento e cultivo das hASC

O isolamento e cultivo das hASC foram realizados conforme descrito por Zuk *et al.*, 2001.

As hASC foram obtidas do lipoaspirado resultante de pacientes, entre 20 e 40 anos, submetidos à cirurgia de lipoaspiração realizada na Clínica Origen em Belo Horizonte, Minas Gerais, coordenada pelo Dr. Selmo Gerber, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer nº ETIC 0023.0.203.000-11).

O lipoaspirado de diferentes partes do corpo, flancos direito e esquerdo e regiões infra e supra umbilical, foi acondicionado em seringas estéreis e encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado no Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

Em capela de fluxo laminar vertical, o conteúdo das seringas foi transferido para tubos de polietileno de 50 mL (Sarstedt) para lavagens com mesmo volume de tampão fosfato salina 0,15 M, pH 7,2 (PBS), seguido de centrifugação a 252 G, 20 °C, por 6 minutos. Após a centrifugação o produto de lipoaspiração formou uma solução bifásica, cuja fase inferior continha a solução de PBS e células sanguíneas e a fase superior, o tecido adiposo.

A fase superior foi transferida para novo tubo de polietileno (50 mL) e tratada com solução de colagenase tipo I (Gibco) 0,10% em PBS 0,15 M, pH 7,4, na proporção de 1:1, por 2 horas, em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, para digestão da matriz extracelular. Durante este período, a cada 15 minutos, os tubos foram agitados vigorosamente.

Ao término das duas horas de incubação, os tubos foram centrifugados a 252 G, 20 °C, por 10 minutos para obter a fração vascular estromal, que foi ressuspensa em 5 mL de meio de cultura basal suplementado com SFB e também em meio de cultura basal suplementado com SH alo, transferidas para garrafas de cultura celular T-25 (Sarstedt) e mantidas em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Após dois dias de cultivo, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para tubos de polietileno (50 mL) e centrifugado a 252 G, 20 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado foi ressuspensa em 5 mL do respectivo meio de cultura basal e acondicionados em novas garrafas de cultura celular T-75 (Sarstedt).

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,4, para remoção de células sanguíneas residuais e não aderentes, e em seguida foi adicionado novo meio de cultura basal. Quando as células atingiram 70-80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,4 e tratadas com 1 mL de tripsina 0,05% EDTA (invitrogen), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal (9 mL), a suspensão formada foi dividida em duas novas garrafas de cultura celular T-75 e acrescentado mais meio de cultura basal. As células foram expandidas, dessa maneira até a 4ª passagem para serem utilizadas nos experimentos e por mais passagens para acompanhar as culturas ao longo das mesmas.

3.5. Estudos básicos em culturas de hASC

3.5.1. Caracterização do imunofenótipo das hASC

As hASC foram caracterizadas, ao longo das passagens, por citometria de fluxo para análise da expressão das moléculas de superfície celular CD29, CD44 e CD73, que são marcadores expressos em MSC. Para verificar a existência de contaminações da cultura de MSC com HSC, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34 e CD45, que são marcadores expressos em HSC. As células foram também caracterizadas em relação a expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II: HLA-ABC e HLA-DR, respectivamente (Lindroos *et al.*, 2010; Dominici *et al.* e Mitchel *et al.* 2006).

3.5.1.1. Marcação celular com anticorpos primário e secundário

As hASC cultivadas em meio suplementado com SFB e SH alo foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células/poço em placa de 96 poços (fundo em U) e incubadas com 0,4 µg de anticorpos primários (Tab. 2) à 4 °C, por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 *goat* anti-camundongo IgG 2 mg/mL (invitrogen), na diluição de 1:500, à 4 °C, por 30 minutos. Os

anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 e depois fixadas em formaldeído a 2%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. E células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade com a finalidade de estabelecer a população a ser analisada.

Tabela 2. Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

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

3.5.1.2. Leitura no citômetro de fluxo

A obtenção dos dados foi realizada através do citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) utilizando-se o programa CELLQuest. Foram adquiridos 20000 eventos e os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8.

Primeiramente, a população de células de cada cultura a ser avaliada foi delimitada a partir do gráfico de tamanho *versus* granulosidade (Fig. 3). Posteriormente, um gráfico de histograma foi criado para determinar a região do controle negativo de fluorescência referente às células incubadas apenas com o anticorpo secundário. Definidos estes parâmetros, as análises das células marcadas, com anticorpos primário e secundário, foram realizadas.

Os resultados obtidos (% de células fluorescentes para cada marcador) foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm erro médio padrão (EMP).

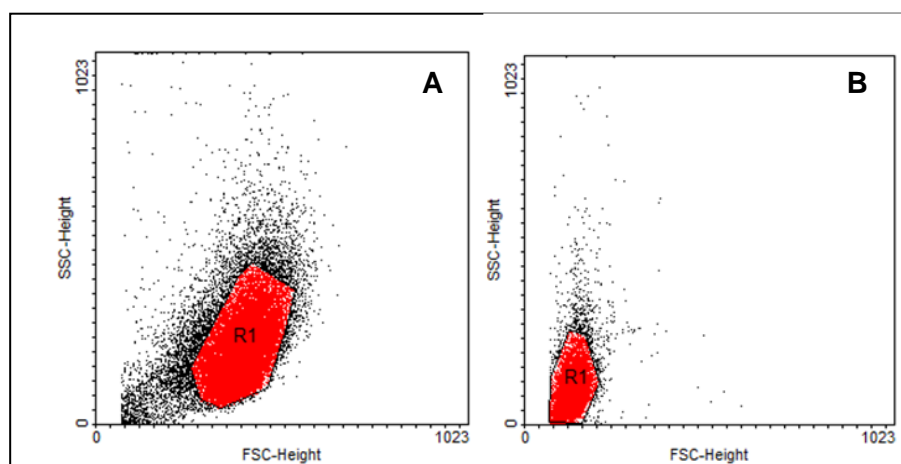


Figura 3. Gráfico de tamanho *versus* granulosidade. R1 é a população escolhida para análise dos marcadores nas culturas em meio suplementado com (A) SFB e (B) SH alo.

3.5.2. Cinética de proliferação

3.5.2.1. Taxa de duplicação acumulada da população e tempo de duplicação

As hASC foram expandidas além da 4^a passagem em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo. Ao alcançarem a confluência em cada passagem, as células foram contadas e a taxa de duplicação da população de cada passagem foi determinada.

Para este ensaio, as hASC foram acompanhadas desde seu isolamento, a partir do lipoaspirado, sendo que em cada passagem foram plaqueadas 1×10^5 células/garrafa de cultura celular T25 (Sarstedt) e incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ até alcançarem a confluência. As culturas confluentes foram contadas: para isso, foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,4 e removidas das garrafas de cultura celular T25 utilizando solução de tripsina 0,05% EDTA, por 5 minutos, as células foram centrifugadas a 252 G, por 6 minutos e ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura basal suplementado com o respectivo soro para contagem do número de células através de um hemocitômetro (HBG, Germany).

A taxa de duplicação da população de cada passagem foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$x = [\log_{10} N2 - \log_{10} N1] \div \log_{10} 2$$

na qual,

x: taxa de duplicação da população;

N2: número de células contadas ao alcançarem confluência;

N1: número de células plaqueadas;

Para calcular a taxa de duplicação acumulada da população, a taxa de duplicação da população determinada em cada passagem foi adicionada a da passagem anterior (Kocaoemer *et al.*, 2007). Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* e *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

Paralelamente, o tempo de duplicação das células cultivadas nos diferentes meios de cultura foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$y = (T2 - T1) \times \log_{10} 2 \div \log_{10}(N2 \div N1)$$

na qual,

y: tempo de duplicação;

T2: horário de contagem das células;

T1: horário de plaqueamento das células;

N2: número de células contadas ao alcançarem confluência;

N1: número de células plaqueadas;

3.5.2.2. Curva de crescimento

O tempo de crescimento das hASC, cultivadas nos meios de cultura basal suplementado com SFB e SH alo, foi determinado pela contagem do número de células em tempos definidos. No tempo 0, 5×10^3 células, na 4ª passagem, foram plaqueadas em garrafas de cultura celular T25 e incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ pelos seguintes intervalos de tempo: 3, 5, 7, 9 e 11 dias. Ao final de cada intervalo as células foram contadas, de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.2.1, em hemocítômetro.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *one-way* e *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

3.5.3. Viabilidade e proliferação celular

A viabilidade e proliferação das hASC foram mensuradas pelo ensaio de MTT, baseado em um método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água (Mosmann, 1983). Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade óptica pode ser determinada pelo espectrofotômetro a 595 nm. O número de células viáveis é diretamente proporcional a quantidade de cristais de formazan produzido.

As hASC, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo, foram semeadas em placas de 24 poços (NUNC) na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura basal. As células foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado e 210 μ L/poço do respectivo meio de cultura basal foi adicionado. Em seguida, foi acrescentado 170 μ L/poço de solução de MTT (invitrogen) (5 mg/mL) e a placa incubada em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas. As hASC foram observadas ao microscópio óptico (M. O.) (OLYMPUS IX70) para visualização dos cristais de formazan. E estes foram solubilizados através da adição de 210 μ L/poço de uma solução de SDS 10%-HCl (ácido clorídrico 0,01 M - 10% de sulfato de sódio dodecil em água) seguido de incubação em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Transferiu-se 100 μ L de cada poço para uma placa de 96 poços (fundo reto), em triplicata, e a densidade óptica foi mensurada no espectrofotômetro a 595 nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

3.5.4. Atividade da fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada através do ensaio de BCIP-NBT (Gibco). Este ensaio é baseado na reação cromogênica decorrente da clivagem de um grupamento fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato *p*-toluidina) pela fosfatase alcalina produzida pelas células. Essa reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico), formando um precipitado insolúvel de cor púrpura (Valerio *et al.*, 2004).

As hASC, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo, foram semeadas em placas de 24 poços (NUNC) na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura basal. Em seguida, foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado, às células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 e incubadas com 200 µL/poço da solução de BCIP-NBT (preparada de acordo com as instruções do fabricante) à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas.

Após o período de incubação observou-se a formação dos precipitados púrpura em M. O. (OLYMPUS IX70). Em seguida, foram adicionados 210 µL/poço de SDS 10%-HCl para a solubilização dos precipitados púrpura. E as placas foram incubadas em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Transferiu-se 100 µL de cada poço, em triplicata, para uma placa de 96 poços (fundo reto) e a densidade óptica foi medida no espectrofotômetro a 595 nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo os reagentes foram executados em condições de mínima luminosidade.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média ± EMP.

3.6. Diferenciação osteogênica das hASC

Para promover a diferenciação osteogênica, as hASC foram cultivadas com o meio osteogênico (item 3.3.2), à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 7, 14, 21 e 28 dias. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Os ensaios para comprovar a diferenciação foram realizados após cada intervalo

de cultivo e estão descritos a seguir. Todas as culturas e experimentos envolvendo o meio de diferenciação foram realizados em condições de mínima luminosidade.

3.6.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica

Para avaliar a proliferação celular, durante a indução da diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio de MTT.

As hASC, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo, foram semeadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços (NUNC) contendo 1 mL do respectivo meio osteogênico suplementado com SFB ou SH alo. Incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 7, 14, 21 e 28 dias. Como controle, hASC também foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura basal, na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições.

Ao término de cada período de indução, o ensaio de MTT foi realizado conforme descrito no item 3.5.3.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

3.6.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica

Para avaliar a atividade da fosfatase alcalina, durante a indução da diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio de BCIP/NBT.

As hASC, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo, foram semeadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços (NUNC) contendo 1 mL do respectivo meio osteogênico suplementado com SFB ou SH alo. Incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 7, 14, 21 e 28 dias. Como controle, hASC também foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura basal na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições.

Ao término de cada período de indução, o ensaio de BCIP/NBT foi realizado conforme descrito no item 3.5.4.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

3.6.3. Avaliação da síntese de colágeno durante a indução da diferenciação osteogênica

Para avaliar a síntese de colágeno pelas células, durante a indução da diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* (Tullberg-Reinert & Jundt, 1999).

As hASC, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo, foram semeadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços (NUNC) contendo 1 mL do respectivo meio osteogênico suplementado com SFB ou SH alo e incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂. As hASC foram induzidas por 7, 14, 21 e 28 dias. Como controle, hASC também foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura basal, nas mesmas condições.

Ao término de cada período de indução, as células de todos os grupos foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4. Em seguida, foram adicionados 1 mL/poço da solução de *Bouin* (solução aquosa de ácido pícrico saturada / formol 37% / ácido acético) e incubadas à 37 °C, sob agitação, por 1 hora para fixação das células. Após a fixação, as células foram lavadas em água corrente por 15 minutos e, em seguida, com água destilada para posterior coloração pelo reagente *Sirius Red* à 37 °C, sob agitação, por 30 minutos. O excesso do corante foi removido e os poços foram lavados com HCl 0,01 N. Posteriormente foram adicionados 300 μ L de NaOH 0,5 M, por 30 minutos e agitação. Transferiu-se 100 μ L de solução para uma placa de 96 poços (fundo reto) e a densidade óptica foi mensurada no espectrofotômetro a 540 nm.

Uma curva padrão de concentração de colágeno foi produzida a partir de dosagens estabelecidas de colágeno bovino comercial tipo I. O colágeno em pó foi dissolvido em solução de ácido acético 0,1 N, em diferentes concentrações e transferido para placas de 24 poços (NUNC), que foram deixadas secar a 37 °C. Em seguida, o colágeno distribuído sobre a superfície dos poços da placa foi submetido ao mesmo procedimento de dosagem de colágeno acima descrito. Os resultados de densidade óptica obtidos foram utilizados para produção da curva padrão de concentração de colágeno (Fig. 4).

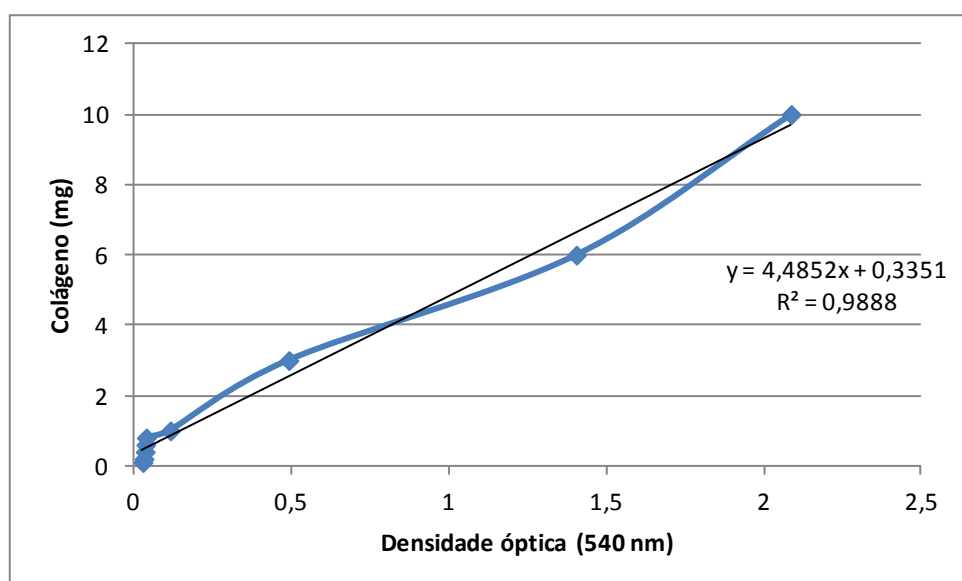


Figura 4. Curva padrão para concentração de colágeno bovino tipo I. A equação da reta fornece a concentração de colágeno em mg de acordo com a densidade óptica obtida em 540 nm.

Utilizando a curva padrão de concentração de colágeno, a concentração de colágeno sintetizada pelas células ao final de cada tempo de cultura e indução foi inferida a partir da densidade óptica obtida a 540 nm.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

3.6.4. Avaliação da mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica

Para avaliar mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica foi realizado a coloração pelo método de *von Kossa*.

As hASC, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo, foram semeadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços (NUNC) contendo 1 mL do respectivo meio osteogênico suplementado com SFB e SH alo e incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂. As hASC foram induzidas por 7, 14, 21 e 28 dias. Como controle, hASC também foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura basal, nas mesmas condições.

Ao término de cada período de indução, as células de todos os grupos foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 e fixadas com solução de 4% de *p*-

formaldeído em PBS 0,2 M, pH 7,4, por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas abundantemente com água destilada, adicionado 1 mL/poço de solução de 5% de nitrato de prata (AgNO_3) em água e as células foram expostas a luz ultra-violeta, por 1 hora. A solução de AgNO_3 foi removida e as células foram lavadas com água destilada para posterior adição de solução de 5% de tiosulfato de sódio em água, por 5 minutos. Novamente foi realizada lavagem abundante com água destilada e as células coradas com eosina por 40 segundos.

As células foram observadas em M. O. (OLYMPUS IX70, aumento 4x 0.13 PhL e aumento 10x 0.30 Ph1) e fotografadas (SONY Cyber-shot DSC-H3) para demonstração da presença de mineralização indicada pela coloração negra ou marron.

3.6.5. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação

A diferenciação das hASC em células da linhagem osteogênica foi comprovada pela detecção da expressão de proteínas específicas, produzidas por osteoblastos, utilizando a técnica de imunofluorescência.

As hASC foram cultivadas sobre lamínulas (22x22 mm) estéreis, em placa de 6 poços, contendo 2 mL meio osteogênico suplementado com SH alo à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO_2 , por 7, 14, 21 e 28 dias.

Ao término de cada intervalo de indução, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 e fixadas em *p*-formaldeído a 4% em PBS 0,15 M, pH 7,4, por 15 minutos, à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 e foi feita a permeabilização da membrana plasmática utilizando-se Triton-100x a 0,1% em PBS 0,15 M, pH 7,4, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram lavadas novamente com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes por 5 minutos). E em seguida, foi feito o bloqueio da reação, incubando as células com 1% de BSA (albumina de soro bovino) e 5% de soro de cabra em PBS 0,15 M, pH 7,4, por 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo primário diluído em solução de BSA a 1% em PBS 0,15 M, pH 7,4 (Tab. 3), por 2 horas, à temperatura ambiente e em câmara úmida.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados na marcação das células para imunofluorescência.

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
Osteopontina	Policlonal	Coelho	-	abcam [®]	1: 200
Osteocalcina	Monoclonal	Camundongo	-	abcam [®]	1: 100

Após incubação com anticorpo primário, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes por 5 minutos) e, em seguida, foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Tab. 4) diluído em solução de 1% de BSA em PBS 0,15 M, pH 7,4, na proporção de 1:500, por 1 hora em câmara úmida, na ausência de luminosidade e à temperatura ambiente. Os controles negativos foram feitos utilizando-se apenas o respectivo anticorpo secundário.

Tabela 4. Anticorpos secundários utilizados na marcação para imunofluorescência.

Tipo	Fornecedor	Diluição
Alexa Fluor 488 <i>goat</i> anti-coelho IgG	invitrogen	1: 500
Alexa Fluor 488 <i>goat</i> anti-camundongo IgG	invitrogen	1: 500

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 e incubadas com a sonda Hoechst (1 µg/mL) (Molecular Probes), por 20 minutos para marcação do núcleo. Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes por 10 minutos). E as lamínulas montadas com *Hydromount* sobre lâminas.

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

3.7. Colonização *in vitro* das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASC

As matrizes de PHB-HV foram dispostas em placas de 48 poços, 1 matriz/poço e em seguida 5×10^3 hASC foram semeadas sobre cada matriz tridimensional. A placa foi incubada à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 1

hora, para a adesão celular à matriz. Após a incubação, foi adicionado 1 mL/poço de meio de cultura basal suplementado com SH alo e as células foram cultivadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

3.7.1. Avaliação da colonização e adesão celular as matrizes tridimensionais de PHB-HV

Análises por MEV foram realizadas para confirmar a presença e adesão das hASC à superfície das matrizes colonizadas.

Após a colonização das matrizes (item 3.7), estas foram mantidas em meio de cultura basal suplementado com SH alo. Após o 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dia, as matrizes colonizadas foram preparadas para análise por MEV.

A primeira etapa do processamento consiste na fixação das células, assim o meio de cultura foi delicadamente removido e as amostras lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes). Em seguida, as amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, em volume suficiente para cobrir as matrizes, por um período de no mínimo 2 horas à temperatura ambiente.

Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (3 vezes, por 10 minutos) e em seguida adicionado tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, à 4 °C, por 1 hora e protegido de luminosidade. As amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (3 vezes, por 10 minutos) e adicionada solução de ácido tânico 1% em água destilada, por 20 minutos, seguida de lavagens com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (3 vezes por 10 minutos) e adicionada nova solução de tetróxido de ósmio a 1% em água destilada, à 4 °C, por 1 hora, protegido da luz.

Ao término desta etapa, as amostras foram lavadas com água destilada (3 vezes, por 10 minutos), iniciando-se a etapa de desidratação das amostras, através da imersão das mesmas em gradiente de álcool etílico em diferentes concentrações - 30%, 50%, 70%, 90% - (2 vezes, por 10 minutos cada) e por fim, em álcool absoluto, por 30 minutos.

Finalizada a desidratação, as matrizes tridimensionais foram reduzidas de tamanho, utilizando nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO₂,

realizado no aparelho de ponto crítico (Balzers modelo CPD-020), CEMEL do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, processo pelo qual o álcool é substituído por CO₂, evitando dano a célula, causado pela tensão superficial durante o processo de evaporação natural.

As amostras secas foram aderidas sobre suporte de alumínio e submetidas ao processo de metalização com ouro. As imagens foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura (DSM950 - Zeiss), utilizando voltagem de 10 KV e distância de trabalho de 14 mm. A metalização e MEV foram realizadas no CEMEL do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

3.7.2. Viabilidade e proliferação das hASC nas matrizes tridimensionais de PHB-HV

A proliferação e viabilidade das hASC cultivadas nas matrizes de PHB-HV foram avaliadas pelo ensaio de MTT.

As matrizes de PHB-HV colonizadas por hASC, descrito no item 3.7, foram mantidas por 7, 14, 21 e 28 dias em meio de cultura basal suplementado com SH alo. Após cada tempo de cultivo, o ensaio de MTT foi realizado conforme descrito no item 3.5.3.

Para verificar se havia interferência da matriz tridimensional no processo de colorimetria, foi realizado o ensaio somente com as matrizes sem células e a média dos valores da densidade óptica obtidos, foi similar ao realizado somente com os reagentes envolvidos, mesmo assim dos valores obtidos para as matrizes com células, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo, nos diferentes tempos, foi subtraído o valor da média obtido somente com as matrizes.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

3.8. Diferenciação osteogênica das hASC associadas as matrizes tridimensionais de PHB-HV

As matrizes de PHB-HV foram colonizadas conforme descrito no item 3.7 e após 24 horas de incubação com o meio de cultura basal, este foi trocado pelo meio osteogênico suplementado com SH alo. Estas foram cultivadas, à 37

°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 7, 14, 21 e 28 dias. Após cada intervalo de cultivo, as amostras foram utilizadas em ensaios, descritos a seguir, para comprovar a diferenciação das hASC em células da linhagem osteogênica.

3.8.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica

As matrizes de PHB-HV foram colonizadas por hASC e induzidas a diferenciação osteogênica, descrito no item 3.8. A proliferação celular durante a indução da diferenciação foi avaliada pelo ensaio de MTT descrito no item 3.5.3. Como controle foram utilizadas matrizes colonizadas com hASC em meio de cultura basal suplementado com SH alo, nas mesmas condições.

Para evitar a possível interferência da matriz tridimensional no processo de colorimetria, também foi realizado o ensaio somente com as matrizes sem células e a média dos valores da densidade óptica obtidos, foi similar ao realizado somente com os reagentes envolvidos. Mesmo assim dos valores de densidade óptica obtidos para as matrizes com células, nos diferentes tempos, foi subtraído o valor da média obtido somente com as matrizes.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *one-way* e *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média ± EMP.

3.8.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica

As matrizes de PHB-HV colonizadas por hASC e induzidas a diferenciação osteogênica, descrito no item 3.8, foram avaliadas, após cada intervalo de cultivo, em relação a atividade da fosfatase alcalina das hASC pelo ensaio de BCIP/NBT realizado conforme descrito no item 3.5.4. Como controle foram utilizadas matrizes colonizadas com hASC em meio de cultura basal suplementado com SH alo, nas mesmas condições.

Para evitar a possível interferência da matriz tridimensional no processo de colorimetria, também foi realizado o ensaio somente com as matrizes sem células e a média dos valores da densidade óptica obtidos, foi similar ao realizado somente com os reagentes envolvidos. Mesmo assim dos valores de

densidade óptica obtidos para as matrizes com células, nos diferentes tempos, foi subtraído o valor da média obtido somente com as matrizes.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

3.8.3. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação

As matrizes de PHB-HV colonizadas por hASC induzidas a diferenciação osteogênica, descrito no item 3.8, foram processadas por criomicrotomia, após cada intervalo de cultivo. As secções obtidas foram submetidas à técnica de imunofluorescência para detectar a expressão de proteínas específicas, produzidas por osteoblastos.

3.8.3.1. Processamento das amostras para obtenção de secções por criomicrotomia

As amostras foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4, por 2 vezes para retirar o meio de cultura e fixadas em solução de *p*-formaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, por 24 horas. Em seguida, foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4, por 5 minutos e colocadas em solução de sacarose a 10% em PBS 0,15 M, à 4 °C, por 6 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para uma solução de sacarose a 20% em PBS 0,15 M, à 4 °C, por 24 horas. Posteriormente as amostras foram congeladas em meio de inclusão para criostato, solúvel em água (KILLIK- Easy Path). Secções histológicas de 10 μ m foram obtidas em criostato (Leica CM1510S-Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e estas foram mantidas à -20 °C até o momento de realizar a marcação para imunofluorescência (Boeloni *et al.*, 2010).

3.8.3.2. Reação de imunofluorescência nas secções

Secções de todos os grupos (diferentes intervalos de indução) foram descongeladas por 15 minutos e em seguida iniciada a etapa de hidratação, através da imersão das mesmas em álcool absoluto (3 vezes, por 5 minutos) e em gradiente de álcool etílico em diferentes concentrações (95% e 80%), por 5

minutos cada. Para finalizar as secções foram imersas em 6 banhos de água destilada, por 5 minutos e 3 banhos de PBS 0,15 M, pH7,4, por 5 minutos.

A etapa de permeabilização foi realizada incubando as secções com solução Triton X-100 a 0,25% e BSA a 2% em PBS 0,15 M, pH 7,4, (200 µL/secção) por 1 hora, em câmara úmida à temperatura ambiente. As secções foram lavadas através da imersão em PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes, por 5 minutos) e incubadas com solução de BSA a 2% e Tween 20 a 0,1% em PBS 0,15 M, pH 7,4, por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente.

Após a permeabilização, as secções foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes, por 5 minutos), e feito o bloqueio de reações inespecíficas, incubando as secções com solução de 5% de soro de cabra e BSA a 1% em PBS 0,15 M, pH 7,4, por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em solução de PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes, por 5 minutos).

Posteriormente, as secções foram incubadas com os anticorpos primários (Tab. 5) diluídos em solução de Triton X-100 a 0,025% e BSA a 0.2% em PBS 0,15 M, por 2 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente.

Tabela 5. Anticorpos primários utilizados na marcação das secções para imunofluorescência.

Antígeno	Tipo	Espécie	Fornecedor	Concentração
Osteopontina	Policlonal	Coelho	abcam [®]	1: 200
Osteocalcina	Monoclonal	Camundongo	abcam [®]	10µg/mL
Colágeno I	Monoclonal	Camundongo	abcam [®]	1: 200

Após incubação com anticorpo primário, as secções foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes, por 5 minutos) e, em seguida, foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Tab. 4) diluídos em solução de Triton X-100 a 0,025% e BSA a 0.2% em PBS 0,15 M, por 1 hora em câmara úmida, na ausência de luminosidade e à temperatura ambiente. Os controles negativos foram feitos utilizando-se apenas a marcação com os respectivos anticorpos secundários.

Posteriormente, as secções foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes, por 5 minutos) e incubadas com a sonda Hoechst (1 µg/mL), por 20 minutos, para marcação do núcleo. Em seguida, foram feitas novas lavagens

com PBS 0,15 M, pH 7,4 (3 vezes, por 10 minutos). E as lâminas montadas com *Hydromount* e lamínulas.

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

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV

4.1.1. Caracterização estrutural

A técnica de *freeze-drying* (item 3.1) permitiu a obtenção de matrizes tridimensionais de PHB-HV 7,5% (m/v) que foram reduzidas ao diâmetro de 5 mm e 6 mm de altura.

A estrutura dessas matrizes foi avaliada, preliminarmente, por MEV (item 3.1.2.1) e observou-se que estas apresentavam poros de aproximadamente 200 μm , assim como poros de diâmetro menor, interconectados (Fig. 5).

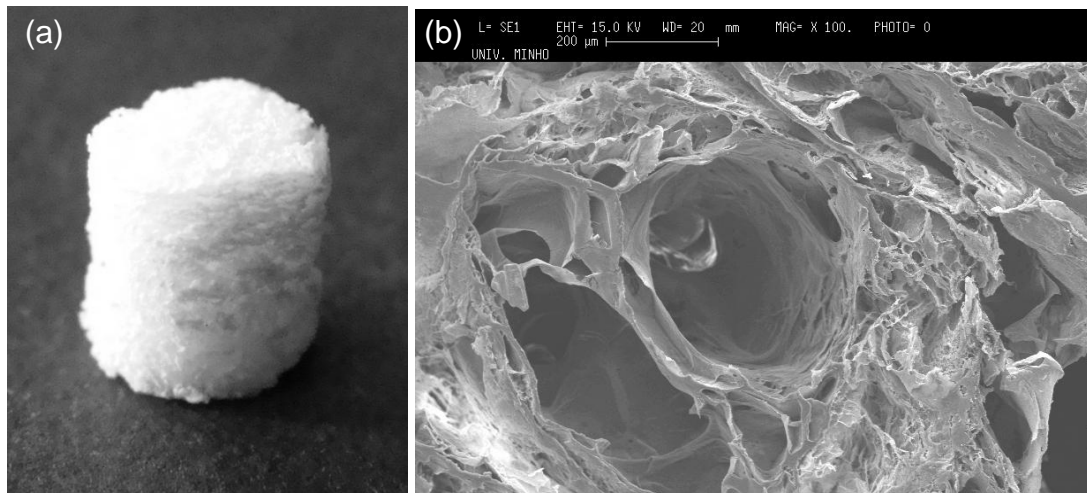


Figura 5. Estrutura das matrizes tridimensionais de PHB-HV. (a) Imagem macroscópica e (b) imagem de MEV representativa da matriz tridimensional de PHB-HV.

Através da técnica de microtomografia computadorizada (item 3.1.2.1), imagens seriadas das matrizes foram obtidas e a reconstrução dessas forneceu uma imagem tridimensional da matriz de PHB-HV (Fig. 6). Não se observou diferenças significativas na morfologia entre suas partes internas e externas. As análises mostraram uma rede de poros totalmente interconectados, porosidade de $88.1 \pm 0.3\%$ e a média do tamanho dos poros de $163.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

O teste de compressão mecânica revelou que as matrizes são estruturas anisotrópicas, com módulo compressivo longitudinal de 1.3 MPa e transversal de 3.8 MPa.

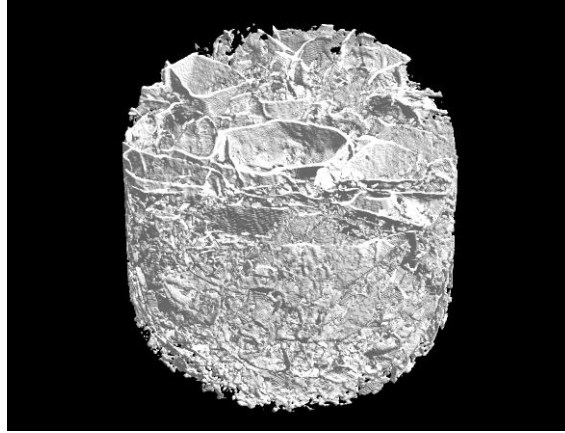
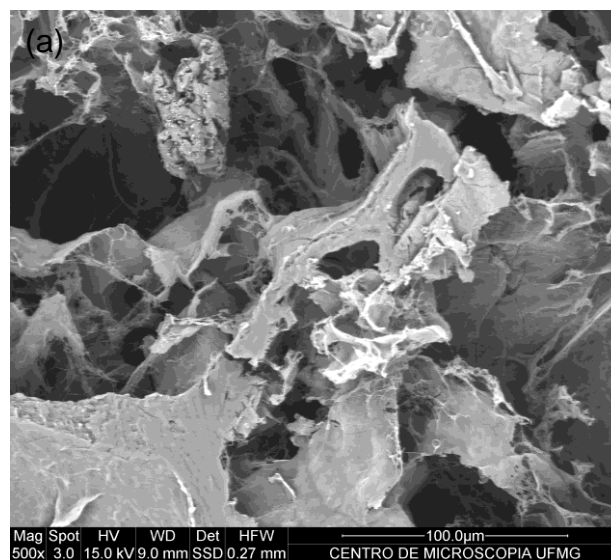


Figura 6. Reconstrução tridimensional da matriz de PHB-HV.

4.1.2. Caracterização química

A análise por EDS, realizada em diversas áreas das matrizes tridimensionais de PHB-HV detectou a presença dos elementos químicos carbono (C), oxigênio (O) e ouro (Au), sendo este último, devido ao processo de metalização das matrizes com ouro (Fig. 7). A sonda utilizada não é capaz de detectar o hidrogênio, portanto sua presença não pôde ser confirmada.



Label A: Chlorite [Nrm.%= 38.86, 20.96, 34.83, 1.14, 3.84, 0.28]

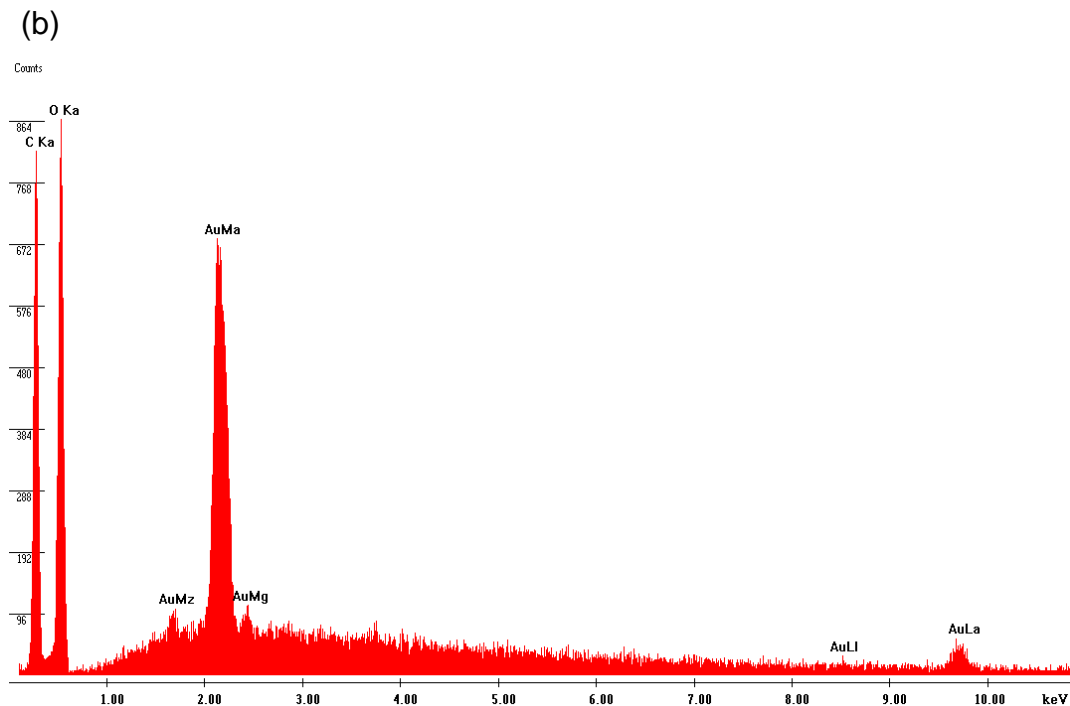


Figura 7. Constituintes químicos da matriz tridimensional de PHB-HV, detectados por EDS. (a) Área selecionada por MEV para realizar a análise por EDS e (b) espectro referente à área analisada.

4.2. Isolamento e cultivo das hASC

As culturas primárias, obtidas após o processamento do lipoaspirado descrito no item 3.4, eram compostas por uma população heterogênea de células, apresentando células aderentes a superfície plástica das garrafas de cultura, de formato fusiforme e células não aderentes, de formato arredondado.

Ao longo do cultivo, com a expansão celular e com a troca dos respectivos meios de cultura basal, um suplementado com SFB e outro com SH alo, o número de células não aderentes diminuiu em ambas as culturas, predominando a população de células aderentes de formato fusiforme, com potencial de auto-renovação e formação de colônias.

O diferencial entre as duas culturas, é que na presença de meio de cultura basal suplementado com SH alo, as células apresentaram um tamanho menor, menos grânulos citoplasmáticos, menor aderência à superfície plástica e maior tendência a se aglomerar ao alcançarem confluência. Além disso, essas culturas apresentavam-se sempre mais densas quando comparadas as culturas cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB (Fig. 8).

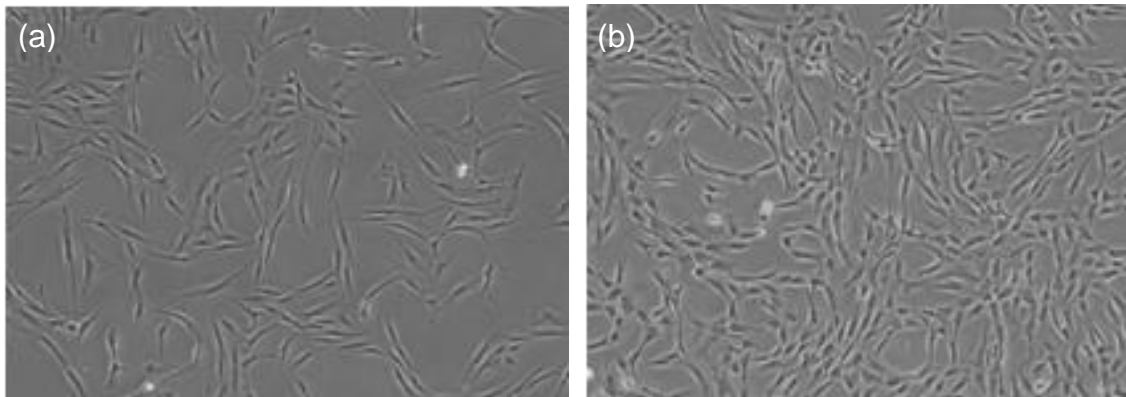


Figura 8. Aspectos morfológicos das hASC isoladas e cultivadas em meio de cultura basal suplementado com (a) SFB e (b) SH alo; M. O., aumento real de 10x.

4.3. Estudos básicos em culturas de hASC

4.3.1. Caracterização do imunofenótipo das hASC

A análise do imunofenótipo das populações de hASC foi realizada ao longo das passagens (item 3.5.1) e a seguir, estão representados os histogramas das populações de células, na 4ª passagem, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e com SH alo (Fig. 9). Estas populações de células analisadas foram determinadas pelo gráfico de tamanho *versus* granulosidade obtido de células sem nenhum tipo de marcação (população R1 - Fig. 3)

A análise dos histogramas das hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB demonstrou que $92,33\% \pm 2,00$ das células expressaram CD29; $0,38\% \pm 0,45$ CD34; $97,40\% \pm 1,22$ CD44; $0,11\% \pm 0,03$ CD45; $96,55\% \pm 0,76$ CD73; $91,76\% \pm 1,45$ HLA-ABC e $0,08\% \pm 0,04$ HLA-DR (Fig. 9 IA-IG).

E a análise dos histogramas das hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo demonstrou que $94,35\% \pm 5,00$ das células expressaram CD29; $1,48\% \pm 0,42$ CD34; $98,04\% \pm 1,34$ CD44; $1,02\% \pm 0,71$ CD45; $90,18\% \pm 9,96$ CD73; $95,98\% \pm 2,45$ HLA-ABC e $0,59\% \pm 0,96$ HLA-DR (Fig. 9 IIA-IIG).

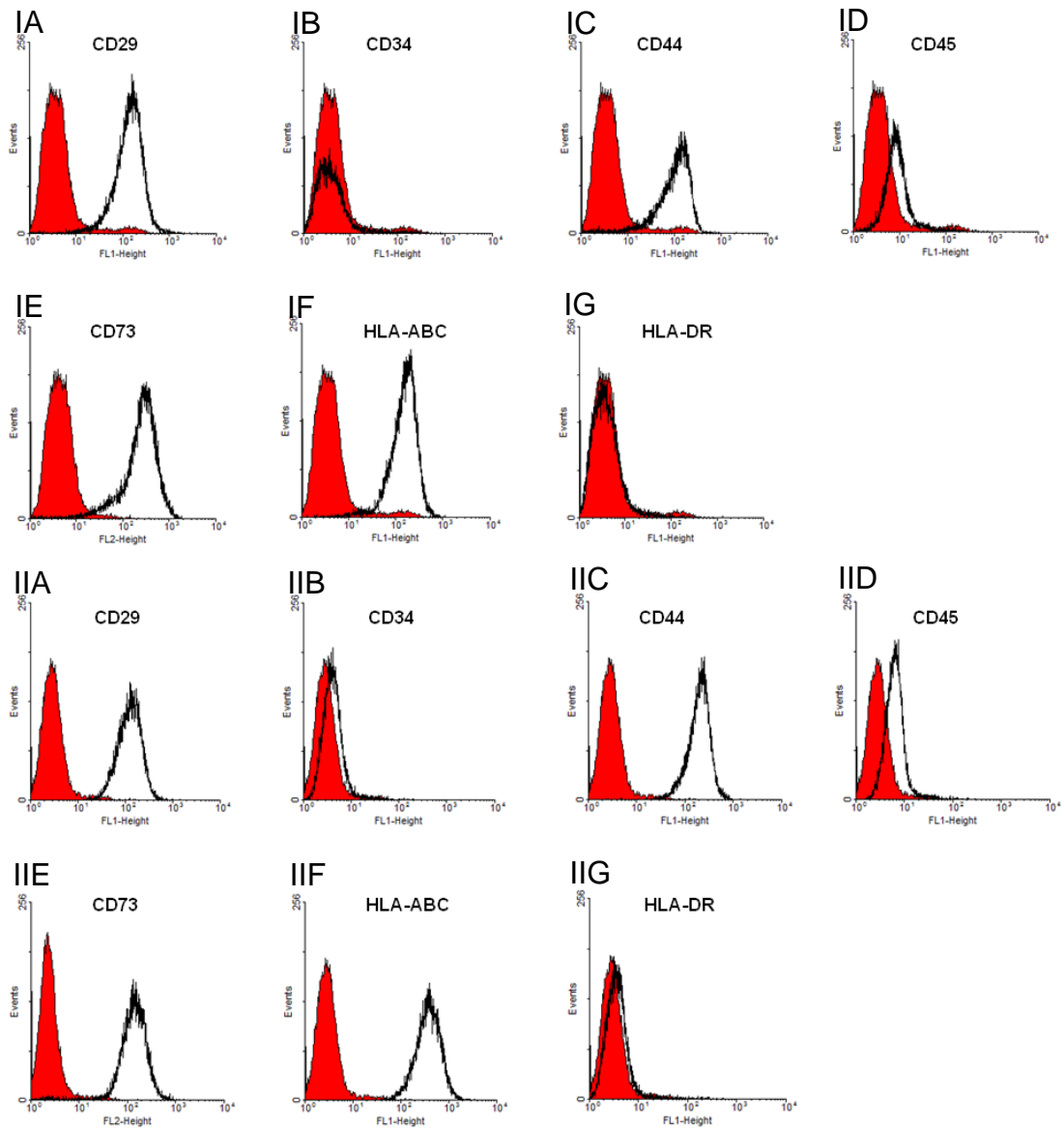


Figura 9. Análise imunofenotípica das hASC através de citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva vermelha é o controle negativo da fluorescência e a curva preta, representa a população de células avaliadas para um marcador específico (o deslocamento para direita indica a existência de marcação). (I) A população de células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e (II) população de células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo para avaliação do marcador (A) CD29; (B) CD34; (C) CD44; (D) CD45; (E) CD73; (F) HLA-ABC e (G) HLA-DR.

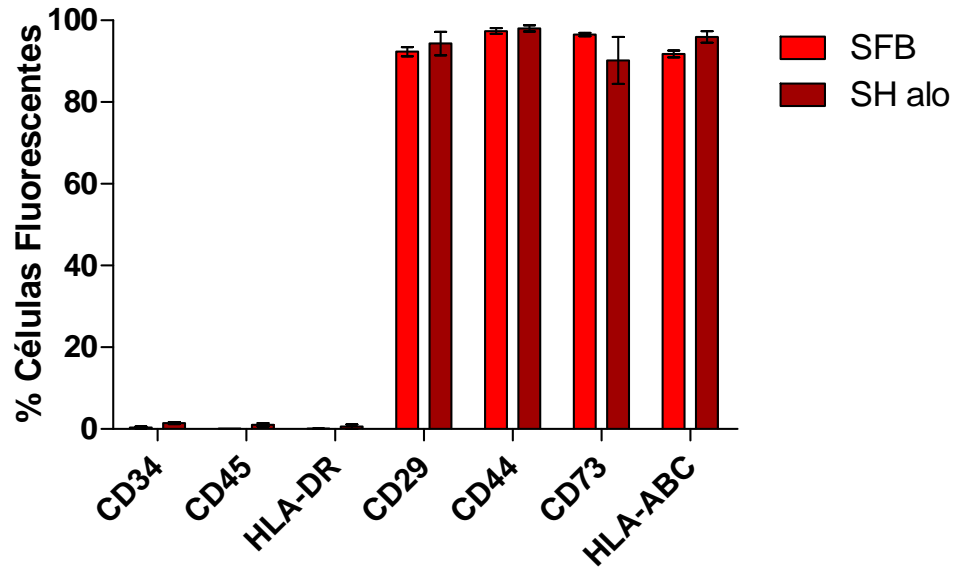


Figura 10. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro das populações R1 (Fig. 3). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados (ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*).

4.3.2. Cinética de proliferação

4.3.2.1. Duplicação acumulada da população e tempo de duplicação

Observou-se uma expansão acumulada significativamente maior na população de células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo comparada ao SFB (Fig. 11). As culturas, em meio de cultura basal suplementado com SH alo, apresentaram um mesmo perfil de expansão acumulada observado até a 16^a passagem, enquanto as culturas em meio de cultura basal suplementado com SFB, só foram acompanhadas até a 10^a passagem, uma vez que a partir da 8^a passagem levaram quase 2 semanas para confluir (item 3.5.2.1).

O tempo de duplicação das hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo (item 3.5.2.1) foram estimados em 120 ± 17 horas e 28 ± 5 horas, respectivamente.

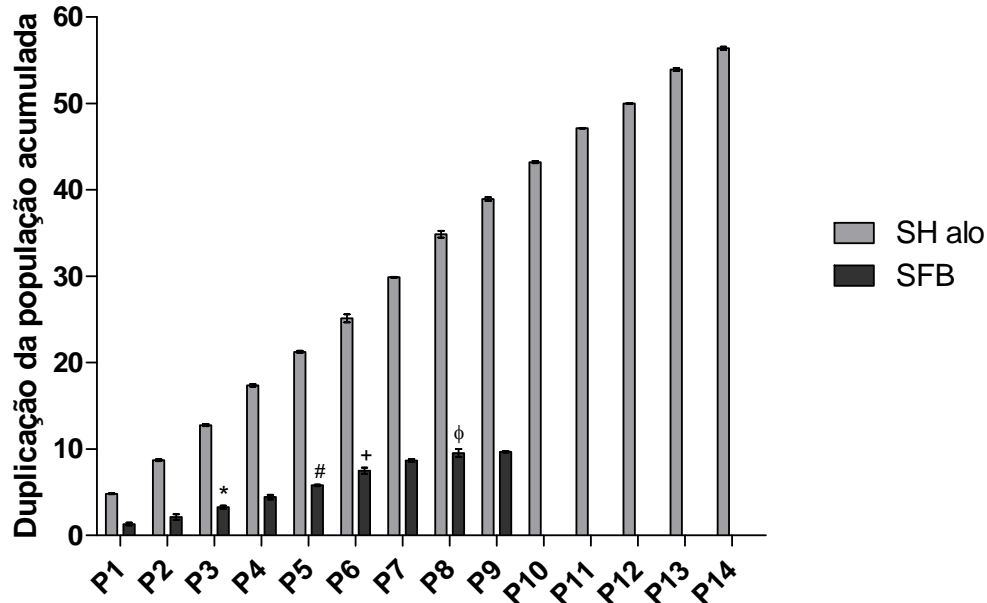


Figura 11. Média acumulada da duplicação das hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo. $n=3$; Houve diferença significativa na expansão acumulada entre os dois grupos avaliados ao longo das passagens (P) (ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*); a expansão acumulada das células, cultivadas em meio suplementado com SH alo foi significativa com $p<0,05$ entre todas as passagens; a expansão acumulada das células cultivadas em meio suplementado com SFB foi significativa com $p<0,05$ quando comparado entre *P1 e P3, #P3 e P5, +P5 e P6 e φP6 e P8 (ANOVA *one-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*).

4.3.2.2. Curva de crescimento

A curva de crescimento das hASC, cultivadas nos 2 meios de cultura, foi realizada utilizando um mesmo número inicial de células e contadas aos 3, 5, 7, 9 e 11 dias de cultivo (item 3.5.2.2). A cinética de proliferação das populações, demonstrada pelas curvas de crescimento (Fig. 12), mostrou um crescimento inicial acelerado das hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo a partir do 7^o dia de cultivo, enquanto as hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB só ocorreu a partir do 9^o dia de cultivo.

Também pôde se observar através deste experimento que as garrafas de cultura das hASC em meio com SH alo alcançaram confluência total ao 9^o dia de cultivo, estagnando a proliferação celular a partir deste dia, enquanto nas garrafas com meio com SFB, as células continuaram a proliferar.

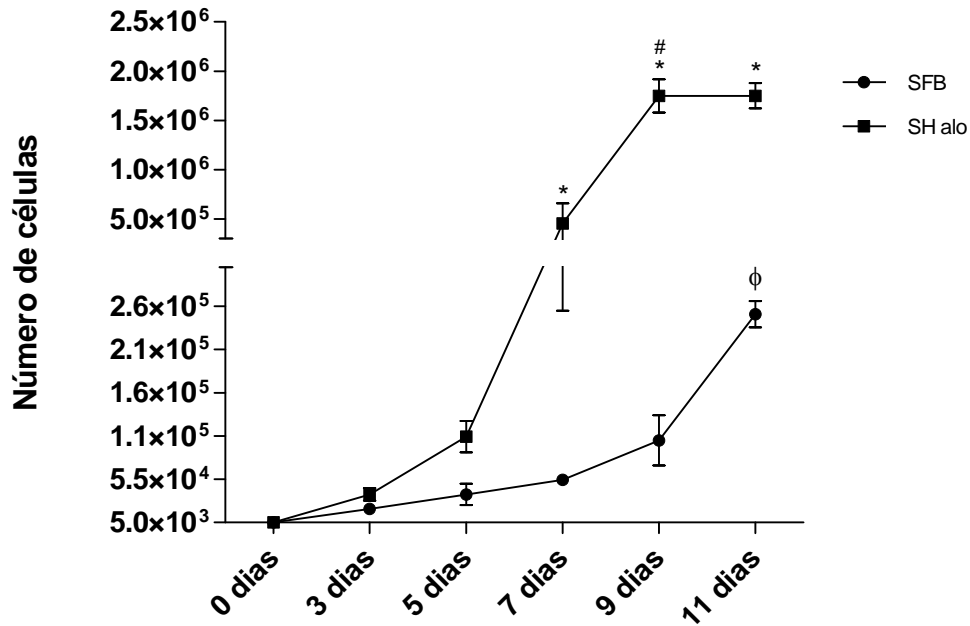


Figura 12. Curva de crescimento avaliando a cinética de proliferação das hASC em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH alo nos dias 3, 5, 7, 9 e 11. $n=3$; * $P<0,05$ comparando hASC cultivadas em meio suplementado com SFB e SH alo nos dias 7, 9 e 11 (ANOVA *two way* seguido pelo teste de *Bonferroni*). O crescimento entre a população de células no mesmo meio de cultivo foi significativo # $P<0,05$ quando comparado entre 7 e 9 dias (SH alo) e φ $P<0,05$ entre 9 e 11 dias (SFB) (ANOVA *one-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*).

4.3.3. Viabilidade e proliferação celular

O ensaio de MTT utilizado consiste na metabolização do substrato MTT por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, levando a formação de cristais de formazan (item 3.5.3). Estes cristais foram observados, por M. O. nas culturas utilizando os diferentes suplementos no meio e por todos os tempos de cultivo avaliados (Fig. 13a-b).

Após a formação dos cristais, esses foram solubilizados com SDS-10% HCl e realizada a leitura de absorbância a 595 nm (item 3.5.3). Observou-se que houve uma maior proliferação das hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo, quando comparadas as hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB (Fig. 13c).

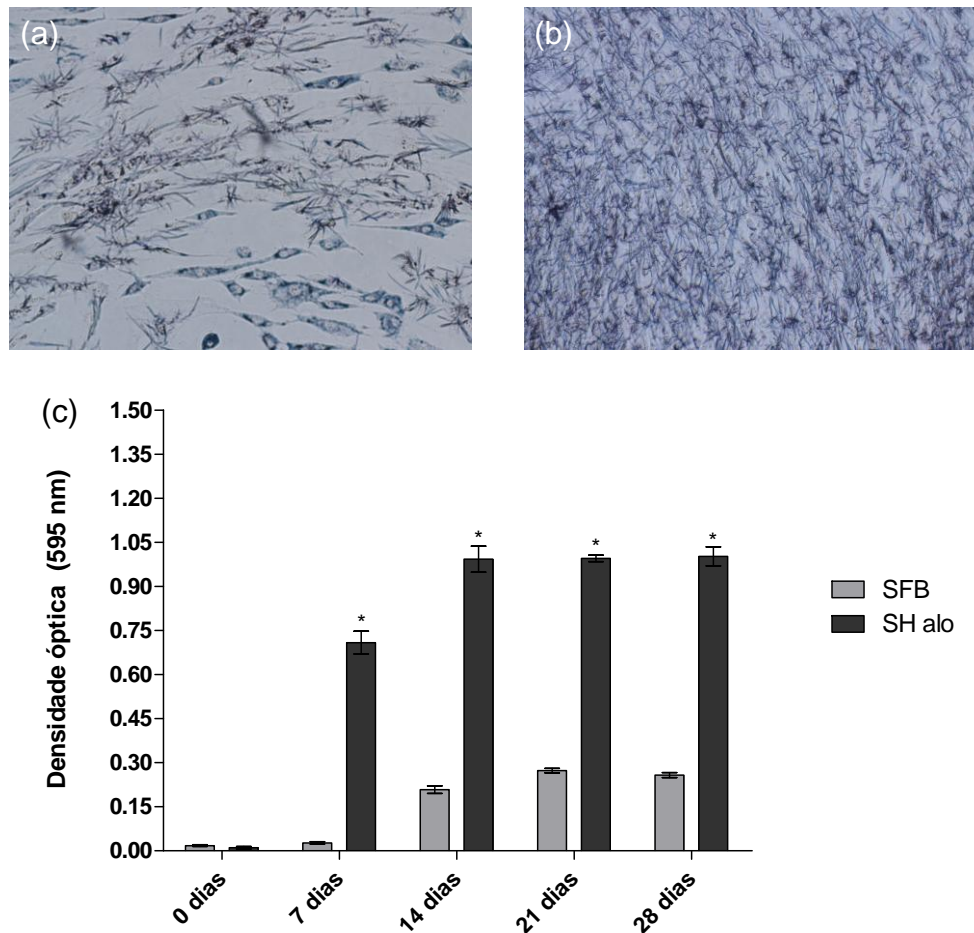


Figura 13. Viabilidade e proliferação das hASC, avaliados pelo ensaio de MTT. Visualização de cristais de formazan produzidos pelas hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com (a) SFB e (b) SH alo; M. O., aumento real de 25x. (c) Representação gráfica da proliferação celular das culturas em ambos os meios de cultura; n= 3; *P<0,05 quando comparado hASC cultivadas em meio suplementado com SFB e as cultivadas em meio suplementado com SH alo (ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*).

4.3.4. Atividade da fosfatase alcalina

Neste ensaio de BCIP-NBT, baseado em uma reação cromogênica, o precipitado púrpura formado quando a enzima fosfatase alcalina cliva o grupamento fosfato presente no BCIP, produzindo um próton que reduz o NBT (item 3.5.4), foi observado, por M. O., nas hASC cultivadas nos 2 meios de cultura basal (Fig. 14a-b).

A densidade óptica obtida foi maior nas culturas em meio de cultura basal suplementado com SH alo em relação às culturas em meio de cultura basal suplementado com SFB, não variando o nível ao longo dos tempos avaliados (Fig. 14c).

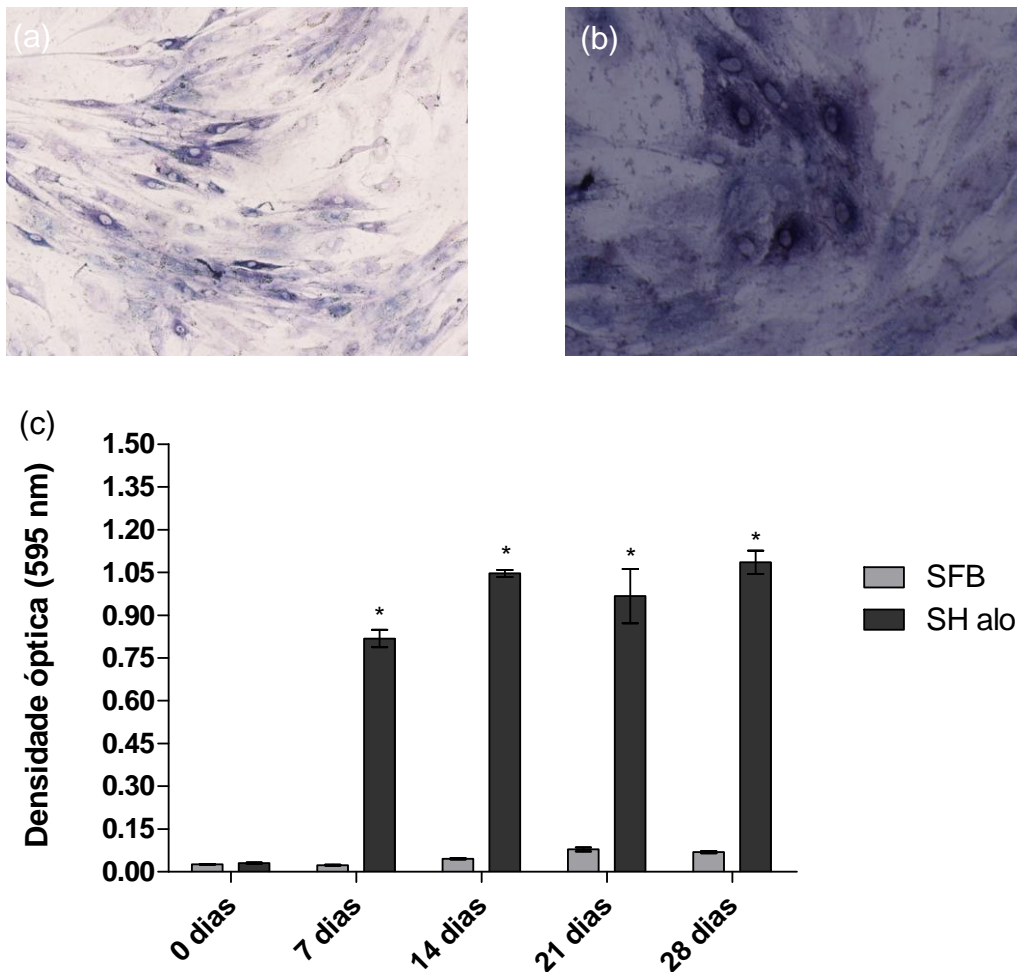


Figura 14. Atividade da fosfatase alcalina das hASC, nas 2 culturas. Visualização do precipitado púrpura produzido pelas hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com (a) SFB (M. O., aumento real de 25x) e (b) SH alo (M. O., aumento real de 50x). (c) Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina em ambas as culturas; $n= 3$; $*P<0,05$ quando comparado hASC cultivadas em meio suplementado com SFB e as cultivadas em meio suplementado com SH alo (ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*).

4.5. Diferenciação osteogênica das hASC

As hASC foram induzidas a diferenciação osteogênica pelo cultivo com o meio de cultura para diferenciação osteogênica, por até 28 dias (item 3.6). A diferenciação osteogênica das hASC foi confirmada pelos resultados dos seguintes ensaios: teste de proliferação celular (item 4.5.1), quantificação da atividade da fosfatase alcalina (item 4.5.2), dosagem de colágeno pela coloração de *Sirius Red* (item 4.5.3), detecção de mineralização pela coloração de *von Kossa* (item 4.5.4) e avaliação da expressão de proteínas de matriz óssea por imunofluorescência (item 4.5.5) demonstrados a seguir.

4.5.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica

A proliferação celular durante a diferenciação osteogênica foi avaliada até 28 dias de indução, pelo ensaio de MTT (item 3.6.1).

Pôde-se observar que as hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo sofreram uma proliferação inicial acelerada em comparação ao seu controle e a partir do 14^o dia de indução, a proliferação diminuiu. Já as hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SFB apresentaram uma proliferação maior em relação ao controle, em todos os tempos; também sendo, essa proliferação, menor quando comparada as hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo até o 14^o dia de indução e proliferando mais que estas aos 28 dias de indução (Fig. 15).

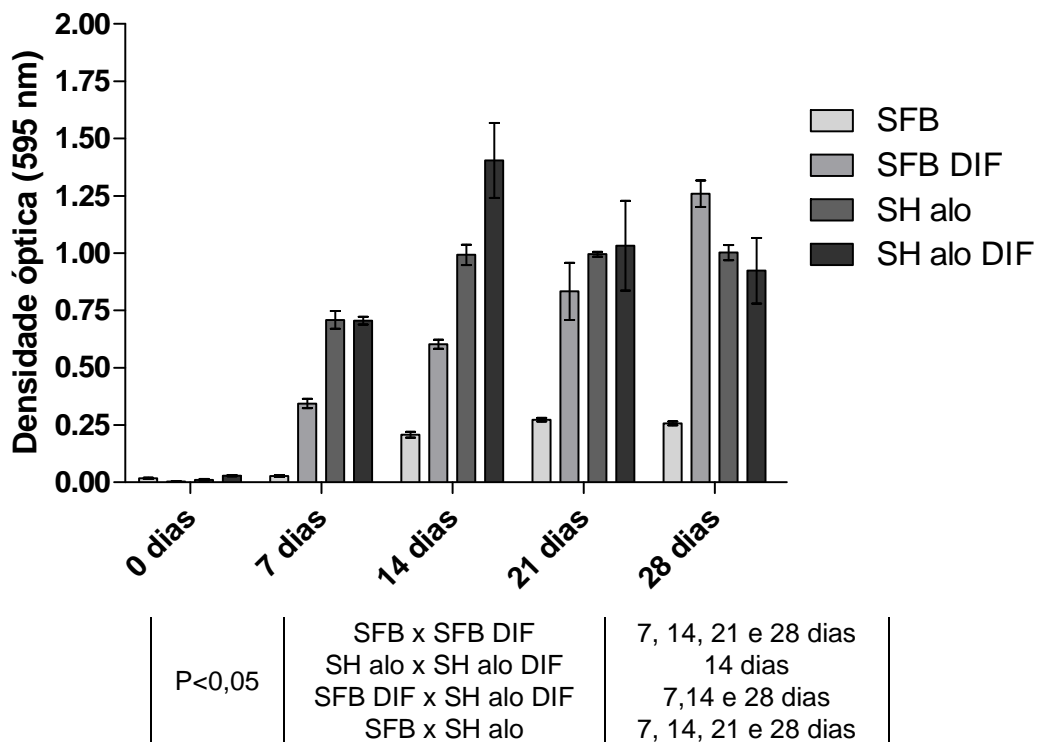


Figura 15. Representação gráfica da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica, avaliada pelo ensaio de MTT. n= 3; Análise estatística por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*.

4.5.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica

A atividade da fosfatase alcalina durante a diferenciação osteogênica foi avaliada até o 28º dia de indução, pelo ensaio de BCIP-NBT (item 3.6.2).

Pôde-se observar que as hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo apresentaram nível de atividade da fosfatase alcalina elevado desde o 7º dia de indução, no entanto não houve diferença significativa em relação ao seu controle, que também apresentou nível elevado de atividade de fosfatase alcalina (Fig. 16). Enquanto as culturas de hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SFB apresentaram um aumento no nível da atividade de fosfatase alcalina ao longo dos tempos avaliados quando comparado ao seu grupo controle. Estas células apresentaram um nível de atividade da fosfatase alcalina significativo aos 21 dias de indução, que alcançou os níveis de atividade das culturas cultivadas em meio suplementado com SH alo (na presença ou ausência de fatores indutores) (Fig. 16).

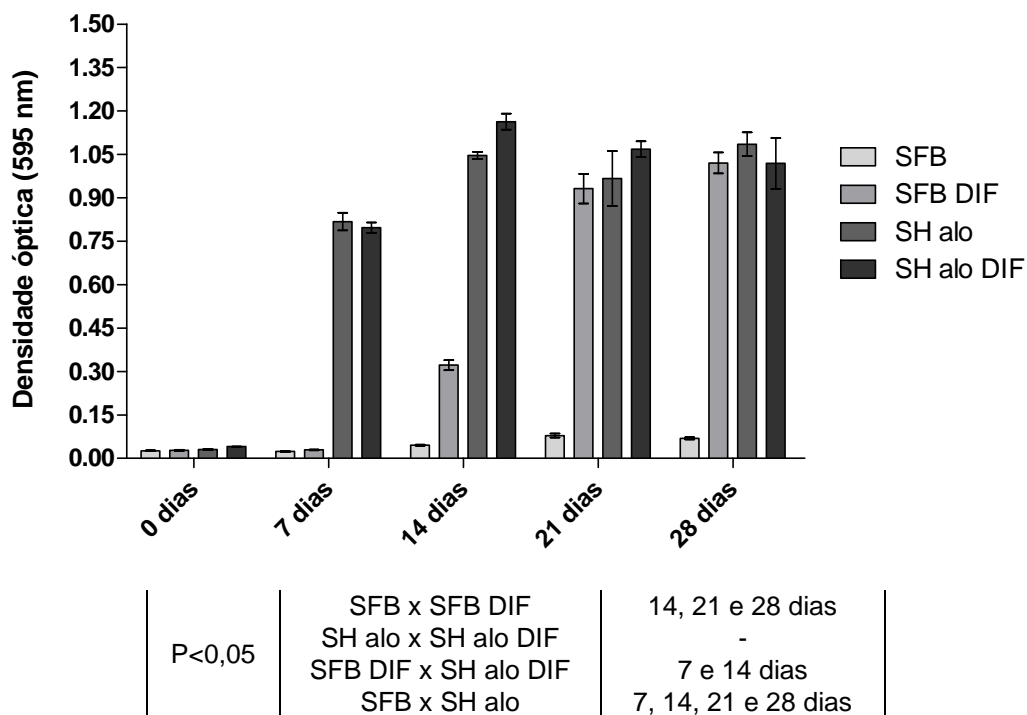
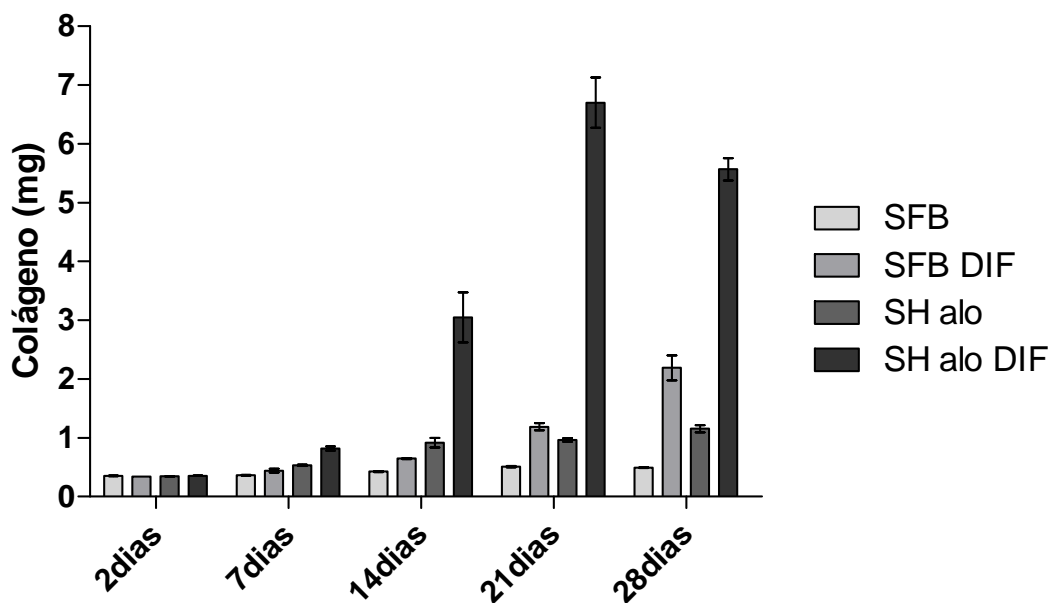


Figura 16. Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica, avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT. n= 3; análise estatística por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*.

4.5.3. Avaliação da síntese de colágeno durante a indução da diferenciação osteogênica

A quantificação da síntese de colágeno pelas células durante a indução da diferenciação osteogênica foi realizada através do ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* (item 3.6.3).

Pôde-se observar que as hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo apresentaram uma síntese de colágeno superior a ao seu grupo controle. Esta síntese também foi maior em relação à síntese de colágeno pelas células cultivadas em meio osteogênico suplementado com SFB a partir do 14º dia de indução. Enquanto as culturas de hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SFB apresentaram síntese de colágeno significativamente superior ao controle a partir do 21º dia de indução (Fig. 17).



P<0,05	SFB x SFB DIF	21 e 28 dias
	SH alo x SH alo DIF x SFB DIF	14, 21 e 28 dias
	SFB x SH alo	28 dias

Figura 17. Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizado durante a indução da diferenciação osteogênica, avaliada pela coloração pelo *Sirius Red*. n= 3; Análise estatística por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*.

4.5.4. Avaliação da mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica

A mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica foi avaliada pela coloração pelo método de *von Kossa* (item 3.6.4).

A presença de mineralização, representada por coloração negra ou marron, não foi observada nos grupos controles (Fig. 18a, e). Já as hASC cultivada em meio osteogênico suplementado com SFB a mineralização foi observada somente a partir do 28º dia de indução (Fig. 18b-d). Enquanto as células, cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo, a mineralização foi observada a partir do 14º dia de indução (Fig. 18 f-h).

4.5.5. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação

As hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo, passaram a expressar marcadores de osteoblastos (Fig. 19 e 20) demonstrado pelo ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpos específicos para osteopontina e osteocalcina (item 3.6.5)

As hASC cultivadas na ausência de fatores indutores apresentaram uma marcação discreta para osteopontina (Fig. 19a) enquanto nenhuma marcação para osteocalcina foi observada (Fig. 20a). Já as células, cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo, passaram a expressar uma marcação significativa para osteopontina (Fig. 19b-c) e osteocalcina (Fig. 20b-c) a partir do 21º dia de indução.

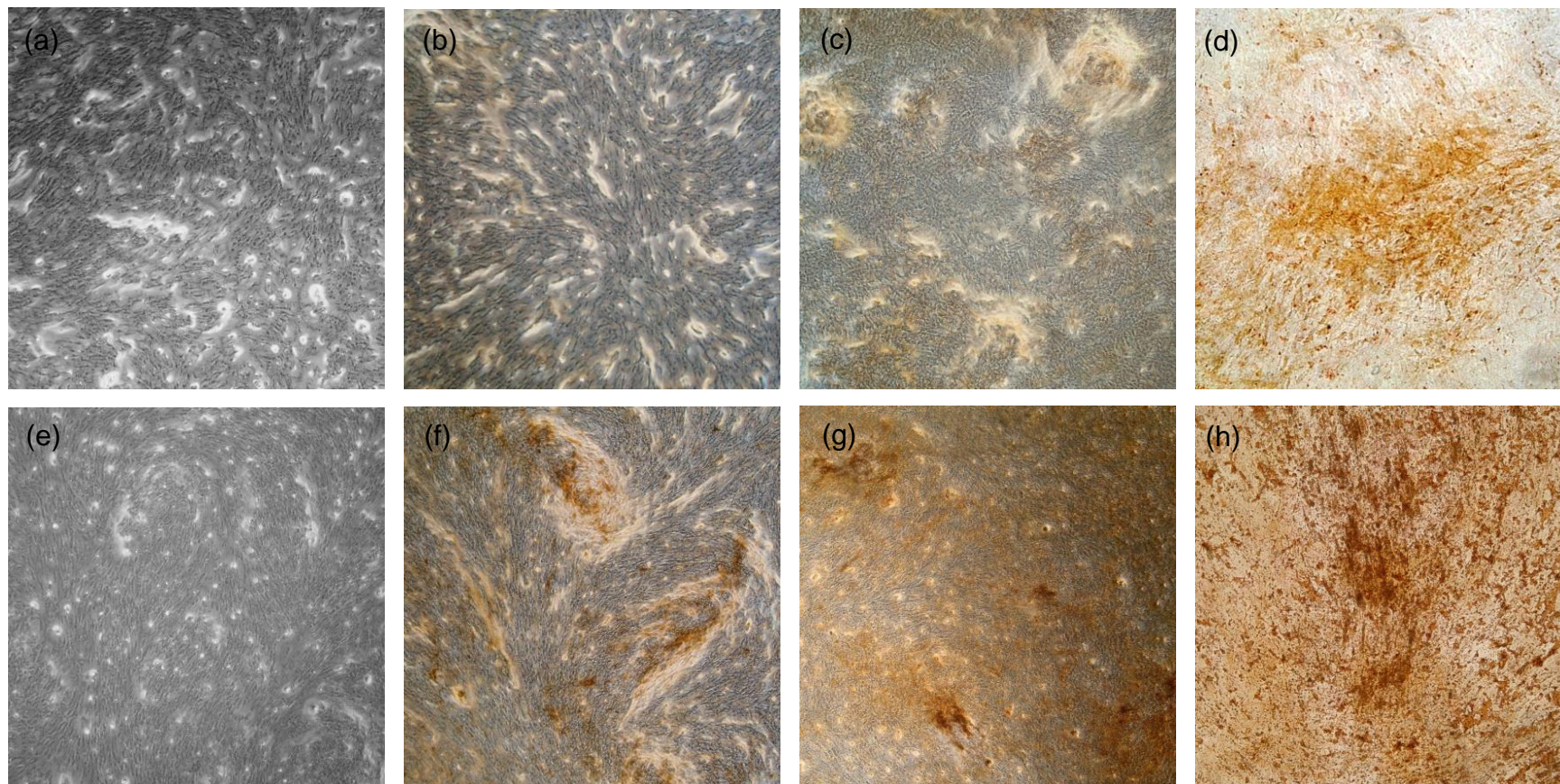


Figura 18. Coloração de *von Kossa* para confirmar a mineralização (coloração marrom). Cultura de células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com (a) com SFB e (e) com SH alo (controles); cultura de células cultivadas em meio osteogênico suplementado com SFB por (b) 14 dias de indução, (c) por 28 dias e culturas de células cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo por (f) 14 dias de indução e (g) 28 dias; M. O., aumento real de 10x. Culturas de células cultivadas em meio osteogênico suplementado com (d) SFB e (h) SH alo, M. O., aumento real de 25x; n= 3.

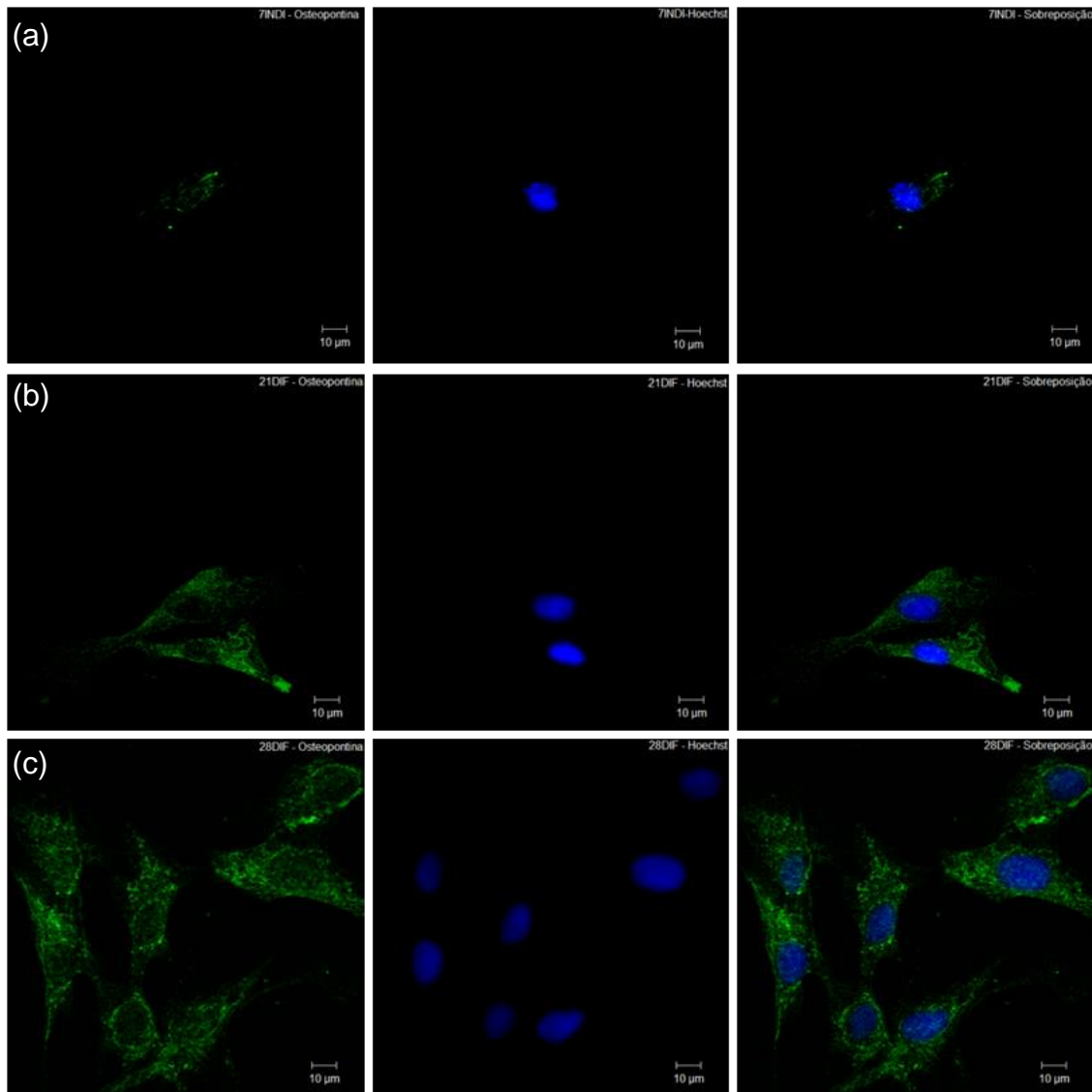


Figura 19. Marcação para osteopontina (coloração verde) em hASC cultivadas em (a) meio de cultura basal suplementado com SH alo e em meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo por (b) 21 dias e (c) 28 dias. A coloração azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal.

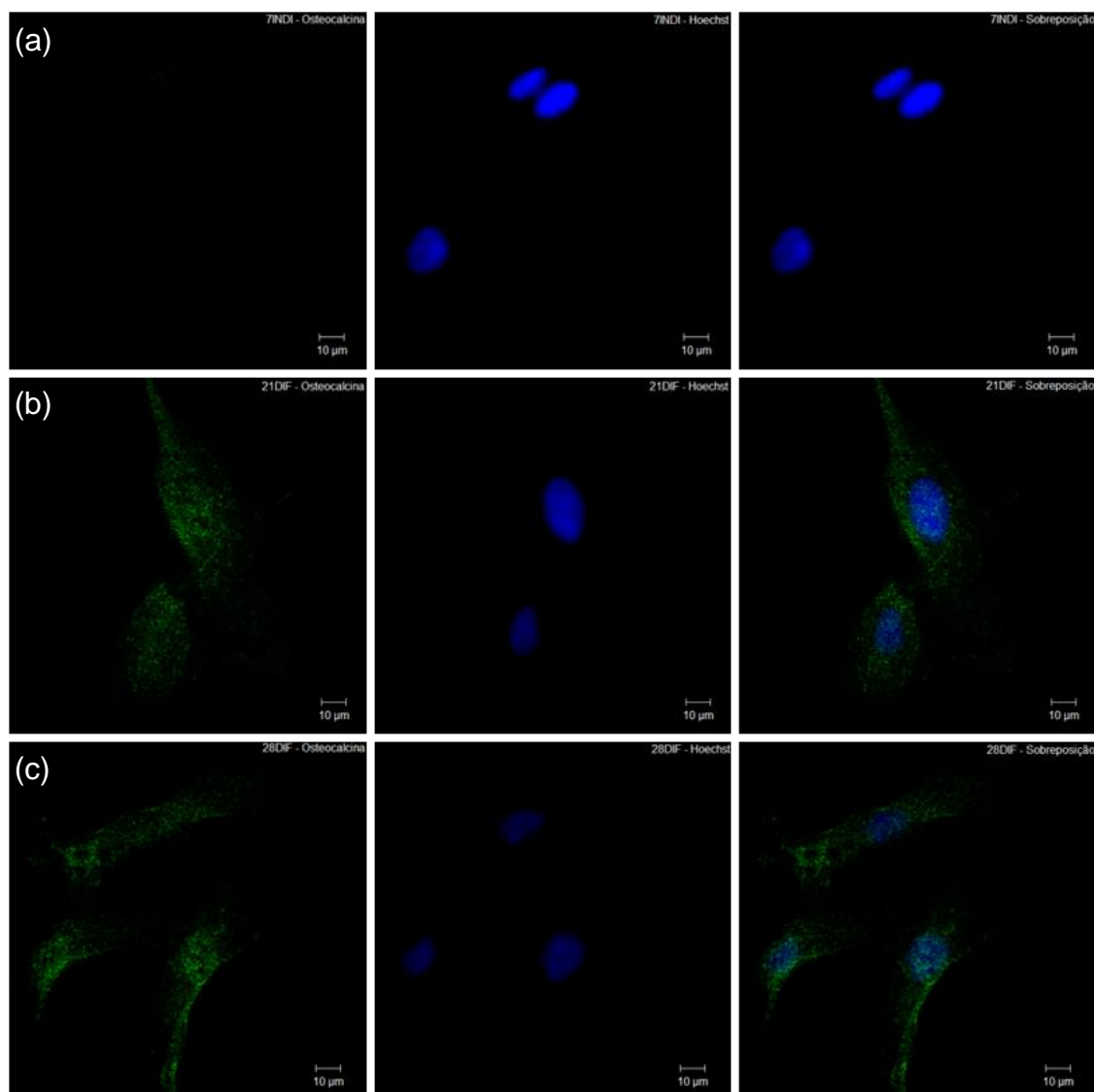


Figura 20. Marcação para osteocalcina (coloração verde) em hASC cultivadas em (a) meio de cultura basal suplementado com SH alo e em meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo por (b) 21 dias e (c) 28 dias. A coloração azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal.

4.6. Estudos sobre a colonização das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASC

4.6.1. Avaliação da colonização *in vitro* das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASC

As hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo foram capazes de colonizar e penetrar no interior das matrizes tridimensionais

de PHB-HV, como observado pela MEV das matrizes inteiras e fraturadas (item 3.7.1). As imagens obtidas revelaram uma alta densidade celular (Fig. 21).

As células, em geral, apresentavam-se achatadas, com emissão de prolongamentos citoplasmático, aderidas a superfície homogênea da matriz ou no interior de poros (Fig. 22a-f). Em algumas células havia a presença de muitas vesículas na superfície da membrana celular (Fig. 22g).

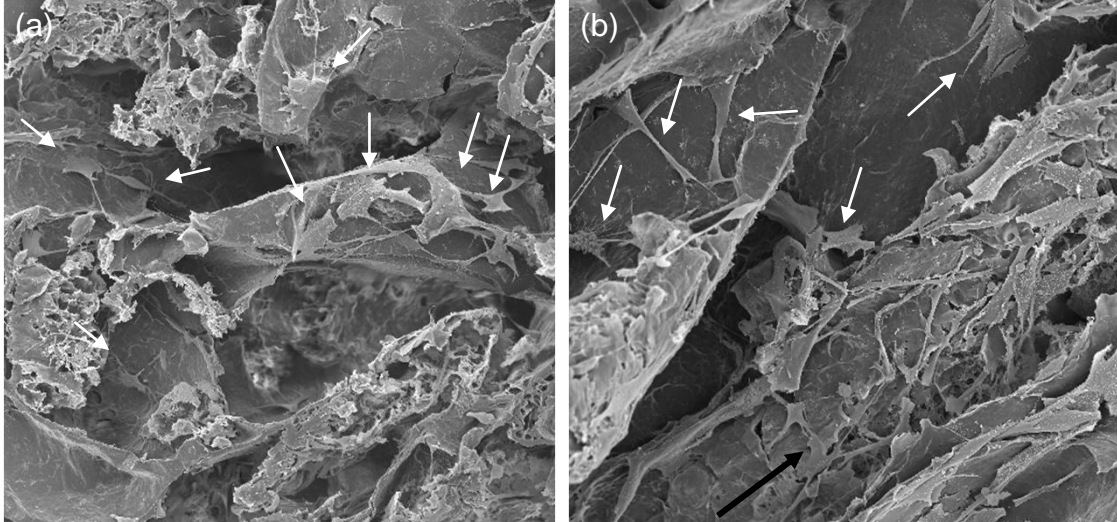
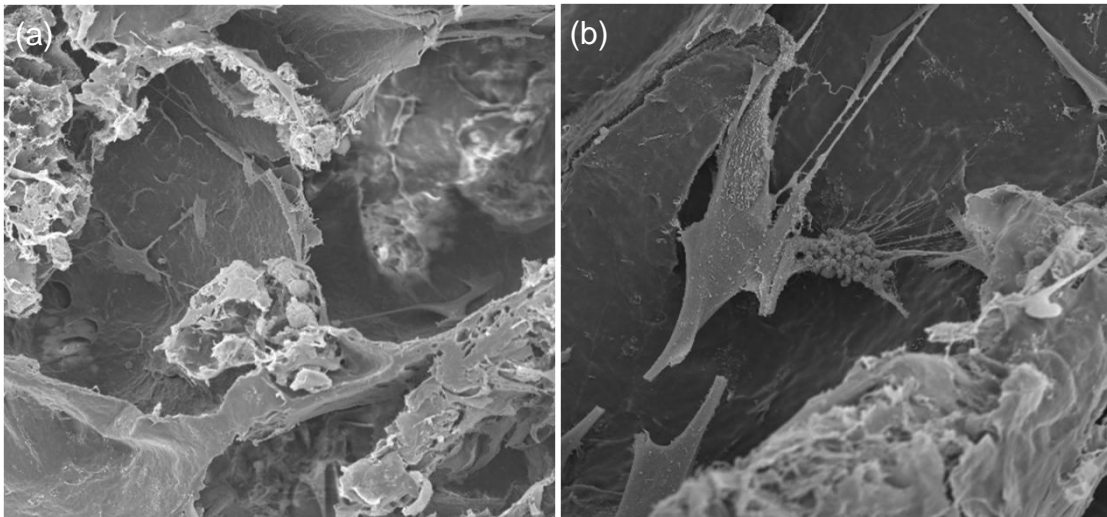


Figura 21. Imagens da MEV das matrizes de PHB-HV colonizadas pelas hASC. Visão panorâmica do interior das matrizes, com predomínio de células achatadas. (a) Aumento: 100x. (b) Aumento: 200x. Setas brancas indicam algumas hASC e a seta preta indica uma região com alta densidade celular.



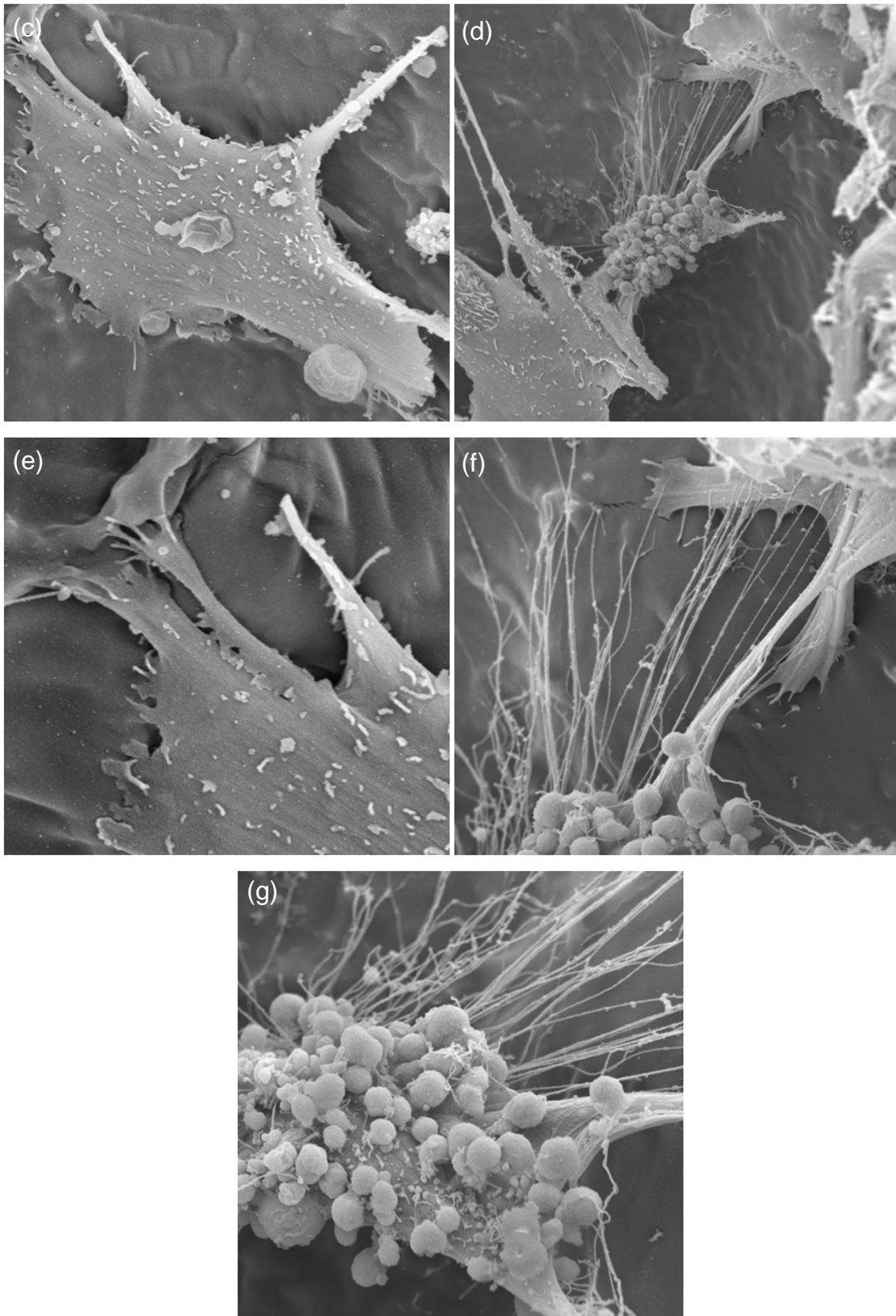


Figura 22. Imagens da MEV das matrizes de PHB-HV colonizadas pelas hASC, mostrando células aderidas a superfície. (a) Aumento: 200x. (b) Aumento: 500x. (c) Aumento: 2000x e (d) Aumento: 1000x. (e) A adesão celular a superfície pela emissão de prolongamentos citoplasmáticos; aumento: 4000x e (f) interconexão com outras células através dos prolongamentos; aumento: 2500x. (g) Inúmeras vesículas aderidas à superfície da membrana celular; aumento: 3000x.

4.6.2. Viabilidade e proliferação das hASC em matrizes tridimensionais de PHB-HV

Para verificar se o biomaterial PHB-HV estava influenciando na viabilidade e proliferação celular, foi realizado o ensaio de metabolização do MTT (item 3.7.2).

Observou-se que aumentou a proliferação das células semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV até o 28º dia de cultivo (Fig. 23).

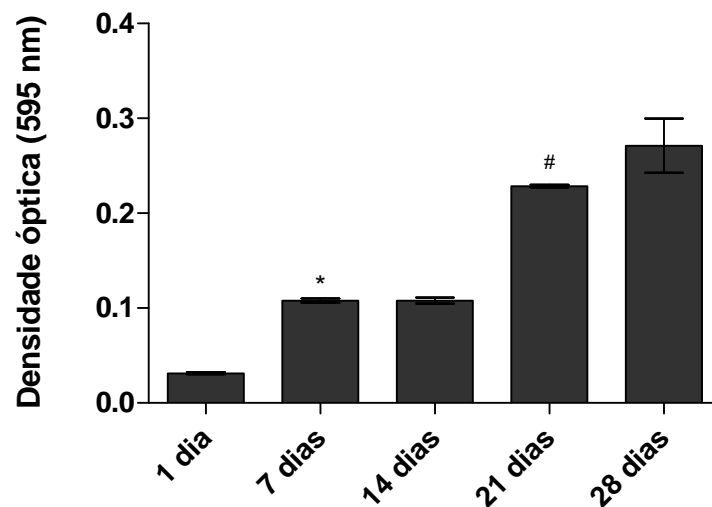


Figura 23. Representação gráfica da proliferação das hASC semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura basal suplementado com SH alo, avaliada pelo ensaio de MTT. n= 3; *P<0,05 comparando entre 1 e 7 dias e #P<0,05 comparando entre 14 e 21 dias. Análise estatística por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*.

4.7. Diferenciação osteogênica das hASC associadas as matrizes tridimensionais de PHB-HV

A diferenciação osteogênica das hASC semeadas sobre matrizes tridimensionais de PHB-HV cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo (item 3.8) foi evidenciada pelos resultados dos seguintes ensaios: avaliação da proliferação celular (item 4.7.1), quantificação da atividade da fosfatase alcalina (item 4.7.2) e avaliação da expressão de proteínas de matriz óssea por imunofluorescência (item 4.7.3) demonstrados a seguir.

4.7.1. Avaliação da proliferação celular durante a indução da diferenciação osteogênica

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (item 3.8.1).

Pôde-se observar que as hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo apresentaram uma proliferação inicial significativa, até o 14^o dia de indução, inclusive sendo superior a proliferação das hASC quando cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo nesses primeiros 14 dias. Depois desse tempo, o crescimento das hASC cultivadas em meio osteogênico se estabilizou (Fig. 24).

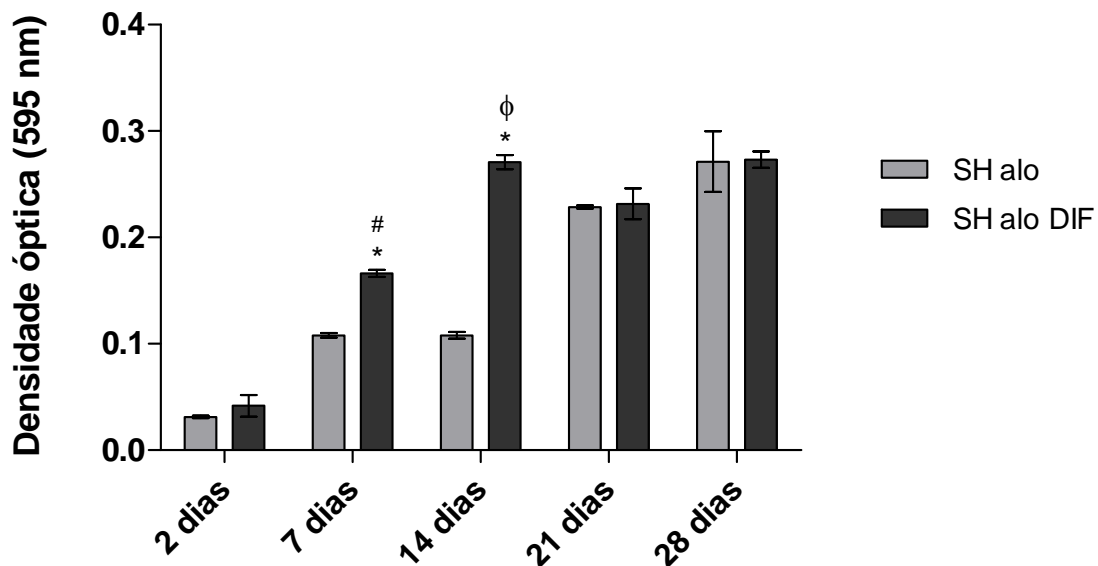


Figura 24. Representação gráfica da proliferação das hASC semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo, avaliada pelo ensaio de MTT. $n=3$; $*P<0,05$ comparando hASC em meio de cultura basal suplementado com SH alo e meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo (ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*). $^{\#}P<0,05$ quando comparado a proliferação de hASC em meio SH alo DIF entre 2 e 7 dias e $^{\phi}P<0,05$ entre 7 e 14 dias (ANOVA *one-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*).

4.7.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica

A atividade da fosfatase alcalina durante a diferenciação osteogênica foi avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT (item 3.8.2).

Pôde-se observar que as hASC em meio osteogênico suplementado com SH alo, apresentaram nível de atividade da fosfatase alcalina inferior ou

próximo ao do controle. No entanto aos 21 dias de indução apresentou um aumento significativo do nível de atividade da fosfatase alcalina nas culturas com meio osteogênico em relação ao controle, e diminuiu novamente aos 28 dias de indução (Fig. 25).

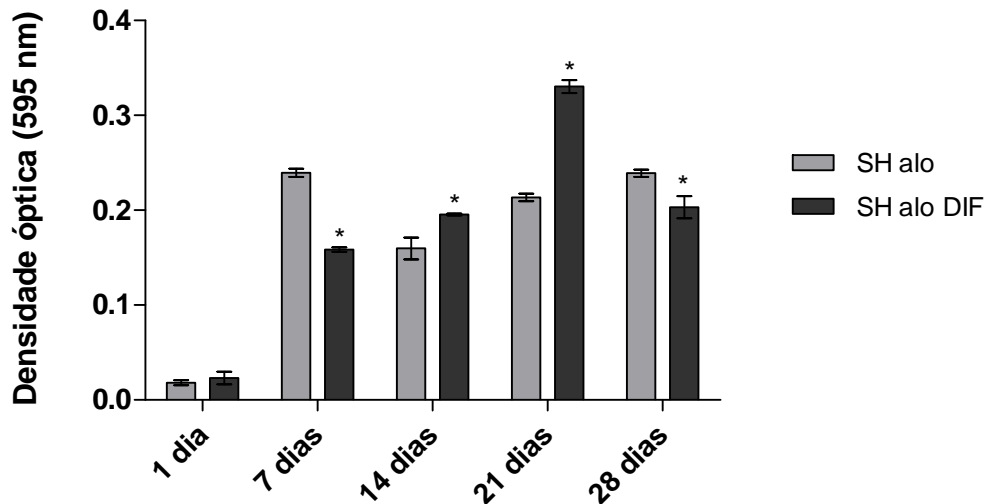


Figura 25. Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas hASCs semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo, avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT. $n = 3$; $*P < 0,05$ comparando hASC em meio de cultura basal suplementado com SH alo e meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo. Análise estatística por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni*.

4.7.3. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação

As secções, obtidas em todos os tempos avaliados durante a indução da diferenciação, foram avaliadas quanto a expressão de marcadores de osteoblastos, por imunofluorescência (item 3.8.3.2)

A marcação inespecífica obtida no controle negativo foi utilizada para ajustar os parâmetros de aquisição das imagens (Fig. 26a, 27a e 28a). E dessa forma, pôde-se observar que as secções das matrizes colonizadas por hASCs cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo, apresentaram alguma marcação para osteopontina (Fig. 26b-d), colágeno tipo I (Fig. 27b-d) e osteocalcina (Fig. 28b-d) a partir do 14º dia de indução. Através das imagens de luz transmitida, foi possível observar a arquitetura das matrizes tridimensionais empregadas. Nota-se também que há marcação das proteínas

em questão, em algumas secções, no arcabouço da matriz tridimensional próximo aos núcleos das células.

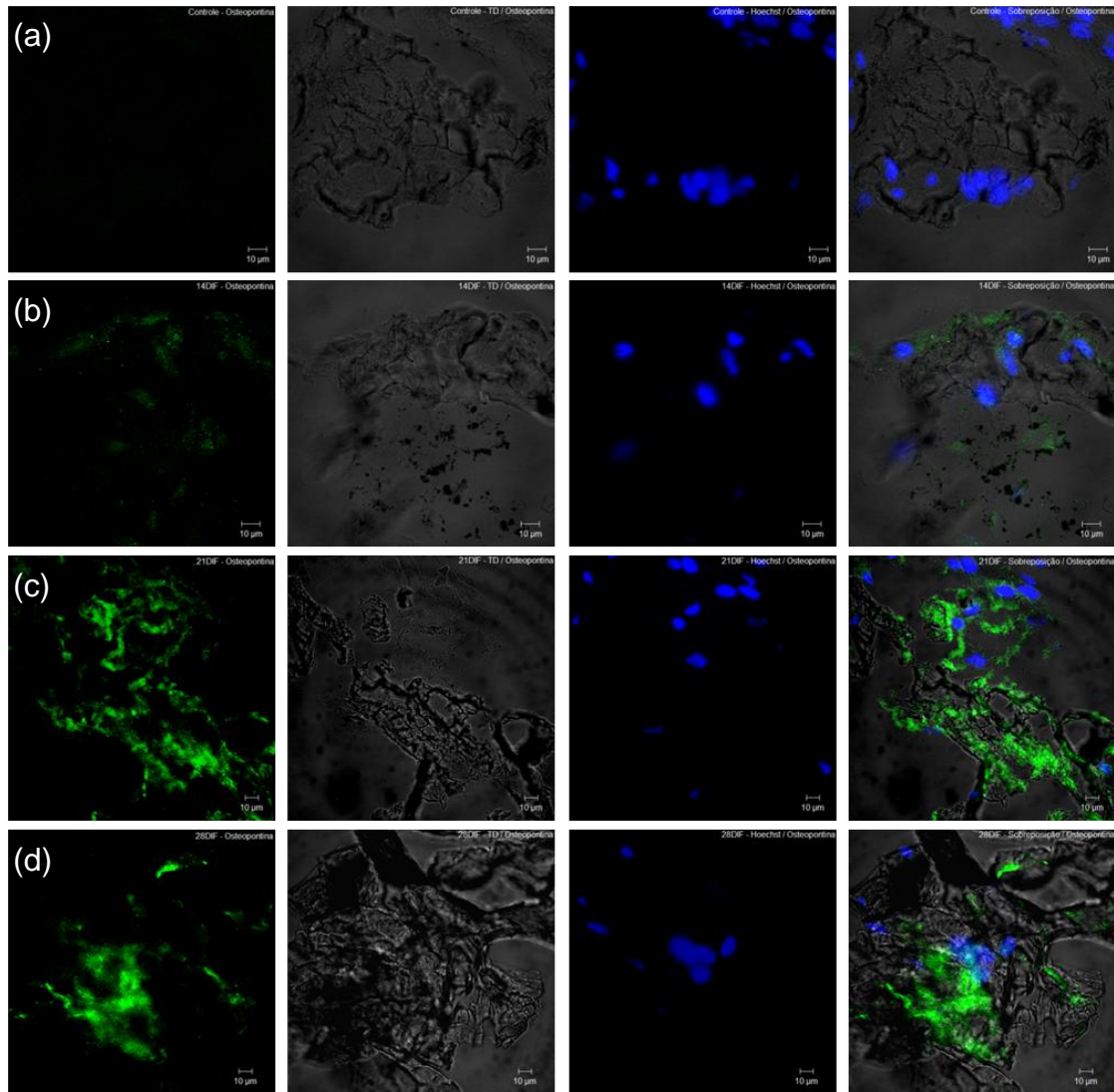


Figura 26. Marcação para osteopontina (coloração verde) em secções de hASC cultivadas em matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo. (a) Controle negativo – marcação somente com anticorpo secundário; marcação para osteopontina em matrizes sob indução da diferenciação por (b) 14 dias, (c) 21 dias e (d) 28 dias. A coloração azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal.

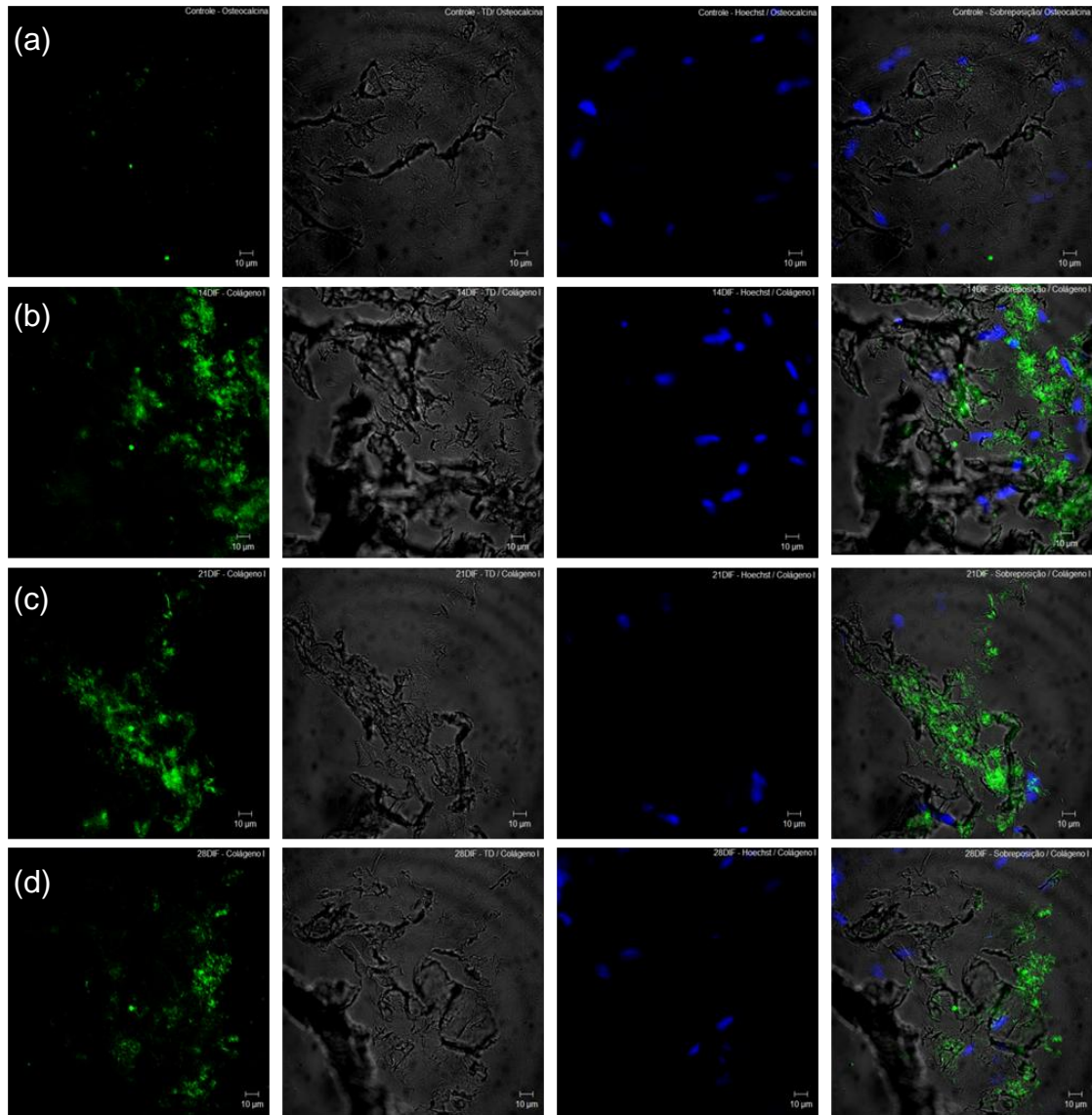


Figura 27. Marcação para colágeno tipo I (coloração verde) em secções de hASC cultivadas em matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo. (a) Controle negativo – marcação somente com anticorpo secundário; marcação para colágeno tipo I em matrizes sob indução da diferenciação por (b) 14 dias, (c) 21 dias e (d) 28 dias. A coloração azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal.

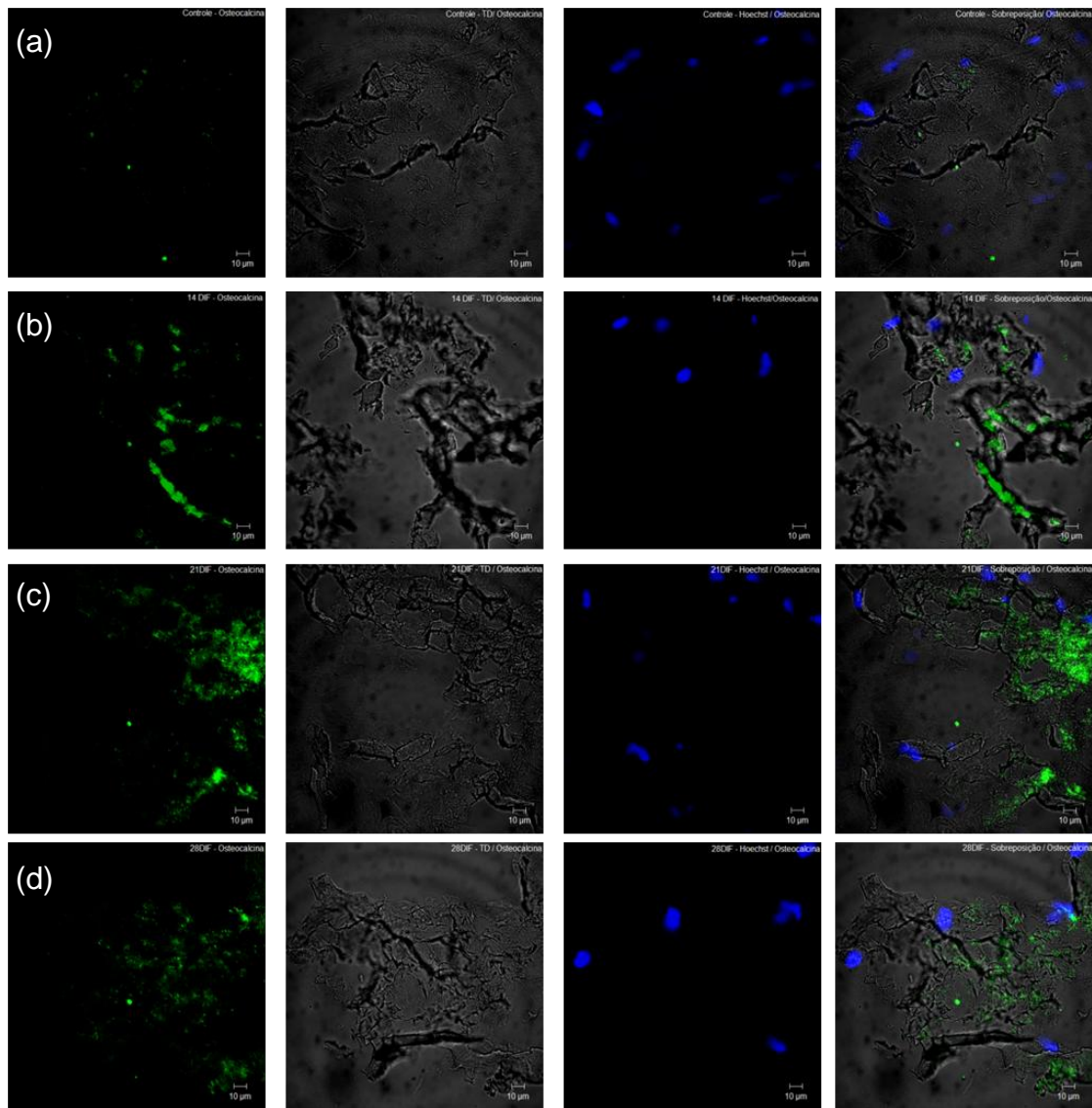


Figura 28. Marcação para osteocalcina (coloração verde) em secções de hASC cultivadas em matriz tridimensional de PHB-HV em meio de cultura osteogênico suplementado com SH alo. (a) Controle negativo – marcação somente com anticorpo secundário; marcação para osteocalcina em matrizes sob indução da diferenciação por (b) 14 dias, (c) 21 dias e (d) 28 dias. A coloração azul marca os núcleos celulares. Imagens obtidas em microscópio confocal.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, a engenharia de tecidos é uma estratégia promissora no campo da medicina regenerativa óssea (Dimitriou *et al.*, 2011). Contudo ainda enfrenta alguns desafios como, encontrar a fonte de células mais adequada (Seong *et al.*, 2010), condições ótimas de cultura (Mannello & Tonti, 2007) e desenvolver matrizes estruturais com características ideais (Seong *et al.*, 2010; Dimitriou *et al.*, 2011).

O PHB-HV surge como uma geração de polímeros com ampla aplicação na área médica por ser natural, biocompatível, biodegradável, termoplástico e apresentar propriedades mecânicas adequadas (Köse *et al.*, 2003). Dessa forma, este polímero foi escolhido para o desenvolvimento das matrizes em estudo.

Através da técnica de *freeze-drying*, foram obtidas matrizes estruturais de PHB-HV com poros apresentando tamanho médio de $163.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, o que permite a adesão celular e o contato célula-célula. Além disso, uma alta porosidade ($88.1 \pm 0.3\%$) e interconectividade entre os poros, o que favorecem o crescimento e penetração celular pela estrutura interna da matriz, vascularização e difusão de nutrientes e metabólitos. A microporosidade observada pode ser favorável para formação de capilares. Em relação as suas propriedades mecânicas, as matrizes obtidas são estruturas anisotrópicas, apresentando módulo de compressão transversal maior que o longitudinal, o que é interessante considerando que o osso apresenta esse mesmo tipo de propriedade. Dessa forma as propriedades das matrizes estão de acordo com o idealizado para o sucesso na regeneração óssea (Salgado *et al.*, 2004).

As matrizes desenvolvidas são constituídas somente por carbono, oxigênio e provavelmente hidrogênio (que não pode ser detectado pela sonda), confirmando a sua composição, típica de poliésteres, e que não estavam contaminadas por nenhum outro elemento químico.

Optou-se por utilizar as hASC por apresentarem várias vantagens para o emprego na engenharia de tecidos, como: (i) podem ser uma fonte autóloga de células; (ii) são coletadas por procedimento pouco invasivo, a partir do produto da cirurgia de lipoaspiração, técnica menos invasiva que a punção da medula óssea (esta pode acarretar em desconforto e morbidade do sítio doador); (iii)

estão disponíveis em grande quantidade, podendo ser isoladas do tecido adiposo e expandidas rapidamente; (iv) são capazes de diferenciar em múltiplas linhagens, inclusive em linhagem osteogênica e (v) não estão envolvidas em questões éticas (Gimble *et al.*, 2007; Mizuno, 2009; Lindroos *et al.*, 2011).

Propomos a utilização do SH alo como suplemento para o meio de cultura em substituição ao SFB na tentativa de evitar possíveis reações imunológicas decorrentes da exposição das células a proteínas animais e a transmissão de microorganismos patogênicos (Mannello & Tonti, 2007). E ainda por ser preconizado pelas BPM como uma das formas para utilização terapêutica segura das hASC (Lindroos *et al.*, 2011). O suplemento empregado então, baseia-se em um *pool* de soro de origem distinta das hASC.

O emprego desse suplemento justifica-se, uma vez que a expressão dos antígenos do sistema ABO e alguns outros antígenos de superfície baseados em proteínas e carboidratos não são detectáveis em MSC, permitindo a substituição do SFB por soro de qualquer grupo sanguíneo e evitando a rejeição no transplante dessas células (Schäfer *et al.*, 2011). A substituição por soro humano e outros derivados sanguíneos tem sido evidenciado por alguns estudos, já em andamento, (Shahdadfar *et al.*, 2005; Kocaoemer *et al.*, 2007; Bieback *et al.*, 2009; Lindroos *et al.*, 2010).

As hASC isoladas, a partir da fração vascular estromal resultante do processamento de lipoaspirados, cultivadas em 2 tipos de meio de cultura: um suplementado com SFB e outro com SH alo, demonstrou resultados satisfatórios. As células apresentaram formato tipo fibroblastóide e aderentes a superfície plástica, corroborando com os dados de Zuk *et al.*, 2001.

As diferenças morfológicas como: menor tamanho, menos grânulos citoplasmáticos, menor aderência a superfície plástica, tendência a se aglomerar ao confluírem e culturas mais densas, foram observadas nas culturas de hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo, assim como descrito para as hASC cultivadas em meio suplementado com soro humano AB e plasma rico em plaquetas – trombina ativadas (Kocaoemer *et al.*, 2007), que então corrobora o resultado deste trabalho.

A menor aderência a superfície plástica foi observada também em culturas de BMSC, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com

soro autólogo humano, quando comparadas as BMSC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB. E uma análise da expressão gênica dessas BMSC indicaram que a maior aderência pode estar relacionada a uma super expressão genes de colágeno nas células quando o suplemento utilizado é o SFB e não o soro humano (Shahdadfar *et al.*, 2005).

Além da caracterização morfológica, foi estabelecida uma caracterização fenotípica para identificar a população de células-tronco através da combinação da expressão de marcadores de superfície. As populações de células estudada em cada tipo de cultura (meio suplementado com SFB ou com SH alo) foram definidas pelo gráfico de tamanho *versus* granulosidade, que confirmou a aparência visual menor e menos granulosa das hASC cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo comparadas as hASC cultivadas em meio suplementado com SFB.

As hASC constituíram, *in vitro*, uma população homogênea de células que expressaram os marcadores de superfície CD29, CD44, CD73 e o HLA-ABC e não expressaram CD34, CD45 e HLA-DR, não havendo interferência do tipo de suplemento utilizado no meio de cultura na expressão dos marcadores. Fenotipicamente as hASC isoladas estão de acordo com o perfil proposto por Zuk *et al.*, 2001 e Wagner *et al.*, 2005 e aceito pela Sociedade Internacional de Terapia Celular.

As hASC caracterizadas, foram avaliadas quanto a sua capacidade de expansão, uma vez que as culturas em meio de cultura basal suplementado com SH alo, apresentavam-se sempre mais densas. O tempo de duplicação observado para as células cultivadas em meio com SFB foi cerca de 4 vezes maior que o tempo de duplicação das células cultivadas em meio com SH alo. Apesar da expansão acumulada das hASC cultivadas em meio com SH alo ser significativamente maior, as hASC cultivadas em meio com SFB apresentaram uma expansão contínua.

Além disso, as células em meio com SFB a partir da 8ª passagem apresentaram um crescimento mais lento. Shahdadfar *et al.*, 2005 em seu estudo de expressão gênica em BMSC (utilizando SBF como suplemento para o meio de cultura celular) observou que os genes associados a proteínas cruciais para a progressão do ciclo celular estavam sendo fortemente *down* regulados na 10ª passagem em relação a 4ª, enquanto genes associados a

células especializadas estavam *up* regulados. Contrastando com a estável expressão gênica ao longo das passagens de BMSC quando cultivadas em meio suplementado com soro humano, sugerindo que a expansão nesse meio não apresenta risco de instabilidade do transcriptoma.

A cinética de proliferação das hASC foi mais acelerada quando o meio de cultura foi suplementado com SH alo parecendo haver um estímulo para proliferação (Kocaoemer *et al.*, 2007) e contrariando o estudo de Lindroos *et al.*, 2010 que só alcançou proliferação das hASC em níveis compatíveis em meios suplementados com 10% de SFB e 15% de soro humano.

A expansão observada nas culturas de hASC as tornam candidatas atrativas para emprego clínico, uma vez que a expansão *ex vivo* é necessária para obter um número suficiente de células requerido para o transplante. Otimizando essa expansão o número de células pode ser alcançado em menor tempo e então, a cinética acelerada da proliferação das hASC em meio de cultura suplementado com SH alo favorece ainda mais a utilização deste suplemento em substituição ao SFB.

As hASC cultivadas em meio de cultura basal, suplementado com os dois tipos de soro, foram capazes de metabolizar o MTT e produzir cristais de formazan e o aumento da densidade óptica, ao longo dos tempos de cultivo avaliados, indicam que o tipo de suplemento utilizado não interferiu na viabilidade dessas células. A maior densidade óptica observada quando o suplemento para o meio utilizado foi SH alo, pode ser devido ao maior número de células, corroborando com a maior proliferação observada para estas células neste meio.

A fosfatase alcalina é um dos marcadores de indiferenciação das células-tronco embrionárias e é descrita também para hASC (Riekstina *et al.*, 2009). Os diferentes tipos de soro empregados nos meios de cultura basal parecem não interferir na atividade da enzima. Mas assim como foi observado no ensaio de MTT, os níveis da densidade óptica foram superiores nas culturas cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH alo comparado com SFB. Esse perfil provavelmente se deve ao maior número de células quando se utiliza SH alo como suplemento e não que há maior atividade da enzima.

A indução da diferenciação osteogênica foi realizada através da adição de dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato ao meio de cultura basal

suplementado tanto com SFB quanto com SH alo por até 28 dias. A utilização desses fatores indutores na diferenciação osteogênica, utilizando células-tronco, já foi demonstrada na literatura (Halvorsen *et al.*, 2001; Girolamo *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Para caracterizar a diferenciação osteogênica vários ensaios foram realizados neste trabalho.

Sabe-se que as células-tronco possuem a capacidade intrínseca de auto-renovação, com alto potencial proliferativo que diminui gradualmente a medida que essas células se comprometem com uma linhagem celular (Mountford, 2008).

De fato, observou-se que as hASC induzidas a diferenciação por meio osteogênico suplementado com SH alo apresentaram uma proliferação inicial significativa e uma redução nessa a partir do 14^o dia de indução, enquanto as hASC cultivadas em meio de diferenciação suplementado com SFB apresentaram uma proliferação significativa até o 28^o dia.

O aumento do nível de atividade da fosfatase alcalina é considerado um marcador precoce da diferenciação osteogênica, amplamente empregado em outros trabalhos (Jaiswal *et al.*, 1997; Aubin, 2001). Nossos resultados obtidos com as hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SFB, indicam um aumento nessa atividade ao 21^o dia de indução alcançando os níveis apresentado pelas culturas em meio suplementado com SH alo e manutenção desse nível até o 28^o dia, de acordo com o esperado diante da indução. No entanto, o resultado da atividade da fosfatase alcalina obtido com as culturas cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo, considerado isoladamente, não foi conclusivo, uma vez que o nível da atividade de fosfatase alcalina foi elevado desde o 7^o dia de indução e equivalente ao obtido nas culturas sem indução. Mas relacionando o resultado da proliferação celular com a atividade da fosfatase alcalina, pode-se inferir que houve um aumento da atividade da fosfatase alcalina ao 21^o dia de indução, pois a partir de 14 dias de indução há um decréscimo na proliferação celular que deveria ser acompanhado pela diminuição enzimática, que não foi observado.

O SH alo utilizado como suplemento para o meio osteogênico no cultivo das hASC parece ter favorecido a síntese de colágeno pelas células em diferenciação, uma vez que a partir do 14^o dia de indução essa síntese foi superior a síntese de todos os outros grupos, inclusive quando comparado as

células em diferenciação sob estímulo do meio osteogênico suplementado com SFB. Embora a dosagem não tenha sido específica para o colágeno tipo I, sabe-se que este tipo de colágeno é um dos marcadores de osteoblastos mais rapidamente expressos em células comprometidas com a linhagem, sendo sua deposição como matriz extracelular um evento relativamente inicial na via de diferenciação de osteoblastos (Aubin, 2001).

Como pôde ser observado pelas imagens de coloração por *von kossa*, a mineralização ocorreu nas culturas cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo a partir do 14^o dia de indução, enquanto esta só foi observada nas hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SFB no 28^o dia de indução. A mineralização observada está de acordo com o perfil de síntese de colágeno apresentado pelas células, uma vez que o colágeno tipo I é essencial para a mineralização da matriz óssea (Salgado *et al.*, 2004).

A fim de verificar alteração fenotípica nas hASC cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo, foram realizados ensaios de imunofluorescência para marcadores específicos de osteoblastos: osteopontina e osteocalcina, proteínas não colagênicas, envolvidas no remodelamento ósseo. A expressão de osteopontina e osteocalcina foi comprovada a partir de 21^o dia de indução.

A osteopontina pode ser expressa em diversos tecidos, inclusive no osso onde é produzida por osteoblastos em diferentes estágios de maturação. Embora esta proteína secretada seja incorporada na matriz mineralizada, ela pode ser encontrada também em fluidos biológicos (soro, urina e fluido seminal). Durante a formação óssea, *in vitro*, ocorre uma produção inicial de osteopontina e esta encontra-se em níveis altos de expressão mesmo após a mineralização. A expressão de osteopontina intracelular em células osteogênicas, ainda em proliferação, parece estar relacionada a migração celular. Enquanto a osteopontina extracelular parece regular o processo de mineralização (Sodek *et al.*, 2000).

A osteocalcina, por sua vez, apresenta maior expressão somente na fase após a proliferação, concomitante com a mineralização da matriz extracelular. Sendo sua expressão tardia no desenvolvimento de osteoblastos e contribuindo para a regulação da fase mineral do osso (Lian & Stein, 1992). Recentemente, foi demonstrado que antes da sua deposição na matriz

extracelular, a osteocalcina pode ser secretada e, assim quantificada no meio de cultura antes do estágio de mineralização, representando um bom marcador para predizer o potencial osteogênico das células (Nakamura *et al.*, 2009).

As células em diferenciação óssea passam por três fases fenotípicas distintas, iniciando com uma proliferativa (na qual já existe síntese de colágeno tipo I), em seguida, formação da matriz extracelular (elevada atividade da fosfatase alcalina) e por fim, mineralização da matriz (maior expressão de osteopontina, osteocalcina e deposição de minerais) (Lian & Stein, 1992). Diante disso, os resultados obtidos demonstram que houve um comprometimento das hASC na diferenciação osteogênica quando cultivadas em meio osteogênico suplementado com SH alo, além de sugerir uma diferenciação mais proeminente quando comparado a utilização do SFB como suplemento para o meio de cultura.

Diversos estudos já comprovaram essa capacidade de diferenciação osteogênica das hASC cultivadas em meio suplementado com SFB (Halvorsen *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; Girolamo *et al.*, 2007). No entanto, ainda era contraditória a capacidade de diferenciação dessas células quando cultivadas na presença de soro humano. Os resultados obtidos nesse estudo foram semelhantes aos observados por Kocaoemer *et al.*, 2007 utilizando soro humano AB e plasma rico em plaquetas – trombina ativada como suplemento para o meio de cultura. Mas contrariam parcialmente um estudo de expressão gênica de hASC cultivadas em meio com soro humano que mostram genes centrais para a progressão do ciclo celular e genes da diferenciação celular *up* regulados e *down* regulados, respectivamente, quando comparado as hASC cultivadas em meio com SFB (Lindroos *et al.*, 2010).

Após a caracterização das hASC cultivadas em meios de cultura basal e osteogênico suplementados com SH alo, e observado seu potencial, essas células foram cultivadas nas matrizes tridimensionais de PHB-HV desenvolvidas.

Os resultados da MEV revelaram que as hASC foram capazes de aderir a superfície do material, estabelecer conexões entre elas, proliferar e penetrar até o interior das matrizes. Portanto o tamanho dos poros e sua interconectividade foram adequados, permitindo a colonização das matrizes.

Além disso, em algumas células foram observadas vesículas na superfície da membrana, que podem indicar a atividade de síntese e secreção protéica.

Para avaliar a citotoxicidade de um material, o ensaio de MTT é o mais aplicado (Onuki *et al.*, 2008). O perfil dos valores de densidade óptica, obtidos neste ensaio, demonstrou que as hASC, mesmo cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV, mantiveram sua viabilidade e proliferação. Portanto a matriz permitiu a proliferação celular ao longo dos tempos analisados, sem apresentar efeito citotóxico para esse tipo celular.

O perfil de proliferação das hASC semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV durante a indução da diferenciação osteogênica também foi avaliado. Demonstrando que as células sofreram uma proliferação inicial que estabilizou a partir do 14^o dia de indução, sugerindo o início da diferenciação.

Considerando o aumento da atividade da fosfatase alcalina, um marcador precoce das células em diferenciação osteogênica, o pico da atividade dessa enzima no 21^o dia de indução das hASC semeadas sobre a matriz tridimensional de PHB-HV e em meio osteogênico suplementado com SH alo, corrobora com o ensaio de proliferação, indicando um fenótipo osteogênico inicial apresentado por essas células.

Conforme foi observado para as hASC cultivadas em placa de cultura celular, quando induzidas a diferenciação osteogênica, suplementando o meio osteogênico com SH alo, as hASC cultivadas na matriz de PHB-HV também foram capazes de expressar osteopontina e osteocalcina, assim como colágeno tipo I. A alteração no fenótipo das células em diferenciação associadas à matriz tridimensional de PHB-HV foi evidenciada no ensaio de imunofluorescência para os marcadores específicos de osteoblastos citados, osteopontina, colágeno tipo I e osteocalcina. Hattori *et al.*, 2005 também observou intensa marcação para osteocalcina em matrizes de β -TCP associadas a hASC, pela técnica de imunohistoquímica, só que esta foi observada somente após 8 semanas de indução osteogênica, *in vitro*, enquanto a secreção de osteocalcina no meio de cultura foi detectada em 2 semanas de indução.

As imagens de imunofluorescência das secções revelam que a estrutura tridimensional forneceu o arcabouço necessário para adesão, proliferação e

penetração celular em partes internas da mesma. Assim como as fluorescências observadas indicam a expressão das proteínas secretadas por células comprometidas com a diferenciação osteogênica. Sendo descrita a maior expressão dessas proteínas em um estágio mais tardio desse processo (Lian & Stein, 1992).

Sendo assim, as hASC associadas a esta matriz tridimensional de PHB-HV cultivadas utilizando o meio osteogênico suplementado com SH alo, demonstra favorecer a osteogênese, o que implica na necessidade de outros estudos com este constructo no intuito de desenvolver uma alternativa aos tratamentos em uso para a regeneração óssea.

6. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que as matrizes tridimensionais de PHB-HV, desenvolvidas pela técnica de *freeze drying*, apresentaram uma estrutura adequada e não foram citotóxicas, favorecendo a sua colonização por hASC. Além disso, o meio de diferenciação osteogênico suplementado com SH alo foi eficiente para que as hASC adquirissem o fenótipo de células diferenciadas, inclusive na matriz estudada. Portanto, a combinação das estratégias utilizadas neste trabalho representa uma alternativa viável e segura para aplicação na engenharia de tecido ósseo.

7. PERSPECTIVAS

Pesquisar possíveis fatores associados à proliferação observada nas hASC cultivadas em meio suplementado com SH alo.

Avaliar a expressão gênica de marcadores ósseos nas hASC cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV e em meio osteogênico suplementado com SH alo.

Avaliar a capacidade de regeneração óssea promovida pela matriz de PHB-HV associada às hASC *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anghileri, E.; Marconi, S.; Pignatelli, A.; Cifelli, P.; Galié, M.; Sbarbati, S.; Krampera, M.; Belluzzi, O.; Bonetti, B. 2008. Neuronal Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, p. 909-916.

Aubin, J. E. 2001. Regulation of Osteoblast Formation and Function. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 2, p. 81-94.

Bernardo, M. E.; Avanzini, M. A.; Perotti, C.; Cometa A. M.; Moretta, A.; Lenta, E.; Del Fante, C.; Novara, F.; De Silvestri, A.; Amendola, G.; Zuffardi, O.; Maccario R.; Locatelli, F. 2007. Optimization of In Vitro Expansion of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Cell-Therapy Approaches: Further Insights in the Search for a Fetal Calf Serum Substitute. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, p. 121-130.

Bernardo, M. E.; Cometa, A. M.; Pagliara, D.; Vinti, L.; Rossi, F.; Cristantielli, R.; Palumbo, G.; Locatelli, F. 2011. Ex vivo Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 24, p. 73-81.

Bieback, K.; Hecker, A.; Kocaömer, A.; Lannert, H.; Schallmoser, K.; Strunk, D.; Klüter, H. 2009. Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow. **Stem Cells**, v. 27, p. 2331-2341.

Boeloni, J. N.; Ocarino, N. M.; Hell, R. C. R.; da Silva, G. R.; Goes, A. M.; Gomes, D. A.; Serakides, R. 2010. Preservação da Proteína Verde Fluorescente no Tecido Ósseo Descalcificado. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2146-2150.

Brunner, D.; Frank, J.; Appl, H.; Schöffl, H.; Pfaller W.; Gstraunthaler, G. 2010. Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. **Altex**, v. 27, p. 53-62.

Chen, G.; Wu, Q. 2005. The Application of Polyhydroxyalkanoates as Tissue Engineering Materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 6565-6578.

Cheng, M.; Chen, P.; Lan, C.; Sun, Y. 2011. Structure, Mechanical Properties and Degradation Behaviors of the Electrospun Fibrous Blends of PHBHHx/PDLLA. **Polymer**, v. 52, p. 1391-1401.

Cheung, H.; Lau, K.; Lu, T.; Hui, D. 2007. A Critical Review on Polymer-based Bio-engineered Materials for Scaffold Development. **Composites: Part B engineering**, v. 38, p. 291-300.

Davies, J. E. 1996. In Vitro Modeling of the Bone/ Implant Interface. **The Anatomical Record**, v. 245, p. 426-445.

De Coppi, P.; Bartsch, G.; Siddiqui, M. M.; Xu, T.; Santos, C. C.; Perin, L.; Mostoslavsky, G.; Serre, A. C.; Snyder, E. Y.; Yoo, J. J.; Furth, M. E.; Soker, S.; Atala, A. 2007. Isolation of Amniotic Stem Cell Lines with Potential for Therapy. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 100-106.

Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. 2011. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. **BMC Medicine**, v. 9, p. 66-76.

Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, Dj.; Horwitz, E. 2006. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317.

Fischbach, G. D.; Fischbach, R. L. 2004. Stem Cells: Science, Policy, and Ethics. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1364-1370.

Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. S. 1970. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-pig Bone Marrow and Spleen Cells. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 3, p. 393-403.

Gabbay, J. S.; Heller, J. B.; Mitchell, S. A.; Zuk, P. A.; Spoon, D. B.; Wasson, K. L.; Jarrahy, R.; Benhaim, P.; Bradley, J. P. 2006. Osteogenic Potentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in a 3-Dimensional Matrix. **Annals of Plastic Surgery**, v. 57, p. 89-93.

Gajko-Galicka, A. 2002. Mutations in Type I Collagen Genes Resulting in Osteogenesis Imperfecta in Humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, p. 433-441.

Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. 2005. Bone Substitutes: An Update. **Injury International Journal of The Care of The Injured**, v. 36S, p. s20-s27.

Gimble, J. M.; Katz, A. J.; Bunnell, B. A. 2007. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. **Circulation Research**, v. 100, p. 1249-1260.

Girolamo, L.; Sartori, M. F.; Albisetti, W.; Brini, A. T. 2007. Osteogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells: Comparison of Two Different Inductive Media. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 154-157.

Hadjidakis, D. J.; Androulakis, I. I. 2006. Bone Remodeling. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385-396.

Haimi, S.; Suuriniemi, N.; Haaparanta, A.; Ellä, V.; Lindroos, B.; Huhtala, H.; Rätty, S.; Kuokkanen, H.; Sándor, G. K.; Kellomäki, M.; Miettinen, S.; Suuronen, R. 2009. Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose Stem Cells on PLA/Bioactive Glass and PLA/ β -TCP Scaffolds. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, p. 1473-1480.

Halvorsen, Y. C.; Franklin, D.; Bond, A. L.; Hitt, D. C.; Auchter, C.; Boskey, A. L.; Paschalis, E. P.; Wilkison, W. O.; Gimble, J. M. 2001. Extracellular Matrix Mineralization and Osteoblast Gene Expression by Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 729-741.

Harvath, L. 2000. Food and Drug Administration's Proposed Approach to Regulation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Products for Therapeutic Use. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 14, p. 104-111.

Hattori, H.; Masuoka, K.; Sato, M.; Ishihara, M.; Asazuma, T.; Takase, B.; Kikuchi, M.; Nemoto, K.; Ishihara, M. 2006. Bone Formation Using Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells and a Biodegradable Scaffold. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 76B, p. 230-239.

Heiskanen, A.; Satomaa, T.; Tiitinen, S.; Laitinen, A.; Mannelin, S.; Impola, U.; Mikkola, M.; Olsson, C.; Miller-Podraza, H.; Blomqvist, M.; Olonen, A.; Salo, H.; Lehenkari, P.; Tuuri, T.; Otonkoski, T.; Natunen, J.; Saarinen, J.; Laine, J. 2007. N-Glycolylneuraminic Acid Xenoantigen Contamination of Human Embryonic and Mesenchymal Stem Cells Is Substantially Reversible. **Stem Cells**, v. 25, p. 197-202.

Hipp, J.; Atala, A. 2008. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. **Stem Cell Reviews**, v. 4, p. 3-11.

Huang, W.; Shi, X.; Ren, L.; Du, C.; Wang, Y. 2010. PHBV Microspheres - PLGA Matrix Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, v. 31, p. 4278-4285.

Ikada, Y. 2006. Challenges in Tissue Engineering. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 3, p. 589-601.

Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E.; Caplan, A. I.; Bruder, S. P. 1997. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, p. 295-312.

Kanis, J. A. 2002. Diagnosis of Osteoporosis and Assessment of Fracture Risk. **The Lancet**, v. 359, p. 1929-1936.

Kanis, J. A.; Borgstrom, F.; De Laet, C.; Johansson, H.; Johnell, O.; Jonsson, B.; Oden, A.; Zethraeus, N.; Pfleger, B.; Khaltsev, N. 2005. Assessment of Fracture Risk. **Osteoporosis International**, v. 16, p. 581-589.

Karageorgiou, V.; Kaplan, D. 2005. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474-5491.

Ke, Y.; Wang, Y. J.; Ren, L.; Zhao, Q. C.; Huang, W. 2010. Modified PHBV Scaffolds by in situ UV Polymerization: Structural Characteristic, Mechanical Properties and Bone Mesenchymal Stem Cell Compatibility. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 1329-1336.

Khanna, S.; Srivastava, A. K. 2007. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) Having a High Hydroxyvalerate Content with Valeric Acid Feeding. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 457-461.

Kocaoemer, A.; Kern, S.; Klüter, H.; Bieback, K. 2007. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. **Stem Cells**, v. 25, p. 1270-1278.

Köse, G. T.; Kenar, H.; Hasırcı, N.; Hasırcı, V. 2003. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Matrices for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 1949-1958.

Köse, G. T.; Korkusuz, F.; Korkusuz, P.; Purali, N.; Ozkul, A.; Hasırcı, V. 2003. Bone Generation on PHBV Matrices: an in vitro Study. **Biomaterials**, v. 24, p. 4999-5007.

Kruger, G. M.; Mosher, J. T.; Bixby, S.; Joseph, N.; Iwashita, T.; Morrison, S. J. 2002. Neural Crest Stem Cells Persist in the Adult Gut but Undergo Changes in Self-Renewal, Neuronal Subtype Potential, and Factor Responsiveness. **Neuron**, v. 35, p. 657-669.

Kumarasuriyar, A.; Jackson, R. A.; Grøndahl L.; Trau, M.; Nurcombe, V.; Cool, S. M. 2005. Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) Supports in Vitro Osteogenesis. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 1281-1295.

Langer, R.; Vacanti, J. P. 1993. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, p. 920-926.

Lee, S.Y. 1996. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14.

Lee, S. Y.; Choi, J.; Han, K.; Song, J. Y. 1999. Removal of Endotoxin during Purification of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Gram-Negative Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2762-2764.

Lian, J. B.; Stein, G. S. 1992. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 3, p. 269-305.

Lichte, P.; Pape, H. C.; Pufe, T.; Kobbe, P.; Fischer, H. 2011. Scaffolds for Bone Healing: Concepts, Materials and Evidence. **Injury International Journal of The Care of The Injured**, v. 42, p. 569-573.

Lindroos, B.; Aho, K.; Kuokkanen, H.; Rätty, S.; Huhtala, H.; Lemponen, R.; Yli-Harja, O.; Suuronen, R.; Miettinen, S. 2010. Differential Gene Expression in Adipose Stem Cells Cultured in Allogeneic Human Serum Versus Fetal Bovine Serum. **Tissue Engineering: Part A**, v. 16, p. 2281-2294.

Lindroos, B.; Suuronen, R.; Miettinen, S. 2011. The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. **Stem Cell Reviews**, v. 7, p. 269-291.

Liu, T. M.; Martina, M.; Hutmacher, D. W.; Hui, J. H. P.; Lee, E. H.; Lim, B. 2007. Identification of Common Pathways Mediating Differentiation of Bone

Marrow- and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells into Three Mesenchymal Lineages. **Stem Cells**, v. 25, p. 750-760.

Liu, X.; Ma, P. X. 2004. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, p. 477-486.

Locke, M.; Windsor, J.; Dunbar, P. R. 2009. Human Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization and Applications in Surgery. **ANZ Journal of Surgery**, v. 79, p. 235-244.

Mackie, E. J. 2003. Osteoblasts: Novel Roles in Orchestration of Skeletal Architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1301-1305.

Mannello, F.; Tonti, G. A. 2007. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold! **Stem Cells**, v. 25, p. 1603-1609.

Mao, J. S.; Zhao, L. G.; Yin, Y. J.; De Yao, K. 2003. Structure and Properties of Bilayer Chitosan–gelatin Scaffolds. **Biomaterials**, v. 24, p. 1067-1074.

Martin, M. J.; Muotri, A.; Gage, F.; Varki, A. 2005. Human Embryonic Stem Cells Express an Immunogenic Nonhuman Sialic Acid. **Nature Medicine**, v. 11, p. 228-232.

Mitchell, J. B.; Mcintosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Floyd, Z. E.; Kloster, A.; Halvorsen, Y.; Storms, R. W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X.; Gimble, J. M. 2006. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell–Associated Markers. **Stem Cells**, v. 24, p. 376-385.

Mizuno, H. 2009. Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration: Ten Years of Research and Literature Review. **Journal of Nippon Medical School**, v. 76, p. 56-66.

Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63.

Mountford, J. C. 2008. Human Embryonic Stem Cells: Origins, Characteristics and Potential for Regenerative Therapy. **Transfusion Medicine**, v. 18, p. 1-12.

Murphy, W. L.; Dennis, R. G.; Kileny, J. L.; Mooney, D.J. 2002. Salt Fusion: An Approach to Improve Pore Interconnectivity within Tissue Engineering Scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 8, p. 43-52.

Nakamura, A.; Dohi, Y.; Akahane, M.; Ohgushi, H.; Nakajima, H.; Funaoka, H.; Takakura, Y. 2009. Osteocalcin Secretion as an Early Marker of In Vitro Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering: Part C**, v. 15, p. 169-180.

Nam, Y. S.; Park, T. G. 1999. Porous Biodegradable Polymeric Scaffolds Prepared by Thermally Induced Phase Separation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 47, p. 8-17.

Onuki, Y.; Bhardwaj, U.; Papadimitrakopoulos, F.; Burgess, D. J. 2008. A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 2, p. 1003-1015.

Pereira, L. V. 2008. A Importância do Uso das Células Tronco para a Saúde Pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 7-14.

Price, P. J.; Gregory, E. A. 1982. Relationship Between in vitro Growth Promotion and Biophysical and Biochemical Properties of The Serum Supplement. **In Vitro**, v. 18, p. 576-584.

Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A. M.; Chiellini, E. 2010. Polymeric Materials for Bone and Cartilage Repair. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 403-440.

Raff, M. 2003. Adult Stem Cell Plasticity: Fact or Artifact? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 1-22.

Raisz, L. G. 1999. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, p. 1353-1358.

Riekstina, U.; Cakstina, I.; Parfejevs, V.; Hoogduijn, M.; Jankovskis, G.; Muiznieks, I.; Muceniece, R.; Ancans, J. 2009. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone

Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. **Stem Cell Reviews**, v. 5, p. 378-386.

Salgado, A. J.; Coutinho, O. P.; Reis, R. L. 2004. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromolecular Biosciences**, v. 4, p. 743-765.

Schäfer, R.; Schnaidt, M.; Klaffschenkel, R. A.; Siegel, G.; Schüle, M.; Rädlein, M. A.; Hermanutz-Klein, U.; Ayturan, M.; Buadze, M.; Gassner, C.; Danielyan, L.; Kluba, T.; Northoff, H.; Flegel, W. A. 2011. Expression of Blood Group Genes by Mesenchymal Stem Cells. **British Journal of Haematology**, v. 153, p. 520-528.

Selvaggi, T. A.; Walker, R. E.; Fleisher, T. A. 1997. Development of Antibodies to Fetal Calf Serum With Arthus-Like Reactions in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients Given Syngeneic Lymphocyte Infusions. **Blood**, v. 89, p. 776-779.

Seong, J. M.; Kim, B.; Park, J.; Kwon, I. K.; Mantalaris, A.; Hwang, Y. 2010. Stem Cells in Bone Tissue Engineering. **Biomedical Materials**, v. 5, p. 1-15.

Shahdadfar, A.; Frønsdal, K.; Haug, T.; Reinholt, F. P.; Brinchmanna, J. E. 2005. In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. **Stem Cells**, v. 23, p. 1357-1366.

Sikavitsas, V. I.; Temeno, J. S.; Mikos, A. G. 2001. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. **Biomaterials**, v. 22, p. 2581-2593.

Singh, M.; Patel, S. K.S.; Kalia, V. C. 2009. *Bacillus subtilis* as Potential Producer for Polyhydroxyalkanoates. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1-11.

Sodek, J.; Ganss, B.; McKee, M. D. 2000. Osteopontin. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, p. 279-303.

Sommerfeldt, D. W.; Rubin, C. T. 2001. Biology of Bone and How It Orchestrates the Form and Function of the Skeleton. **European Spine Journal**, v. 10, p. S86–S95.

Spees, J. L.; Gregory, C. A.; Singh, H.; Tucker, H. A.; Peister, A.; Lynch, P. J.; Hsu, S.; Smith, J.; Prockopy, D. J. 2004. Internalized Antigens Must Be

Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy. **Molecular Therapy**, v. 9, p. 447-456.

Squio, C. R.; Aragão, G. M. F. 2004. Estratégias de Cultivo Para Produção dos Plásticos Biodegradáveis poli(3-hidroxitirato) e poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615-622.

Tabata, Y. 2009. Biomaterial Technology for Tissue Engineering Applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, p. S311-S324.

Takahashi, K.; Yamanaka, S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, p. 663-676.

Tang, X. J.; Wu, Q. Y. 2006. Mesenchymal Stem Cellular Adhesion and Cytotoxicity Study of Random Biopolyester Scaffolds for Tissue Engineering. **Journal of Materials Sciences: Materials in Medicine**, v. 17, p. 627-632.

Toma, J. G.; Akhavan, M.; Fernandes, K. J. L.; Barnabé-Heider, F.; Sadikot, A.; Kaplan, D. R.; Miller, F. D. 2001. Isolation of Multipotent Adult Stem Cells from the Dermis of Mammalian Skin. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 778-784.

Tullberg-Reinert, H.; Jundt, G. 1999. In situ Measurement of Collagen Synthesis by Human Bone Cells with a Sirius Red-based Colorimetric Microassay: Effects of Transforming Growth Factor β 2 and Ascorbic Acid 2-phosphate. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 112, p. 271-276.

Valerio, P.; Pereira, M. M.; Goes, A. M.; Leite, M. F. 2004. The Effect of Ionic Products from Bioactive Glass Dissolution on Osteoblast Proliferation and Collagen Production. **Biomaterials**, v. 25, p. 2941-2948.

van der Valk, J.; Brunner, D.; De Smet, K.; Svenningsen, Å. F.; Honegger, P.; Knudsen, L.E.; Lindl, T.; Noraberg, J.; Price, A.; Scarino, M. L.; Gstraunthaler, G. 2010. Optimization of Chemically Defined Cell Culture Media – Replacing Fetal Bovine Serum in Mammalian in vitro Methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1053-1063.

Venturi, G.; Tedeschi, E.; Mottes, M.; Valli, M.; Camilot, M.; Viglio, S.; Antoniazzi, F.; Tato, L. 2006. Osteogenesis Imperfecta: Clinical, Biochemical and Molecular Findings. **Clinical Genetics**, v. 70, p. 131-139.

Verlinden, R. A. J.; Hill, D. J.; Kenward, M. A.; Williams, C. D.; Radecka, I. 2007. Bacterial Synthesis of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1437-1449.

Volarevic, V.; Ljubic, B.; Stojkovic, P.; Lukic, A.; Arsenijevic, N.; Stojkovic, M. 2011. Human Stem Cell Research and Regenerative Medicine- Present and Future. **British Medical Bulletin**, p. 1-14.

Wagers, A. J.; Weissman, I. L. 2004. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116, p. 639-648.

Wagner, W.; Weina, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blakec, J.; Schwager, C.; Ecksteina, V.; Ansorgec, W.; Hoa, A. D. 2005. Comparative Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 1402-1416.

Whang, K.; Thomas, C. H.; Healy, K. E. 1995. A Novel Method to Fabricate Bioabsorbable Scaffolds. **Polymer**, v. 36, p. 837-842.

Whang, K.; Tsai, D. C.; Nam, E. K.; Aitken, M.; Sprague, S. M.; Patel, P. K.; Healy, K. E. 1998. Ectopic Bone Formation via rhBMP-2 Delivery from Porous Bioabsorbable Polymer Scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 42, p. 491-499.

Yang, S.; Leong, K.; Du, Z.; Chua, C. 2001. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 679-689.

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H. 2001. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 211-228.

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D. A.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-4295.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0023.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de abril de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Diferenciação osteogênica de células-tronco humanas do tecido adiposo cultivadas em matriz multidimensional de polihidroxitirato empregando soro humano**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a horizontal line.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG