

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, de Minas e de
Materiais

Tese de Doutorado

**“Avaliação da Diferenciação Osteogênica de Células-Tronco
Do Tecido Adiposo Humano Cultivadas em Espuma de
Vidro Bioativo e Biorreator de Perfusão para
Engenharia de Tecido Ósseo”**

Autora: Alexandra Rodrigues Pereira da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Março/2012

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, de Minas e de
Materiais

Alexandra Rodrigues Pereira da Silva

**“Avaliação da Diferenciação Osteogênica de Células-Tronco
Do Tecido Adiposo Humano Cultivadas em Espuma de
Vidro Bioativo e Biorreator de Perfusão para
Engenharia de Tecido Ósseo”**

Tese de Doutorado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica, de Minas e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Ciência dos Materiais

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

Março/2012

“O grande desafio das pesquisas com biomateriais é que todos os dispositivos para implante substituem tecidos vivos cujas propriedades físicas e químicas são resultado de milhares de anos de evolução”
(Larry L. Hench, 1998).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida;

À minha família: meus queridos pais, irmãos, cunhado e marido, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, pela paciência e amor;

À Profa. Dra. Marivalda, pela oportunidade, confiança, orientação e amizade;

Ao Prof. Dr. Alfredo, também pela confiança, orientação e amizade;

Aos professores Drs. Rodrigo, Herman, Wander, Dawidson e Rogéria, pelas contribuições científicas e disponibilidade dos laboratórios;

Aos colegas do NDBio: Sandhra, Elke, Alessandra, Luisa, Magda, Iaci, Lívio, Tadeu, Joyce, Ezequiel, Hermes, Marco Elísio, Bruna, em especial Agda e Dickson.

A todos os amigos do LICM: Ana Carolina, Anne, Arthur, Betinha, Carol Andrade, Carol Melo, Ciça, Cíntia, Cris, Elis, Eliza, Estefânia, Jankerle, Jerusa, Ju Lott, Laura, Lílian, Luiza, Maira, Mariana, Marina, Michele, Naira, Natássia, Pablo, Pedro, Raissa e Viviane. Em especial, às queridas Alessandra, Carol Reis, Silviene e Thaís. E um agradecimento mais que especial à querida Ana Cláudia, pela ajuda incondicional;

Aos funcionários do DEMET: Andréia, Patrícia, Cida, Nelson, Hilda, Sr. Urias e Paulo;

À Clínica do Dr. Lamana pela colaboração na coleta dos produtos de lipoaspiração;

Ao CDTN pela irradiação das matrizes tridimensionais;

Ao CEMEL – ICB/UFMG e Centro de Microscopia da UFMG;

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Engenharia de Tecidos é uma ciência multidisciplinar cujo objetivo é combinar células a uma matriz estrutural para formar um construto capaz de promover a regeneração do tecido lesado. A espuma de vidro bioativo (BV) produzida pelo processo sol-gel é um material osteoindutor que fornece uma rede de macroporos interconectados necessária à colonização celular. O emprego das células-tronco do tecido adiposo humano (hASC) apresenta vantagens como facilidade de coleta, grande número de células obtidas e rápida expansão *in vitro*, capazes de se diferenciar em osteoblastos. O uso de biorreatores (BR) para o cultivo celular tridimensional em matriz permite uma maior eficiência de nutrição das células e aplicação de forças mecânicas, importantes moduladoras da fisiologia celular óssea. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a diferenciação osteogênica de hASC semeadas em espuma de vidro bioativo através do cultivo tridimensional em biorreator de perfusão para a produção de um construto funcional para a engenharia de tecido óssea. Inicialmente foi realizada a síntese e caracterização químico-estrutural da espuma de BV, que apresentou uma rede de poros de 100-500µm interconectados e porosidade de 88%. A montagem do BR, assim como a verificação da degradação e bioatividade das espumas de BV de maneira estática e dinâmica, mostraram que o cultivo dinâmico com taxa de fluxo de 0,1mL/min foi capaz de manter o pH da solução de SBF e de permear a amostra, através da deposição da camada de hidroxiapatita carbonatada no interior dos poros do interior das amostras. Foram realizadas a obtenção e caracterização das hASC e o desenvolvimento de protocolo para o cultivo das hASC em meio Leibovitz independente de CO₂ (LEI) para uso no BR de perfusão, que evidenciou uma melhor adaptação de maneira gradual. Também foi realizada uma comparação entre hASC cultivadas em meio padrão DMEM e no meio LEI, as quais apresentaram semelhança morfológica e fenotípica e foram capazes de se diferenciar no fenótipo osteogênico quando em meio LEI suplementado com os fatores osteogênicos (LEI O). Desta forma, os próximos ensaios foram realizados em meio LEI e LEI O. O cultivo estático das hASC semeadas na matriz de BV e em meio LEI e LEI O por 7, 14 e 21 dias mostrou uma ótima adaptação das células à matriz e aos meios testados, um pico de atividade da fosfatase alcalina (FA) aos 14 dias de cultivo em meio LEI, o que evidenciou a ação osteoindutora do material sobre as hASC, teste que foi confirmado pela

imunofluorescência. Finalmente, foi realizado o cultivo das hASC em matriz de BV no biorreator de perfusão, os quais demonstraram aumento significativo da viabilidade e proliferação celular aos 7 dias de cultivo, pico de atividade da FA aos 14 dias de cultivo, com uma produção maior no grupo cultivado em meio LEI. Além disso, os ensaios de imunofluorescência evidenciaram a expressão de osteopontina (OP), osteocalcina (OC) e colágeno tipo I a partir de 7 dias e com maior evidência da fluorescência aos 21 dias de cultivo para o meio LEI O e a evolução das células de um formato fusiforme para o formato cuboidal. A imunofluorescência do grupo cultivado em meio LEI aos 21 dias também evidenciou a expressão das três proteínas, mas de maneira menos intensa e com menor alteração na morfologia celular. O ensaio de PCR confirmou a expressão dos genes da OP, OC e FA, expressos pelas hASC em todos os períodos de cultivo no biorreator de perfusão com meio LEI O. Portanto, pode-se concluir que as hASC cultivadas em BV e LEI O de maneira dinâmica apresentaram alteração fenotípica para células osteoblásticas, evidenciando se tratar de uma estratégia de cultivo celular promissora para obtenção de um construto funcional para a engenharia de tecido ósseo.

Palavras chave: Engenharia de Tecido, Espuma de Vidro Bioativo, Células-Tronco, Biorreator de Perfusão, Osso.

ABSTRACT

Tissue Engineering is a multidisciplinary science whose goal is to combine a structural matrix and cells to form a construct able to promote regeneration of injured tissue. Bioactive glass foam (BG) produced by sol-gel is an osteoinductive material that provides a network of interconnected macropores necessary for cell colonization. The use of human adipose stem cells (hASC) present advantages such as easy collecting, large numbers of cells and rapid expansion *in vitro*, capable of differentiating into osteoblasts. The use of bioreactors (BR) in three-dimensional cell culture enables greater efficiency for cell nutrition and application of mechanical forces, important modulators of bone cell physiology. In this context, the objective of this study is to evaluate the osteogenic differentiation of hASC seeded on bioactive glass foam and cultured in three-dimensional perfusion bioreactor for the production of a functional construct for bone tissue engineering. The synthesis and characterization of BG was initially performed, resulting in an interconnected network with pore size range 100-500 μ m and 88% porosity. Evaluation of static and dynamic degradation and bioactivity of BG foam showed that 0.1 ml/min flow rate was able to maintain the pH of the SBF solution and permeate the sample, and led to deposition of a carbonated hydroxyapatite layer on the sample surface and inner pores. The extraction and characterization of hASC were performed and a new protocol for hASC cultivation in Leibovitz CO₂ independent medium (LEI) was developed for use in the perfusion BR. A comparison between hASC grown in standard DMEM and LEI was also performed, showing similar morphological and phenotypic characteristics and ability to differentiate into osteogenic phenotype when cultured in LEI supplemented with osteogenic factors (LEI O). The static cultivation of hASC seeded on the BG foam in LEI for 7, 14 and 21 days showed a great adaptation of cells to the matrix at 7 days, a peak of alkaline phosphatase activity (ALP) at 14 days in LEI, evidencing the BG osteoinductive action on hASC, which was confirmed by immunofluorescence. Finally, the hASC cultivation on BG in the BR demonstrated a significant increase in cell proliferation and viability at 7 days of culture, ALP activity peak at 14 days, with increased production in LEI group. In addition, immunofluorescence assay revealed expression of osteopontin (OP),

osteocalcin (OC) and collagen type I from 7 to 21 days culture, being more evident and strong at 21 days culture in LEI O . Moreover, the cells changed from a spindle form to a cuboidal shape. Immunofluorescence of the group cultivated in LEI at 21 days also showed the expression of these proteins, but with a less intense signal and lower change in cell morphology. The PCR assay confirmed the expression of OP, OC and FA genes expressed by hASC at all cultivation times in LEI O in the perfusion bioreactor. Therefore it can be concluded that hASC seeded in BG and cultivated in BR presented phenotypic change to osteoblastic cells, suggesting this is a promising strategy for cell culture to obtain a functional construct for bone tissue engineering.

Keywords: Tissue Engineering, Bioactive Glass Foam, Stem Cells, Perfusion Bioreactor, Bone.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3. 1: Abordagem geral da Engenharia de Tecidos Convencional.	6
Figura 3. 2: As transições celulares da célula tronco mesenquimal em alguns fenótipos altamente diferenciados	16
Figura 3. 3: Morfologia e diferenciação em multilinhagem das ASC. (A) ASC primárias exibem morfologia como fibroblasto; (B) diferenciação adipogênica; (C) diferenciação condrogênica; (D) diferenciação osteogênica pela ensaio de fosfatase alcalina e (E) deposição de matriz celular pelo método von Kossa.....	19
Figura 3. 4: A relação entre a elasticidade de tecidos e diferenciação de MSC. (A) tecidos sólidos apresentam uma gama de rigidez, medida através do módulo de elasticidade E. (B) as MSC desenvolvem formas ramificada, de fusos, ou poligonais cultivadas respectivamente em matrizes no intervalo típicos do $E_{\text{cérebro}}$, $E_{\text{músculo}}$ ou matrizes rígidas de colágeno.....	20
Figura 3. 5: Tipos de biorreatores. (A) Biorreator frasco com agitação; (B) reator simples de parede giratória, (C) biorreator de perfusão direta.	23
Figura 4. 1: Ilustração do esquema da síntese do vidro bioativo.....	28
Figura 4. 2: Vazamento da espuma de vidro bioativo (A) e recipiente de Teflon projetado para tornar mais eficiente a vazão da espuma (B).	28
Figura 4. 3: Ilustração do esquema de organização do biorreator: câmara de perfusão, bomba peristáltica e tubos de conexão dentro da estufa de CO ₂	31
Figura 4. 4: Obtenção de células-tronco a partir do tecido adiposo humano.....	36
Figura 4. 5: Ilustração de garrafas de 75cm ² contendo o meio basal e as células-tronco que inicialmente irão se aderir ao fundo da garrafa e, com a proliferação, irão alcançar a confluência.....	37
Figura 4. 6: Gráfico de tamanho <i>versus</i> granulosidade. R1 é a população escolhida para análise dos marcadores nas culturas em meio (A) DMEM e (B) LEI.	43
Figura 4. 7: Espuma de vidro bioativo recém semeada com hASC (A); após 4 horas em estufa, construto sendo colocado dentro da câmara de perfusão do Biorreator (B); visão superior da montagem do biorreator de perfusão (C).	51
Figura 5. 1: Imagem da espuma de vidro bioativo (A) 6mm e (B) 12 mm.	57
Figura 5. 2: Imagem obtida por MEV da espuma de vidro bioativo.	58
Figura 5. 3: Espectro de EDS evidenciando os componentes presentes na espuma de vidro bioativo.	58
Figura 5. 4: Difratoograma da espuma de vidro bioativo.	59
Figura 5. 5: Espectro FTIR obtido da espuma de vidro bioativo.....	60
Figura 5. 6: Em (A) os valores do pH das soluções usadas nos testes estático e dinâmico (foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados) e em (B) a perda de massa das amostras nos testes de degradação (* $p<0,05$ e *** $p<0,001$ estático x dinâmico).	61
Figura 5. 7: Micrografia da superfície externa da amostra de 14 dias do teste estático (A) e dinâmico (C). E em (B), superfície interna da mesma amostra do teste estático e em (D) do teste dinâmico.....	63
Figura 5. 8: Micrografia da superfície interna (A) e externa (B) da amostra de vidro bioativo após 21 dias de teste dinâmico.....	63

- Figura 5. 9: Espectro de EDS representativo dos testes estático e dinâmico evidenciando os componentes presentes na camada que recobre a espuma de vidro bioativo após a imersão em SBF. 64
- Figura 5. 10: Difratoograma evidenciando os picos cristalinos da camada de HCA sobre a superfície da espuma de vidro bioativo após a imersão em SBF em 1, 7, 14 e 21 dias e do material sem imersão (BV). 65
- Figura 5. 11: Espectro de FTIR representativo dos testes estático e dinâmico obtido da superfície da espuma de vidro bioativo após a imersão em SBF. 66
- Figura 5. 12: Aspectos da morfologia das células extraídas do tecido adiposo humano. Em (A) população heterogênea de hASC na 1ª passagem com células não aderentes (seta); em (B) hASCs na 2ª passagem com uma pequena população de células não aderentes (seta); e em (C) hASC na 4ª passagem, ausência de células não aderentes, população homogênea de células aderentes, fusiformes e capazes de formar colônias (seta). 68
- Figura 5. 13: MTT comparativo entre as hASC cultivadas em meio DMEM e os grupos G1, G2 e G3 de adaptação gradativa das hASC ao meio LEI, no qual a adaptação mais lenta - G1 - apresentou o melhor resultado. 69
- Figura 5. 14: Teste da FA comparativo entre as hASC cultivadas em meio DMEM e os grupos G1, G2 e G3 de adaptação gradativa das hASC ao meio LEI, no qual a adaptação mais lenta do G1 apresentou o melhor resultado. 70
- Figura 5. 15: Imagens obtidas por MO das hASC cultivadas em meio DMEM e em adaptação ao meio LEI da 2ª à 4ª passagem. 71
- Figura 5. 16: Análise fenotípica através de citometria de fluxo das hASC cultivadas em meio (A) LEI e (B) DMEM. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva vermelha é o controle negativo da fluorescência, a linha preta apresenta a população de células avaliada para um marcador específico e o seu deslocamento para direita indica a existência da marcação. 73
- Figura 5. 17: Visualização por MO dos cristais de formazan no ensaio de MTT.hASC cultivadas em (A) DMEM e (B) LEI. Aumento: 100x. 75
- Figura 5. 18: Representação gráfica da proliferação celular das hASC cultivadas em meio DMEM e DMEM O (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ DMEM x DMEM O em cada tempo) (A) e LEI e LEI O (** $p < 0,001$ LEI x LEI O em cada tempo) (B). 75
- Figura 5. 19: Visualização por MO do precipitado púrpura no ensaio de produção da fosfatase alcalina. hASC cultivadas em (A) DMEM O e (B) em LEI O. Aumento: 100X. 77
- Figura 5. 20: Representação gráfica da detecção da atividade da fosfatase alcalina em hASC cultivadas em (A) DMEM e DMEM O (** $p < 0,001$ DMEM x DMEM O) e em (B) LEI e LEI O (** $p < 0,001$ LEI x LEI O em cada tempo). 77
- Figura 5. 21: Representação gráfica da síntese de colágeno por hASC cultivadas em (A) DMEM e DMEM O (** $p < 0,001$ DMEM x DMEM O) e em (B) LEI e LEI O (** $p < 0,01$ LEI x LEI O). 79
- Figura 5. 22: Análise de imunofluorescência para a proteína osteopontina. (A) hASC cultivadas em meio LEI de cultura basal. hASC cultivadas em meio de diferenciação osteogênica após (B) 7, (C) 14 e (D) 21 dias. 81
- Figura 5. 23: Análise de imunofluorescência para a proteína osteocalcina. (A) hASC cultivadas em meio LEI de cultura basal. hASC cultivadas em meio de diferenciação osteogênica após (B) 7, (C) 14 e (D) 21 dias. 82

Figura 5. 24: Análise de imunofluorescência para a proteína colágeno tipo I. (A) hASC cultivadas em meio LEI de cultura basal. hASC cultivadas em meio de diferenciação osteogênica após (B) 7, (C) 14 e (D) 21 dias.....	83
Figura 5. 25: Imagens por MEV evidenciando as hASC aderidas à matriz de vidro bioativo através de prolongamentos citoplasmáticos (A) 7 dias e (B) 21 dias.	86
Figura 5. 26: Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O.....	87
Figura 5. 27: Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O.....	88
Figura 5. 28: Análise de imunofluorescência para as proteínas (A) osteopontina e (B) colágeno tipo I de hASC semeadas sobre a matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura basal por 14 dias.....	89
Figura 5. 29: Imagens por MEV evidenciando (A) um corte em um poro da amostra de vidro bioativo com várias células aderidas (setas), (B) maior aumento do poro evidenciando melhor as células, (C) e (D) maior aumento das hASC aderidas ao material e grânulos de secreção na membrana plasmática celular.....	91
Figura 5. 30: Imagens por MEV em 21 dias de cultivo no biorreator evidenciando (A) a superfície da amostra de vidro bioativo com vários aglomerados de células aderidas (B) um poro da amostra com várias células aderidas, (C) maior aumento do poro evidenciando melhor as células e a rugosidade do material, e (D) maior aumento das hASC aderidas ao material e grânulos de secreção na membrana plasmática celular....	92
Figura 5. 31: Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O no biorreator de perfusão O.....	93
Figura 5. 32: Gráfico representativo da viabilidade e proliferação celular das hASC cultivadas em matrizes de vidro bioativo e meios LEI e LEI O de maneira estática e dinâmica.....	94
Figura 5. 33: Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O no biorreator de perfusão O.....	95
Figura 5. 34: Gráfico representativo da atividade da fosfatase alcalina das hASC cultivadas em matrizes de vidro bioativo e meios LEI e LEI O de maneira estática e dinâmica.....	96
Figura 5. 35: Análise de imunofluorescência para as proteínas (A) osteocalcina, (B) osteopontina e (C) colágeno tipo I de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura basal em biorreator de perfusão após 21 dias.	98
Figura 5. 36: Análise de imunofluorescência para a proteína osteocalcina de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura osteogênico em biorreator de perfusão após (A) 7, (B) 14 e (C) 21 dias.	100
Figura 5. 37: Análise de imunofluorescência para a proteína osteopontina de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura osteogênico em biorreator de perfusão após (A) 7, (B) 14 e (C) 21 dias.	101
Figura 5. 38: Análise de imunofluorescência para a proteína colágeno tipo I de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura osteogênico em biorreator de perfusão após (A) 7, (B) 14 e (C) 21 dias.	102
Figura 5. 39: Imagens obtidas por microscopia ótica de células extraídas de uma amostra de vidro bioativo após o cultivo em meio osteogênico por 21 dias no biorreator. Em (A) e (C), aumento de 100X e em (B) e (D), aumento de 300X.....	103

Figura 5. 40: Detecção de osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina em 7, 14 e 21 dias em hASC cultivadas sobre a matriz de vidro bioativo, em meio LEI O e no biorretor de perfusão. SAOS como controle positivo e C- é o controle negativo. 104

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 4. 1: Principais tópicos da Metodologia..... 26

Esquema 4. 2: Cultivo Estático para Avaliação do meio LEI.	38
Esquema 4. 3: Cultivo Estático das hASC Semeadas nas Espumas de Vidro Bioativo.	47
Esquema 4. 4: Cultivo Dinâmico das hASC Semeadas nas Espumas de Vidro Bioativo...	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4. 1: Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	42
Tabela 4. 2: Anticorpos primários utilizados na marcação das células para imunofluorescência.....	45
Tabela 4. 3: Anticorpos secundários utilizados na marcação das células para imunofluorescência.....	46
Tabela 4. 4: Genes e sequências de nucleotídeos dos iniciadores para PCR.....	55

Equação 4. 1: Cálculo do Volume Aparente da Amostra.	29
Equação 4. 2: Cálculo da Densidade Volumétrica da Amostra.	30
Equação 4. 3: Cálculo da Porosidade Total.	30
Equação 4. 4: Cálculo da Área da Amostra.	33
Equação 4. 5: Volume da Solução para a Amostra.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ASC	Células-Tronco do Tecido Adiposo
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina
βGP	β-glicerofosfato
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética do Osso)
BR	Biorreator
BSA	Albumina de Soro Bovino
BV/BG	Vidro Bioativo
CAPES	Conselho Superior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEMEL	Centro de Microscopia Eletrônica – ICB/UFMG
CMO	Conteúdo Mineral do Osso
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM O	Meio DMEM suplementado com fatores osteogênicos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios X
EDS	Espectroscopia por Dispersão de Energia
EMP	Erro Médio Padrão
FA/ALP	Fosfatase Alcalina
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HA	Hidroxiapatita
hASC	Células-Tronco do Tecido Adiposo humano
HCA	Hidroxiapatita Carbonatada
HF	Ácido Fluorídrico
hMSC	Células-Tronco Mesenquimais humanas
HSC	Células-Tronco Hematopoiéticas

ISO	<i>International Standards Organization</i>
LEI	Meio Independente de CO ₂ de Leibovitz
LEI O	LEI suplementado com fatores osteogênicos
LESS	Lauril Éter Sulfato de Sódio
MEC	Matriz Extra Celular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia ótica
MSC	Células-Tronco Mesenquimais
MTT	<i>Mosmann Toxicity Test</i>
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NDBio-UFMG	Núcleo de Desenvolvimento de Biomateriais da UFMG
OC	Osteocalcina
OP	Osteopontina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina - Fosfato)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Poli(etileno glicol)
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático glicólico)
PLLA	Poli(L-ácido lático)
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	rotação por minuto
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
SBF	Soro Fetal Bovino
TCP	Fosfato Tricálcio
TEOS	Tetraetil ortossilicato
TEP	Trietilfosfato
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
SUMÁRIO	

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. Introdução	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1 Engenharia de Tecidos Convencional.....	5
3.2 Biomateriais	8
3.3 Células-Tronco para Engenharia de Tecido Ósseo.....	15
3.4 Biorreator para Cultivo Celular Tridimensional.....	21
4. Metodologia.....	26
4.1 Processamento e Caracterização das Espumas de Vidro Bioativo	26
4.1.1 Síntese de Espumas de Vidro Bioativo.....	26
4.1.2 Esterelização das Espumas de Vidro Bioativo	27
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	28
4.1.4 Espectroscopia de Raio X de Dispersão de Energia.....	29
4.1.5 Picnometria de Hélio	29
4.1.6 Difração de Raios X.....	30
4.1.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	30
4.2 Projeto e Montagem do Biorreator de Perfusão.....	30
4.3 Avaliação da Degradação e Bioatividade das Espumas de Vidro Bioativo	33
4.4 Isolamento e Cultivo das Células-Tronco a Partir do Tecido Adiposo Humano.....	34
4.5 Determinação de Metodologia de Cultivo das hASC em Meio Independente de CO ₂	37
4.5.1 Viabilidade e Proliferação Celular.....	39
4.5.2 Atividade da Fosfatase Alcalina	40
4.5.3 Novo Meio de Cultura Basal e para Indução da Osteogênese no Biorreator	40
4.6 Estudos Básicos Comparativos em Culturas de hASC.....	41
4.6.1 Caracterização do Imunofenótipo das hASC.....	41

4.6.2 Cultivo das hASC em meios DMEM e LEI	43
4.7 Cultivo Estático das hASC Sementes nas Espumas de Vidro Bioativo.....	46
4.7.1 Avaliação da Colonização e Adesão Celular	47
4.7.2 Viabilidade e Proliferação Celular.....	48
4.7.3 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina	49
4.7.4 Avaliação da Expressão de Marcadores de Células da Linhagem Osteogênica....	49
4.8 Efeito do Cultivo Dinâmico em Biorreator de Perfusão Sobre a Diferenciação Osteogênica das hASC.....	50
4.8.1 Avaliação da Colonização e Adesão Celular	51
4.8.2. Viabilidade e Proliferação Celular.....	51
4.8.3 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina	52
4.8.4 Avaliação da Expressão de Marcadores de Células da Linhagem Osteogênica....	52
4.8.5. Comprovação da Diferenciação Osteogênica Através de PCR	52
5. Resultados e Discussão.....	57
5.1. Processamento e Caracterização das Espumas de Vidro Bioativo	57
5.1.1. Síntese das Espumas de Vidro Bioativo	57
5.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	57
5.1.3. Espectroscopia de Raio X de Dispersão de Energia	58
5.1.4. Picnometria de Hélio	59
5.1.5. Difração de Raios X.....	59
5.1.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	60
5.2. Avaliação da Degradação e Bioatividade das Espumas de Vidro Bioativo	61
5.3. Isolamento e Cultivo das Células-Tronco a Partir do Tecido Adiposo Humano.....	67
5.4. Determinação de Metodologia de Cultivo das hASC em Meio Independente de CO ₂	68
5.4.1. Viabilidade e Proliferação Celular.....	68
5.4.2. Atividade da Fosfatase Alcalina	69
5.5. Estudos Básicos Comparativos em Culturas de hASC.....	70
5.5.1. Caracterização do Imunofenótipo das hASC.....	71
5.5.2. Cultivo Comparativo das hASC em Meios DMEM e LEI.....	74
5.6. Cultivo Estático das hASC Sementes nas Espumas de Vidro Bioativo.....	85
5.6.1. Avaliação da Colonização e Adesão Celular	85

5.6.2. Avaliação da Viabilidade e Proliferação Celular.....	87
5.6.3. Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina	87
5.6.4 Avaliação da Expressão de Marcadores de Células da Linhagem Osteogênica....	89
5.7 Efeito do Cultivo Dinâmico em Biorreator de Perfusão Sobre a Diferenciação Osteogênica das hASC.....	90
5.7.1 Avaliação da Colonização e Adesão Celular	90
5.7.2. Viabilidade e Proliferação Celular.....	90
5.7.3 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina	95
5.7.4 Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica	97
5.7.5 Comprovação da Diferenciação Osteogênica Através de PCR	104
6. Conclusões	106
7. Referências.....	107
ANEXO I.....	125
ANEXO II.....	127

1. Introdução

A engenharia de tecidos foi definida como um campo de pesquisa apenas no início dos anos 80 e atualmente, o progresso neste campo está relacionado ao desenvolvimento de diversas abordagens de modelos de estudo. A engenharia de tecidos apóia sua base científica em diversas áreas do conhecimento: biologia celular, bioquímica, biologia molecular, ciência dos materiais, engenharia química e bioengenharia, que permitem a aplicação racional dos princípios da engenharia nos sistemas vivos. O desafio científico da engenharia de tecidos envolve a compreensão dos mecanismos celulares e a fabricação de materiais para fornecer matrizes e modelos que guiem a regeneração tecidual (VACANTI & VACANTI, 2007).

A reconstrução de grandes segmentos ósseos continua a ser um problema clínico importante no caso da extensa perda óssea devido a eventos patológicos, tais como trauma, inflamação e tratamento cirúrgico de tumores. As abordagens terapêuticas atuais incluem enxertia óssea ou implantes de diferentes biomateriais, mas nenhuma delas revelou-se plenamente satisfatória (CANCEDDA *et al*, 2007; REICHERT *et al*, 2009).

Portanto, uma mudança torna-se necessária: a substituição de tecidos pela regeneração de tecidos ao seu estado e função original, pois todos os implantes existentes atualmente possuem uma vida útil limitada e a expectativa de vida da população tem aumentado continuamente (JONES & HENCH, 2003).

O Núcleo de Desenvolvimento de Biomateriais da UFMG (NDBio-UFMG), um grupo multidisciplinar criado em 1997 e cadastrado no CNPq, vem direcionando esforços no sentido de prover os alicerces para o desenvolvimento de uma nova geração de Biomateriais e Engenharia de Tecidos. O grupo acumula uma experiência no desenvolvimento, caracterização e avaliação a nível celular e *in vivo* de biomateriais.

O tipo de tecido mais focado pelo grupo é o tecido ósseo, pois inúmeros casos clínicos na área ortopédica e odontológica justificam esforços da pesquisa neste campo,

incluindo a necessidade de melhores materiais de preenchimento para a reconstrução de grandes defeitos ósseos.

Dentre as possibilidades de matrizes específicas para o tecido ósseo, o grupo NDBio-UFMG tem trabalhado no desenvolvimento de espumas de vidro bioativo produzidas pelo processo sol-gel e alguns estudos mostraram suas características de bioatividade, degradabilidade e estrutura de poros adequada em ensaios *in vitro* e *in vivo* (COELHO, 2003; PEREIRA *et al*, 2005b; VALÉRIO *et al*, 2005; DUTRA *et al*, 2006).

As células vivas são requeridas para a fabricação de substitutos teciduais. Estas células criam ou recriam estruturas funcionais usando informações e sinalizações pré-programadas em seu código genético. A aquisição de células para a produção de estruturas orgânicas é um grande desafio, pois para a fabricação de estruturas em larga escala, há a necessidade da obtenção de grande quantidade de células que sejam imunologicamente compatíveis com o indivíduo receptor (VACANTI & VACANTI, 2007).

A medula óssea contém células-tronco mesenquimais (MSC), mas a coleta é um procedimento invasivo. Portanto, é de relevante interesse avaliar a possibilidade de obtenção de células-tronco multipotentes de outras fontes teciduais, tais como periósteo ou tecido adiposo obtido por lipoaspiração (CANCEDDA *et al*, 2007).

A coleta, a quantidade de células e a rápida expansão *in vitro* são, portanto, vantagens das células-tronco derivadas do tecido adiposo em relação às células-tronco derivadas da medula óssea quando da contemplação de estratégias clínicas. As próprias células do paciente podem ser coletadas, expandidas em cultura, semeadas em uma matriz para posteriormente serem implantadas no local do defeito ósseo (COWAN *et al*, 2004). As células-tronco mesenquimais adiposas são capazes de se diferenciar nas linhagens condrogênica, adipogênica, miogênica e osteogênica, sugerindo sua aplicabilidade na reconstituição de tecidos (ZUK *et al*, 2001).

Para aplicação da engenharia de tecidos, grandes quantidades de células devem ser mantidas vivas, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. O desenvolvimento de sistemas para garantir esta sobrevivência celular inclui sistemas de biorreatores, uma estratégia para suprir as limitações de transferência de massa que os tecidos vivos necessitam para adequada nutrição e eliminação de resíduos celulares, além de proporcionarem estímulos mecânicos específicos para o desenvolvimento tecidual através da pressão hidrodinâmica e tensões de cisalhamento (VACANTI & VACANTI, 2007).

Dentro desse contexto, o presente trabalho envolveu uma metodologia multidisciplinar entre os Departamentos de Engenharia de Materiais e de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Este estudo teve como objetivo principal a análise da diferenciação osteogênica de células-tronco do tecido adiposo humano semeadas em uma matriz de espuma de vidro bioativo e cultivadas em biorreator de perfusão para a produção de um construto para a engenharia de tecido ósseo. Inicialmente foi realizada a síntese e a caracterização microestrutural das espumas de vidro bioativo, a montagem do biorreator de perfusão e a realização do teste de degradação e bioatividade das matrizes.

O passo seguinte foi a obtenção de células-tronco a partir do tecido adiposo humano, a adaptação dessas células ao meio de cultura Leibovitz independente de CO₂ (LEI) para sua utilização no biorreator de perfusão e comparação das células cultivadas no meio LEI com o meio padrão DMEM através da Imunofenotipagem e Microscopia Ótica. Em seguida, as hASC foram semeadas sobre o vidro bioativo e cultivadas em cultura estática e em biorreator de perfusão utilizando meio LEI basal e osteogênico, para avaliar a melhor alternativa para a diferenciação osteogênica.

Para avaliar a adesão, proliferação e diferenciação celular, diferentes técnicas de caracterização citoquímica foram utilizadas como Viabilidade e Proliferação Celular por MTT, Atividade da Fosfatase Alcalina, Dosagem de Colágeno, Imunofluorescência, Reação em Cadeia da Polimerase e Microscopia Eletrônica de Varredura.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliação da diferenciação osteogênica de células-tronco do tecido adiposo humano semeadas em matriz de espuma de vidro bioativo através do cultivo tridimensional em biorreator de perfusão para a produção de um construto funcional para a engenharia de tecido ósseo.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção e caracterização da espuma de vidro bioativo;
- Montagem do biorreator de perfusão;
- Verificação da degradação e bioatividade das espumas de vidro bioativo de maneira estática e no biorreator de perfusão;
- Obtenção e caracterização de células-tronco do tecido adiposo humano (hASC);
- Desenvolvimento de protocolo para o cultivo de hASC em meio independente de CO₂ (LEI) para uso no biorreator de perfusão;
- Comparação morfológica e fenotípica das hASC cultivadas em meio LEI e DMEM;
- Cultivo estático e em biorreator de perfusão das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo em meio LEI basal e osteogênico;
- Verificação da diferenciação osteogênica das hASC testadas.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Engenharia de Tecidos Convencional

A Medicina Regenerativa engloba a terapia celular e a engenharia de tecidos. Alguns autores classificam como sinônimo medicina regenerativa e engenharia de tecidos, mas outros acham que o diferencial é o uso das células-tronco (LANGER & VACANTI, 1993, PUPPI *et al*, 2010). Há uma busca pela capacidade natural de regeneração de tecidos pelo próprio organismo, assim o processo de regeneração pode reparar, quando necessário, os tecidos lesados por trauma, doença ou senescência. Duas estratégias diferentes podem ser empregadas: i) alteração *in vivo* de crescimento e função celular (regeneração de tecidos) e ii) construção *in vitro* de tecidos a partir de células do paciente (engenharia de tecidos).

A abordagem geral da engenharia de tecidos convencional pode ser assim descrita: para criar um tecido substituto vivo, um número pequeno de células pode idealmente ser colhido do paciente usando uma técnica de biópsia e então cultivado em laboratório para um número apropriado. Estas células podem então ser expandidas em uma matriz tridimensional, natural ou sintética, na presença de fatores de crescimento e de diferenciação. Se providas as condições e sinais adequados, as células irão secretar vários componentes da matriz extracelular (MEC) para criar de fato um tecido vivo que pode ser usado como tecido substituto para ser reimplantado no sítio lesado no paciente (Figura 3.1) (OHGUSHI & CAPLAN, 1999; TAKEZAWA, 2003; VACANTI & VACANTI, 2007). A matriz tridimensional deve se degradar no organismo em produtos de degradação atóxicos e na mesma taxa em que as células produzem sua própria MEC (JONES & HENCH, 2003). Se células do paciente forem usadas, não haverá resposta de rejeição imune ao tecido implantado.

A abordagem da engenharia de tecidos convencional para a regeneração óssea envolve, portanto, o isolamento de células do corpo para serem semeadas em matrizes estruturais e o construto formado deve então ser implantado na região lesada do organismo.

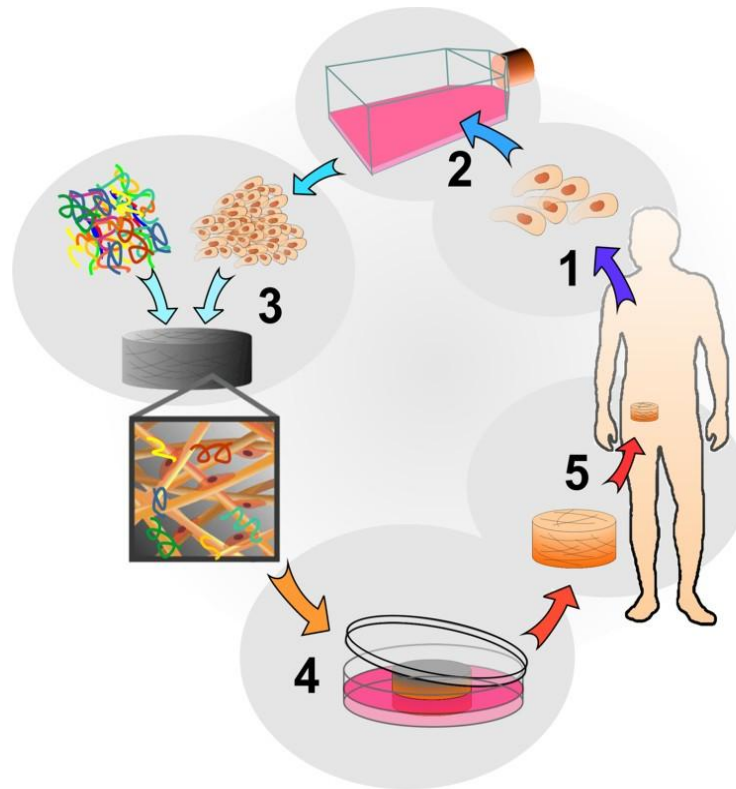


Figura 3. 1: Abordagem geral da Engenharia de Tecidos Convencional.

Comparativamente, o osso é um compósito natural formado por colágeno tipo I, que fornece a estrutura e a parte mineral do osso, que fornece a resistência. A organização hierárquica do osso varia de acordo com diferentes locais no esqueleto, portanto as propriedades biomecânicas variam consideravelmente (GOLDSTEIN *et al*, 2005; FRESHNEY *et al*, 2007). Os dois tipos de ossos mais importantes são o cortical e o trabecular. O osso cortical é uma estrutura densa com elevada resistência mecânica, também conhecido como osso compacto. O osso trabecular é uma estrutura porosa interna de suporte presente no final dos ossos longos como o fêmur ou dentro do osso cortical em ossos curtos. Este osso é uma rede que contém macroporos com 55 a 70% de porosidade interconectada (JONES & HENCH, 2003).

Os componentes celulares ósseos são: i) osteoblastos, células cuboidais uninucleadas que sintetizam os componentes da MEC e são responsáveis por sua mineralização; ii) osteócitos, osteoblastos aprisionados pela matriz óssea e que ocupam um espaço denominado de lacuna osteocítica; iii) osteoclastos, células multinucleadas de origem monocítica envolvidas na degradação da MEC óssea; e iv) células mesenquimais

indiferenciadas, também denominadas células osteogênicas que se diferenciam em osteoblastos (SOMMERFELDT & RUBIN, 2001).

O microambiente ósseo permite e promove funções celulares que levam à produção de matriz óssea e ossificação. A matriz é um sistema bioquímico ativo e dinâmico que transmite importantes fatores regulatórios para as células vizinhas, afeta a expressão de genes e mudanças nos níveis citoestruturais. Este ambiente bioquímico afeta a migração, adesão, proliferação, diferenciação, transcrição e translação celular (ALLORI *et al*, 2008a). Os componentes da MEC regulam a nucleação e a mineralização, assim como armazenam os fatores de crescimento para uso futuro (ALLORI *et al*, 2008b).

Esses componentes estão organizados em modo tridimensional formando as trabéculas ósseas que conferem ao osso a estrutura necessária para desempenhar as funções de suporte, proteção de órgãos internos, locomoção e de reservatório de minerais. Os ossos alojam a medula óssea, que é fonte de células hematopoiéticas. O osso é sistemicamente controlado por fatores hormonais e localmente regulado por forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas (ALLORI *et al*, 2008c).

Apesar do tecido ósseo apresentar grande capacidade de regeneração, em defeitos ósseos extensos os processos naturais de reparo ósseo não são suficientes para restaurar a integridade óssea, fazendo-se necessárias intervenções cirúrgicas (KRAUS & KIRKER-HEAD, 2006). Dentre as alternativas disponíveis para os procedimentos cirúrgicos ligados à reconstrução óssea, destacam-se os enxertos autólogo, aloenxerto, xenoenxerto e os aloplásticos. O enxerto autólogo ou autotransplante é o padrão ouro da enxertia, pois utiliza osso do próprio paciente, portanto não há problemas de rejeição, entretanto apenas uma pequena quantidade de osso é conseguida, o que inviabiliza a restauração de grandes perdas ósseas, além do problema da realização de dois sítios cirúrgicos no paciente, o que aumenta a morbidade. O aloenxerto utiliza osso de outros indivíduos da mesma espécie, e como desvantagens há o perigo de rejeição, transmissão de doenças e a escassez de osso disponível para transplante. O xenoenxerto utiliza enxerto de outra espécie, onde há a possibilidade de rejeição e transmissão de doenças (LIU *et al*, 2007). Os enxertos aloplásticos ou biomateriais são a alternativa mais versátil

e passível de desenvolvimento, pois apresentam possibilidades ilimitadas de manipulação das estruturas e propriedades e suas interações com os sistemas vivos oferecem grandes oportunidades de concretização de várias metas associadas à reconstrução de tecidos e órgãos afetados por patologias ou outros tipos de falhas (ORÉFICE *et al*, 2006).

3.2 Biomateriais

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

Os biomateriais devem ser a matriz que auxilia ou melhora a própria capacidade regenerativa do corpo. A matriz para a engenharia de tecidos deve fornecer um modelo e suporte para crescimento tecidual. Uma matriz ideal deve ser um material macroporoso com duas importantes características: uma rede interconectada com macroporos (maiores que 100µm) para permitir crescimento de tecido para o interior do material e difusão adequada de nutriente ao centro do tecido regenerado; e possuir poros na faixa de microporos (100 µm a 50nm) e mesoporos (50 a 2 nm) para promover adesão celular, adsorção de metabólitos biológicos e reabsorção a taxas controladas acompanhando o reparo do tecido (SEPULVEDA *et al*, 2002; JONES & HENCH, 2003).

As estruturas tridimensionais porosas devem funcionar como suporte mecânico, além de permitir a penetração dos vasos sanguíneos adjacentes, proporcionando a nutrição das células colonizadoras. Algumas características intrínsecas são fundamentais ao se considerar o emprego de um determinado biomaterial *in vivo*: biocompatível, biofuncional, não citotóxico nem carcinogênico, estabilidade química, estabilidade mecânica adequada, peso, densidade e formato adequados, passível de ser esterilizado e boa relação custo/benefício. Ainda, deve ter o potencial de ser reprodutível

comercialmente através das aprovações da *International Standards Organization* (ISO) ou *Food and Drug Administration* (FDA) (JONES & HENCH, 2003).

Algumas propriedades de matrizes biocompatíveis que devem ser levadas em consideração incluem transporte adequado de fluidos, degradação do material, superfície química reconhecida pela célula, integridade mecânica e habilidade de induzir sinais de transdução nas células. Estas propriedades ditam a aderência celular, o transporte de nutrientes e metabólitos, diferenciação celular, síntese e organização da matriz (DAWSON, 2008).

O biomaterial deve apresentar as propriedades mecânicas apropriadas para substituir o tecido danificado. A intensidade de estímulo mecânico suportada pelo biomaterial é dependente da porosidade, tamanho e formato de poro e das propriedades do material (LACROIX *et al*, 2006; JONES *et al*, 2009a).

As propriedades mecânicas intrínsecas de um biomaterial são de significativo interesse desde que influenciam as forças exercidas pelas células sobre seu substrato. As MSC são altamente sensíveis e respondem a estimulação mecânica *in vitro*. Especula-se que o estímulo mecânico ative receptores da superfície celular e locais de adesão focal, que por sua vez desencadeiam cascatas sinalizadoras intracelulares. Essas reações levam à ativação de genes específicos que modulam a secreção de matriz extracelular. A diferenciação de MSC é influenciada tanto pelas propriedades físicas do microambiente, como estresse mecânico cíclico aplicado diretamente sobre as células, quanto pelas propriedades inerentes do biomaterial, como integridade, cristalinidade, micro e macroporosidade (ALTMAN *et al*, 2002; ENGLER *et al*, 2006; DAWSON *et al*, 2008).

Dentre as classes de biomateriais existentes: metais, cerâmicas e polímeros, os dois últimos têm sido mais utilizados para a confecção de matrizes para a engenharia de tecido ósseo.

Os polímeros sintéticos e naturais têm sido usados e testados em uma série de aplicações ligadas à engenharia de tecidos. Os aspectos que têm incentivado o uso

desses materiais são: processo de biodegradação conhecido, capacidade de produção de porosidade específica e extensa, flexibilidade de enxertia de grupamentos químicos específicos ou macromoléculas de origem biológica (ORÉFICE *et al*, 2006). Dentre os materiais poliméricos sintéticos utilizados em aplicações biomédicas, alguns apresentam desvantagens como pobre bioatividade do poli(etileno glicol) (PEG), sub-produtos ácidos do poli(ácido lático) (PLA) e poli(ácido lático glicólico) (PLGA) (DAWSON, 2008).

Recentemente, matrizes de polímeros reabsorvíveis foram desenvolvidas com estrutura de poros similar ao osso trabecular, entretanto polímeros não podem se ligar ao osso e não estimulam genes das células ósseas. Também possuem um modulo de elasticidade muito menor que o do osso e não podem ser usados diretamente em aplicações de carregamento mecânico (JONES & HENCH, 2003).

Os materiais cerâmicos são considerados uma boa alternativa como matrizes para engenharia de tecido ósseo. Dentre as biocerâmicas, a hidroxiapatita sintética (HA) e o fosfato tricálcio (TCP) têm sido bastante utilizados como materiais de preenchimento para enxerto ósseo em aplicações ortopédicas e maxilofaciais. Ambos são classificados como materiais bioativos Classe B, são osteocondutores e se ligam ao tecido ósseo, entretanto não são osteoprodutores e também não se ligam aos tecidos moles conectivos (JONES & HENCH, 2003), além de reabsorverem lentamente (OONISHI, 1997).

Vidro Bioativo

Os vidros bioativos, devido às suas interessantes propriedades do ponto de vista biológico, têm sido amplamente pesquisados e relacionados com a cultura de osteoblastos (XYNOS *et al*, 2000; JELL *et al*, 2008). Um aspecto que os torna diferentes de outras biocerâmicas é a possibilidade de se controlar suas propriedades químicas e suas ligações com os tecidos, sendo possível obter vidros com propriedades específicas para uma aplicação particular.

Os componentes básicos da maioria dos vidros bioativos são SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 (HENCH, 1988) e existem dois tipos de vidro bioativo: um produzido pela rota tradicional de fusão dos precursores do vidro e outro produzido pela rota sol-gel.

O processo sol-gel consiste em um método físico-químico de síntese de óxidos cerâmicos em que ocorre a evolução de um sol (dispersão líquida de partículas coloidais que são partículas sólidas de diâmetro inferior a 100nm) para um material poroso, onde partículas maiores interconectam-se para formar uma rede sólida semelhante a uma esponja. Esse processo diferencia-se em relação aos demais pela possibilidade de preparação de géis com o mesmo grau de homogeneidade da solução inicial. Outra vantagem que contribui para o crescente interesse do método sol-gel é a facilidade de modelar os géis, permitindo a obtenção de corpos cerâmicos com formato pré-definido (PEREIRA et al, 1994; PEREIRA et al, 2005).

Os vidros produzidos pelo processo sol-gel apresentam elevada bioatividade quando comparados ao método tradicional de preparo (LI, 1991; SARAVANAPAVAN et al, 2003). Essa elevada bioatividade está relacionada com a alta área superficial específica e grande concentração de grupos silanol sobre a superfície do material microporoso, o que aumenta a nucleação e cristalização heterogênea de hidroxiapatita carbonatada (HCA) sobre o material (PEREIRA, 1994). Além disso, a estrutura de poros obtida pelo método sol-gel é similar ao osso trabecular humano, com o diâmetro de macroporos na faixa de 300-600 μm e poros interconectados com diâmetros maiores que 100 μm (JONES *et al*, 2007).

Os vidros bioativos são materiais baseados em sílica amorfa e apresentam características de um material Classe A em bioatividade: osteoindutores, osteocondutores, apresentam rápida ligação ao tecido ósseo e também se ligam aos tecidos moles conectivos através da adesão do colágeno à superfície do vidro (HENCH,1997). As propriedades osteogênicas dos vidros têm sido atribuídas à liberação de sílica solúvel e de íons cálcio durante a dissolução (YUE, 2011).

Os vidros bioativos possuem boa aplicação como matriz para engenharia de tecidos, em especial para engenharia de tecidos mineralizados. Quando implantados no corpo, suscitam uma resposta biológica específica na interface do material, que resulta na formação de uma ligação entre o tecido e o material (OONISHI et al, 2000). Essa união com o tecido ósseo se dá a partir da formação de uma camada de HCA na superfície do vidro em contato com fluidos corpóreos. A HCA formada é equivalente quimicamente e estruturalmente à fase mineral do osso, o que acarreta uma forte união entre ambos (PEREIRA et al, 2005). As reações que ocorrem até a formação da camada de HCA podem ser resumidas em:

1. Lixiviação e formação de grupos silanol (Si-OH);
2. Perda de sílica solúvel (Si(OH)_4) e formação de silanol;
3. Policondensação de silanois para formar um gel de sílica hidratada;
4. Formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfa;
5. Cristalização de uma camada de hidroxiapatita carbonatada.

É importante que uma camada de sílica-gel se forme na superfície para que ocorra a nucleação e cristalização da hidroxiapatita (PEREIRA, 1996). Esses cinco estágios de reação que ocorrem na interface implante-tecido podem ser testados *in vitro* na presença de SBF ou meio de cultura de células.

Além dessas reações, outros eventos celulares acontecem após a formação da camada de HCA (HENCH, 1993):

6. Adsorção de fatores de crescimento na camada de HCA formada;
7. Ação de macrófagos;
8. Adesão das células-tronco;
9. Diferenciação de células-tronco;
10. Geração da matriz óssea;
11. Cristalização da matriz;
12. Proliferação e crescimento do osso.

Outra importante característica dos vidros bioativos é que quando em contato com fluidos corpóreos ou em soluções fisiológicas, eles rapidamente liberam sílica, devido a

trocas iônicas com H^+ e H_3O^+ , causando alcalinização do meio. A alteração na concentração de H^+ pode influenciar profundamente o metabolismo celular, pois ocorre um aumento do pH do meio, o que no caso dos osteoblastos parece ser favorável, pois recentes pesquisas demonstraram aumento da proliferação celular (HENCH, 1998). É sabido que a produção de colágeno tipo I é aumentada em meios alcalinos. Outros estudos demonstraram que produtos iônicos provenientes da dissolução de vidro bioativo com a composição de 60% SiO_2 -36% CaO -4% P_2O_5 aumentaram a proliferação e a secreção de colágeno em osteoblastos (REFFITT *et al*, 2003).

Além disso, outra importante descoberta para o desenvolvimento da medicina regenerativa é que os produtos de dissolução dos vidros bioativos exercem um controle genético sobre o ciclo celular de osteoblastos e rápida expressão de genes que regulam a osteogênese e a produção de fatores de crescimento (XYNOS *et al*, 2000a; XYNOS *et al*, 2000b; PATEL *et al*, 2002). Foi descoberto que o silício é o maior colaborador na mineralização do osso e na ativação de genes. Resultados *in vivo* mostraram que o crescimento ósseo para o interior da matriz de HA com silício é maior que da HA pura (XYNOS *et al*, 2000c).

Experimentos realizados com vidro bioativo produzido pelo processo tradicional e pelo processo sol-gel induziram um controle sobre os genes que codificam a transcrição de proteínas que controlam o ciclo celular, proliferação e a diferenciação das células para expressar o fenótipo de células osteoblásticas maduras mesmo sem a presença de qualquer adição de proteínas para o crescimento ósseo, como a dexametasona ou BMP (proteína morfogenética do osso). As alterações no ciclo celular dessas células foram observadas inicialmente antes de 6 horas de experimento, com a eliminação (por apoptose) de células incapazes de diferenciação e as células remanescentes exibiam capacidade melhorada para síntese e mitose. A análise de uma variedade de genes após 48 horas de experimento mostrou precoce ativação de sete famílias dos genes que favorecem a proliferação e diferenciação de osteoblastos maduros (HENCH, 2008).

A matriz porosa de vidro bioativo é uma opção na substituição óssea, pois possui características que favorecem a regeneração. Como um material osteocondutor, fornece

uma matriz tridimensional que permite a agregação, multiplicação e diferenciação de células ósseas. Ainda possui redes de macroporos interconectados com diâmetro maior que 200µm, permitindo assim a penetração de células, o crescimento celular interno, a vascularização e a nutrição do tecido (JONES & HENCH, 2004; PEREIRA, 2005). O vidro bioativo adere ao tecido hospedeiro sem a formação de cicatriz e é reabsorvido concomitantemente à formação do tecido ósseo, além disso, seus produtos de degradação são atóxicos (JONES & HENCH, 2003).

Alguns estudos com o vidro bioativo no NDBio-UFMG foram realizados associando o vidro bioativo ao plasma rico em plaquetas, cujos resultados mostraram reparo ósseo adequado e precoce (DUTRA, 2006) e ensaios biomecânicos e *in vitro* com culturas de osteoblastos, cujos resultados foram boa capacidade osteogênica, processo acelerado de crescimento ósseo e ausência de citotoxicidade (VALERIO *et al*, 2004; PEREIRA *et al*, 2005; VALERIO *et al*, 2005; OLIVEIRA, 2007).

Quando as células ósseas se aderem a um substrato sólido, o seu comportamento e função dependem das propriedades do biomaterial. As características superficiais e topografia, a superfície química e tratamento, bem como as características de degradação do biomaterial afetam a viabilidade celular, adesão e expansão, e também influenciam a adsorção de moléculas biológicas secretadas pelas células ósseas capazes de formar uma matriz extracelular, que por sua vez, ativam receptores da superfície celular e proteínas intracelulares envolvidas na transdução de sinais. Outro aspecto importante é a capacidade do biomaterial para adsorver biomoléculas secretadas pelas células ósseas ou sofrer modificação de forma que estas biomoléculas farão parte da superfície do biomaterial (SIKAVITSAS *et al*, 2001).

A engenharia de tecidos é uma área de pesquisa cujo objetivo é combinar células e moléculas bioativas a uma matriz estrutural de modo a formar um construto capaz de promover a regeneração de tecidos (LANGER & VACANTI, 1999). As propriedades intrínsecas dos biomateriais são associadas às propriedades das células-tronco mesenquimais, propiciando uma reconstituição óssea mais adequada (CANCEDDA *et al*, 2003).

3.3 Células-Tronco para Engenharia de Tecido Ósseo

As células-tronco possuem capacidade de auto-renovação, viabilidade duradoura e potencial multilinhagem, ou seja, se diferenciam em qualquer tipo celular especializado. Estas células encontram-se presentes em uma variedade de tecidos e podem ser classificadas em três grandes grupos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células totipotentes são capazes de gerar um organismo completo, como exemplo o ovócito fecundado e as células do blastômero. As pluripotentes são derivadas do interior da massa celular de um blastócito e podem se diferenciar nos três folhetos embrionários. E as multipotentes diferenciam-se em um dos três folhetos embrionários (CAPLAN & BUDER, 2001).

O corpo humano armazena vários tipos de células progenitoras. Estas células estão presentes em uma variedade de tecidos durante o seu desenvolvimento e podem ser divididas em três grandes grupos: células-tronco embrionárias, hematopoiéticas e mesenquimais. A obtenção, cultivo e manipulação de células-tronco embrionárias humanas geram questionamentos éticos (CAPLAN & BUDER, 2001), além de apresentarem ilimitado potencial de diferenciação, o que poderia gerar diferenciação espontânea no organismo após implantação e o desenvolvimento de um tipo de tumor chamado teratoma (DAWSON *et al*, 2008). As de origem hematopoiéticas (HSC) são responsáveis pela renovação do sangue e do sistema imune, podem ser isoladas da medula óssea, do sangue ou do cordão umbilical. As células-tronco mesenquimais (MSC) estão presentes em uma variedade de tecidos durante o desenvolvimento e, em adultos, elas prevalecem na medula óssea. Estas células podem ser facilmente isoladas, expandidas em cultura e estimuladas para se diferenciarem em osso, cartilagem, músculo, tendões, gordura e uma variedade de outros tecidos conectivos (Figura 3.2) (CAPLAN & BUDER, 2001; DAWSON, 2008), além de células não mesenquimais representadas pelas células neurais e epiteliais (TAE, 2006). As células de tecidos adultos mantêm a capacidade de sofrer diferenciação ao longo de percursos diferentes daqueles que elas foram determinadas a seguir (CANCEDDA *et al*, 2003).

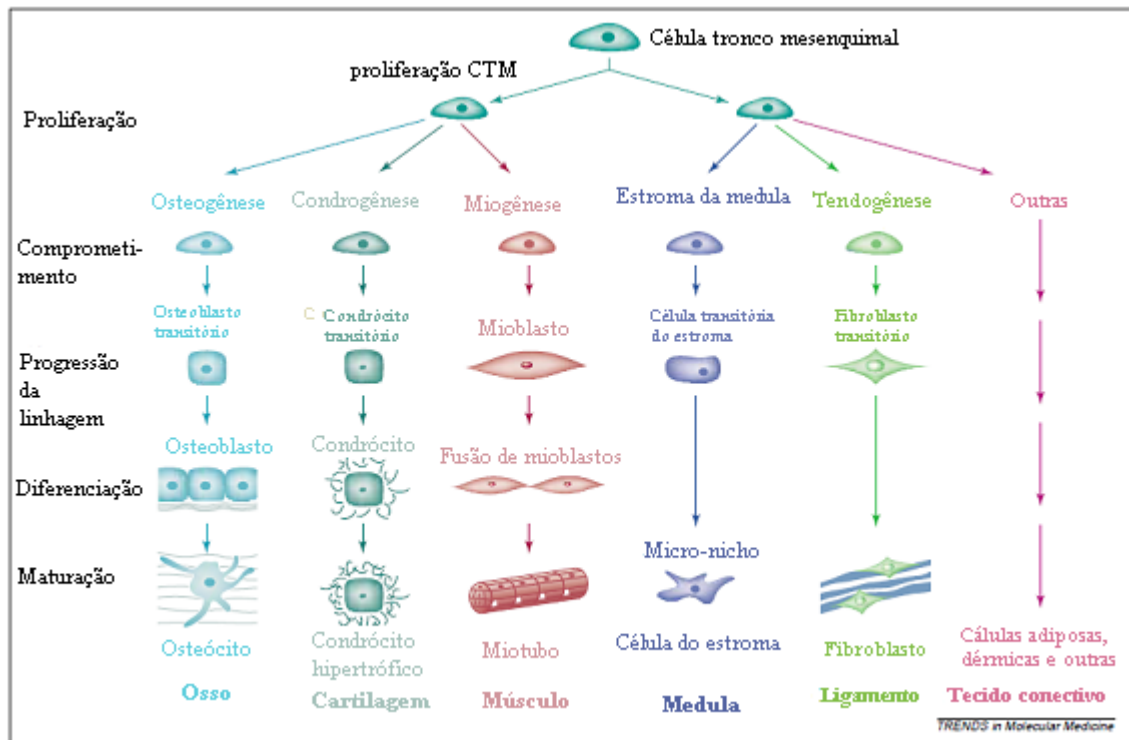


Figura 3. 2: As transições celulares da célula-tronco mesenquimal em alguns fenótipos altamente diferenciados (adaptada de CAPLAN & BUDER, 2001; CAPLAN, 2009).

De acordo com o Comitê da Sociedade Internacional para Terapia Celular, os quatro critérios mínimos para definir a célula-tronco mesenquimal humana são:

1. Aderência ao plástico quando mantida sob condições padrões de cultura;
2. Capacidade para diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica;
3. Expressar marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105;
4. Não expressar marcadores da linhagem hematopoiética c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 α e antígeno leucocitário humano (HLA)-DR (SCHÄFFLER, 2007).

Para o sucesso na reparação de um grande defeito ósseo através da engenharia de tecidos, é fundamental alcançar uma grande quantidade de células funcionais a serem semeadas em uma matriz. Devido à limitação da quantidade de células autólogas da medula óssea, extensiva cultura *in vitro* é rotineiramente necessária para alcançar uma dose terapêutica de células. O longo prazo de cultivo *in vitro* não é bom para manter a estabilidade genômica das células, portanto, é de grande interesse encontrar uma fonte

alternativa de células que seja abundante e de fácil acesso, fácil de expandir em cultura e possua potencial para diferenciação osteogênica (SHI *et al*, 2005; CUI *et al*, 2007).

O tecido adiposo tem uma notável capacidade de sofrer alterações consideráveis em termos de volume durante a vida de um indivíduo, mediadas através da geração de novos adipócitos, acompanhada por expansão coordenada e remodelamento da vasculatura adiposa (FRASER, 2006). Estas mudanças são mediadas por uma população de células-tronco e progenitoras dentro do tecido adiposo. Esse contém uma população de células multipotentes com propriedades semelhantes, embora não idênticas, às células tronco mesenquimais da medula óssea (ZUK *et al*, 2002; RODRIGUEZ *et al*, 2005a; RODRIGUEZ *et al*, 2005b)

Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo

Esta população de células-tronco no tecido adiposo é referida como células-tronco do tecido adiposo (ASC) de acordo com a Sociedade Internacional de Tecnologia Adiposa Aplicada, que identifica essa população celular como multipotente e aderente ao plástico (GIMBLE *et al*, 2007).

A facilidade de coleta, o grande número de células e a rápida expansão *in vitro* são, portanto, vantagens bastante atrativas das ASC sobre as MSC quando da contemplação de estratégias clínicas. As próprias células do paciente poderiam ser coletadas com o mínimo de desconforto, expandidas em cultura, semeadas dentro de uma matriz a ser implantada no local do defeito ósseo (COWAN *et al*, 2004; FRASER, 2006; SCHÄFFLER, 2007; GIMBLE *et al*, 2007).

A frequência e o rendimento estimado de MSC da medula óssea está entre 1 em 50.000 e 1 em 100.000 que corresponde a poucas centenas de MSC por mililitro de medula. Em contrapartida, o tecido adiposo produz uma população celular da ordem de 1 em 100 - cerca de 500 vezes mais do que a encontrada na medula (FRASER, 2006; MITCHELL *et al*, 2006). Isto se reflete na obtenção de uma cultura que atinge confluência dentro de 5 a 7 dias (FRASER, 2006).

Além disso, em cultura, ambas as populações celulares expressam marcadores de superfície semelhantes, incluindo CD105, SH3, STRO-1, CD90 e CD44, e não expressam o marcador hematopoético CD45, nem a marcador endotelial CD31 (RODRIGUEZ *et al*, 2005a; PUISSANT *et al*, 2005; MITCHELL *et al*, 2006; LINDROOS *et al.*, 2011).

Resultados de caracterização molecular e bioquímica mostraram que células do lipoaspirado processado e linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas derivadas de células- tronco do tecido adiposo humano (hASC) expressam vários genes, cuja expressão é observada em linhagens específicas do mesoderma, como osteogênica e condrogênica, e proteínas similares àquelas observadas em MSC (HALVORSEN *et al*, 2001; ZUK *et al*, 2002; GIMBLE & GUILAK, 2003; STREM *et al*, 2005).

Em relação às propriedades imunológicas, tanto as ASC quanto as MSC possuem a habilidade de suprimir uma reação de linfócitos mistos de uma maneira dose e tempo-dependente (PUISSANT *et al*, 2005), além disso as ASC são imunoprivilegiadas tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (RODRIGUEZ *et al*, 2005).

Quando cultivadas em meios apropriados, as ASC são capazes de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos, células endoteliais (Figura 3.3) (PUISSANT *et al*, 2005; ZONARI, 2010; PAULA, 2011) e também apresentam potencial para diferenciação em cartilagem, tendão e músculo esquelético sob condições específicas (SCHÄFFLER, 2007).

O potencial osteogênico das hASC foi demonstrado em culturas de monocamadas (HALVORSEN *et al*, 2001; ZUK *et al*, 2001; LINDROOS *et al.*, 2011), e sobre várias matrizes tridimensionais incluindo colágeno (KAKUDO *et al*, 2008), poli(ácido láctico-glicólico) (LEE *et al*, 2008), beta fosfato tricálcio (HATTORI *et al*, 2006), matrizes reabsorvíveis cobertas com apatita (COWAN *et al*, 2004), hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HICOK *et al*, 2004); matriz de coral (CUI *et al*, 2007). E estudos em animais demonstraram formação óssea pelas hASC implantadas subcutaneamente (HATTORI *et*

al, 2006), em defeitos na calvária (DUDAS *et al*,2006) e defeitos mandibulares (ABUKAWA *et al*,2004).

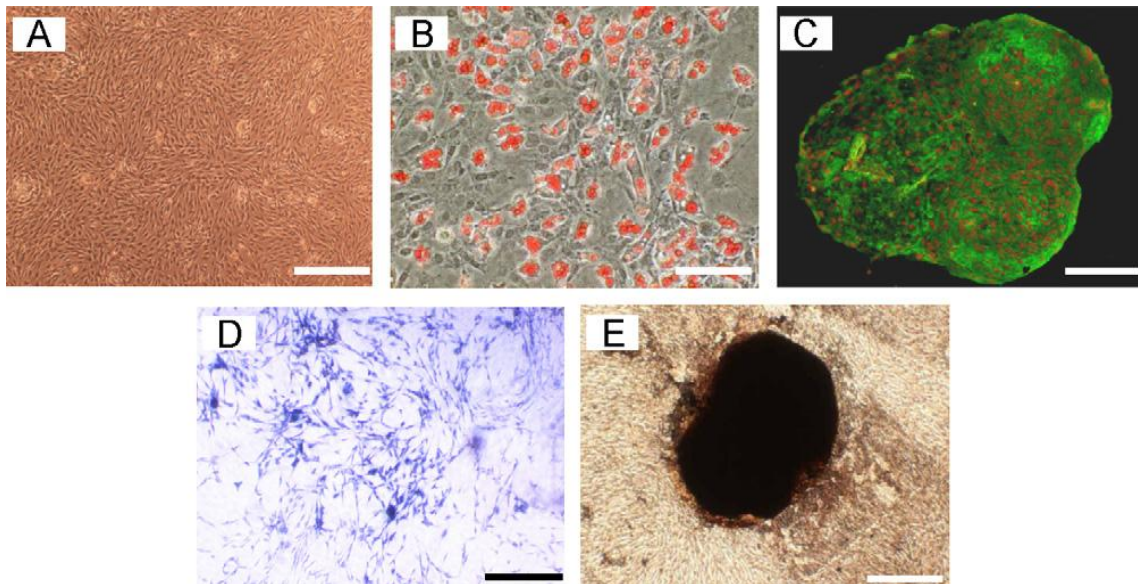


Figura 3. 3: Morfologia e diferenciação em multilinhagem das ASC. (A) ASC primárias exibem morfologia como fibroblasto; (B) diferenciação adipogênica; (C) diferenciação condrogênica; (D) diferenciação osteogênica pela ensaio de fosfatase alcalina e (E) deposição de matriz celular pelo método von Kossa (CUI *et al*, 2007).

Em um estudo, foi observado que pré-adipócitos cresceram sobre matrizes de coral sem qualquer adição de indutores da morfogênese óssea e se diferenciaram em células formadoras de osso. Os resultados sugerem que a topologia tridimensional ou os parâmetros de superfície da matriz podem facilitar a transdiferenciação de pré-adipócitos ao fenótipo osteogênico (BIRK *et al*, 2006).

Outro estudo relatou uma forte influência da rigidez do microambiente sobre a diferenciação de células-tronco. As MSC se adaptaram em relação à morfologia e linhagem às matrizes com diferentes módulos de elasticidade. Os resultados mostraram produção muito baixa de colágeno I em matrizes com baixa rigidez, enquanto que em matrizes rígidas, as MSC secretaram maior quantidade de colágeno. Dessa forma, os resultados sugerem a necessidade de otimizar a elasticidade da matriz para promover a regeneração, pois o microambiente se mostrou importante na diferenciação das células-tronco (Figura 3.4) (ENGLER *et al*, 2006).

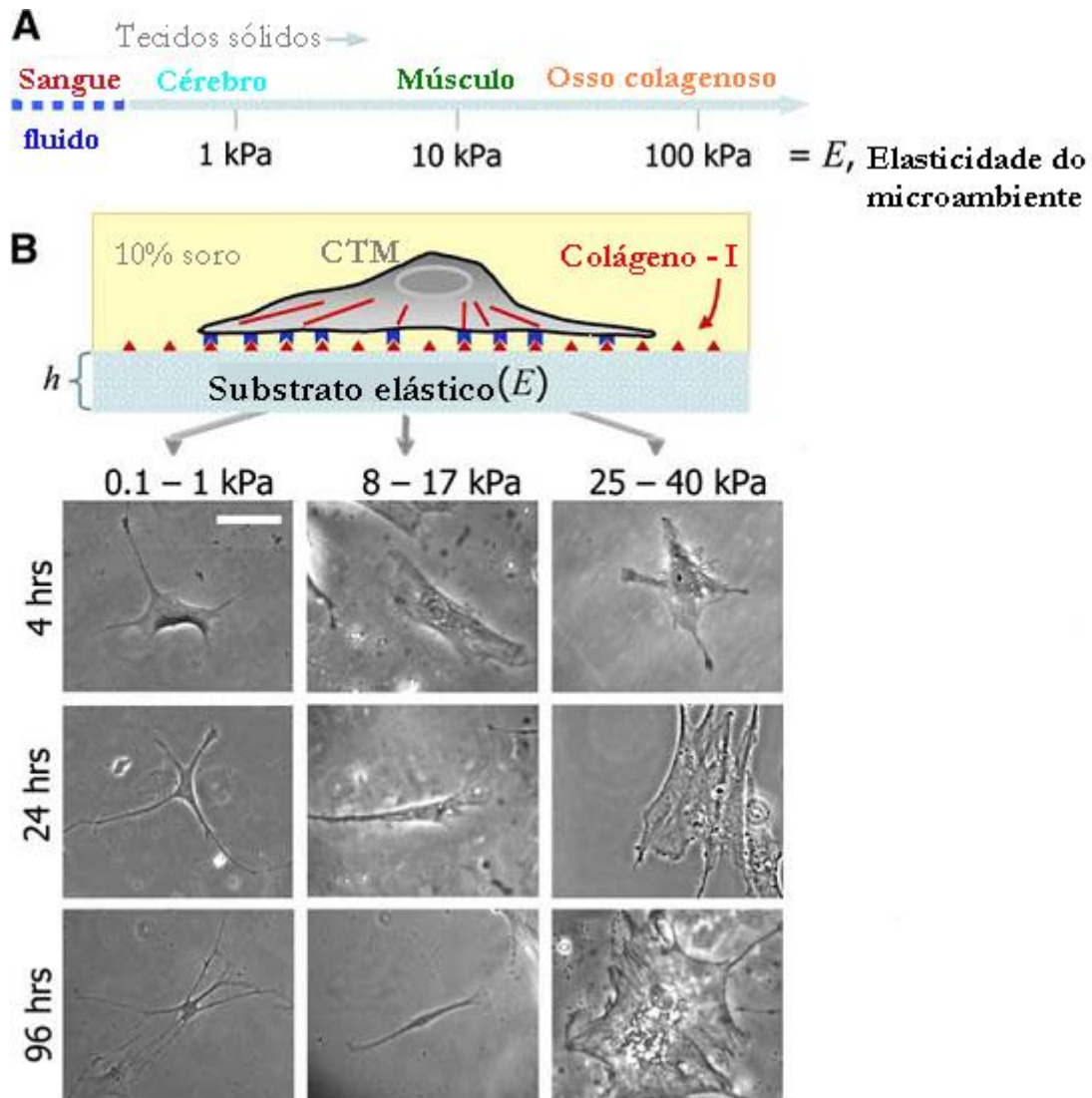


Figura 3. 4: A relação entre a elasticidade de tecidos e diferenciação de MSC. (A) tecidos sólidos apresentam uma gama de rigidez, medida através do módulo de elasticidade E . (B) as MSC desenvolvem formas ramificada, de fusos, ou poligonais cultivadas respectivamente em matrizes no intervalo típicos do $E_{\text{cérebro}}$, $E_{\text{músculo}}$ ou matrizes rígidas de colágeno (adaptada de ENGLER *et al*, 2006).

Um aspecto fundamental do desenvolvimento da engenharia de tecidos diz respeito ao desenvolvimento de novos modelos biológicos, imprescindíveis para a geração de tecidos. O entendimento do papel regulatório de parâmetros físico-químicos específicos de cultivo no desenvolvimento do tecido é um dos obstáculos para a geração de tecidos funcionais e seu uso clínico. Possibilitando mudanças e controle reprodutíveis dos fatores ambientais específicos, sistemas de biorreatores provêm os meios tecnológicos

para entendimento dos mecanismos fundamentais de função celular num ambiente tridimensional, e o potencial para melhorar a qualidade dos tecidos obtidos pela engenharia de tecidos convencional.

Portanto, com o intuito de estabelecer a funcionalidade do construto antes da implantação, a engenharia de tecido funcional visa o crescimento de um tecido tridimensional completo *in vitro* e sua implantação após alcançar a maturidade. Os ingredientes para a Engenharia de Tecido Funcional são: i) as células capazes de se diferenciarem nas linhagens adequadas, ii) uma matriz que forneça o modelo estrutural para o desenvolvimento do tecido, e iii) o biorreator que guia a diferenciação celular e o desenvolvimento do tecido pelo fornecimento de sinais regulatórios químicos e físicos apropriados (FREED & VUNJAK-NOVAKOVIC, 2000; ALTMAN *et al*, 2002).

E nesse contexto, a obtenção de construtos ósseos viáveis para o uso em humanos requer os seguintes componentes: fontes humanas de células osteogênicas, matrizes tridimensionais adequadas, sistemas de cultura em biorreator e integração funcional do construto gerado com o receptor (FRÖLICH *et al*, 2010).

3.4 Biorreator para Cultivo Celular Tridimensional

A abordagem mais fundamental da engenharia de tecidos é orientar a organização de células metabolicamente ativas em matrizes tridimensionais e estabelecer as condições microambientais de tal ordem que as células sejam induzidas a reconstruir tecidos funcionais. Os biorreatores são as principais ferramentas para mimetizar os microambientes celulares e fornecer construtos celulares com estímulos fisiologicamente relevantes que direcionem a conversão de um "conjunto de células" em um determinado tecido (FRESHNEY *et al*, 2007).

O conceito de biorreator pode ser definido como um dispositivo dentro do qual processos biológicos e bioquímicos se desenvolvem sob um ambiente controlado e monitorado e condições operacionais fisiológicas como pH, temperatura, pressão, suprimento nutricional e remoção de resíduos (MARTIN *et al*, 2005).

Além de permitir uma maior eficiência de semeadura e nutrição das células, o uso de biorreatores adequadamente projetados pode permitir a aplicação de forças mecânicas, reconhecidamente importantes como moduladoras da fisiologia celular e reduzir os riscos associados com o manuseio e transferência dos construtos. Estes fatores associados podem melhorar a proliferação, diferenciação celular e a deposição de matriz extracelular (MARTIN *et al*, 2005).

Os requisitos para um biorreator ideal são, além de modular o transporte de massa - que é absolutamente essencial tanto para o fornecimento de nutrientes, quanto para a eliminação de resíduos - permitir o desenvolvimento de estratégias confiáveis e eficientes de semeadura de células para uma distribuição celular uniforme no interior de grandes matrizes, condicionamento mecânico para as células e culturas de tecido automatizadas e controladas, necessárias para a fabricação reprodutível e confiável de construtos para a engenharia de tecidos, cumprindo com os requisitos de práticas adequadas de manufatura (MARTIN *et al*, 2005).

Vários sistemas de biorreatores têm sido desenvolvidos e testados para obtenção de diferentes tipos de tecidos, variando em complexidade, nível e tipo de forças aplicadas, aumento da eficiência de transporte de massa e automatização. Dentre os sistemas mais comumente utilizados estão o frasco com agitação (*spinner-flask*), o vaso de parede giratória (*rotating wall vessel*) e os de perfusão direta (*flow perfusion*) (MARTIN, 2004).

O biorreator mais simples é o frasco com agitação, onde as matrizes são suspensas na tampa de um frasco e uma barra de agitação induz correntes de convecção no meio que envolve a matriz. O biorreator de parede giratória produz resultados similares através da queda constante da matriz dentro de uma câmara em rotação preenchida com meio de cultura. Finalmente, o biorreator de perfusão direta bombeia fluido através da matriz porosa, permitindo assim a disponibilidade de meio de cultura fresco ao interior da matriz e remoção de resíduos celulares do interior da matriz (Figura 3.5) (ALLORI *et al*, 2008).

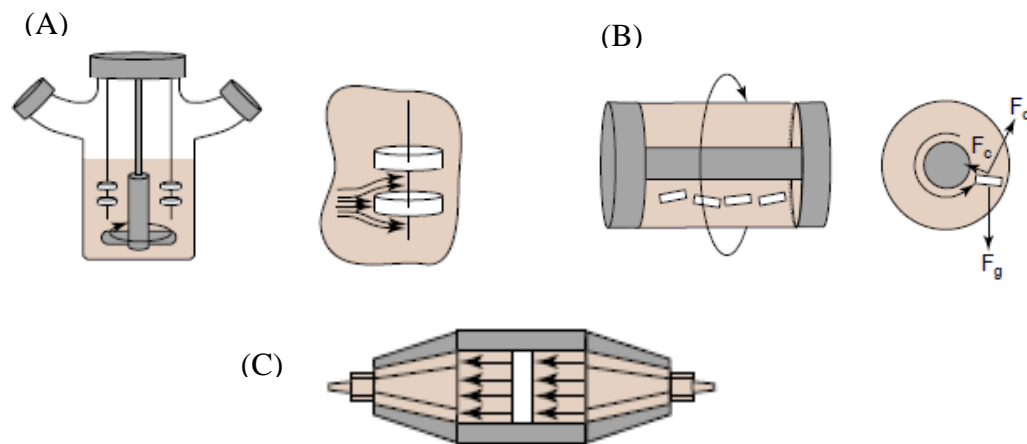


Figura 3. 5: Tipos de biorreatores. (A) Biorreator frasco com agitação; (B) reator simples de parede giratória, (C) biorreator de perfusão direta (MARTIN *et al*, 2004).

A semeadura de grandes densidades de células dentro da matriz de uma maneira eficiente e uniforme é outro importante aspecto que dita o desenvolvimento de biorreatores para aplicações na engenharia de tecidos, especialmente no caso de grandes construtos (MARTIN *et al*, 2005; JANSSEN *et al*, 2006).

Biorreator de Perfusão Direta

Os sistemas de perfusão direta permitem integrar o processo de semeadura e de cultivo celular, leva a uma maior eficiência de semeadura e maior homogeneidade de distribuição de células. Estudos demonstraram que biorreatores de perfusão direta aumentaram significativamente a diferenciação e proliferação de osteoblastos, super-regulação de fatores angiogênicos e osteogênicos e produção de matriz mineralizada por células ósseas (MARTIN *et al*, 2004; WENDT *et al*, 2003; WANG *et al*, 2003; BANCROFT *et al*, 2002).

Embora o sistema de perfusão tenha sido inicialmente concebido para melhorar o transporte químico aos construtos tridimensionais, o movimento do fluxo ainda transmite uma força de cisalhamento do fluido sobre as células alojadas na matriz, um processo muito semelhante ao fluxo de fluidos fisiológico observado no osso nativo (ALLORI *et al*, 2008).

Através da investigação dos efeitos de convecção no crescimento ósseo dentro de matrizes de biomateriais, supondo que a convecção do meio pudesse superar as limitações difusionais encontradas durante a cultura estática de grandes matrizes e fornecer estímulo mecânico capaz de aumentar a formação óssea (GOLDSTEIN *et al*, 2001; BANCROFT *et al*, 2003), sistemas de perfusão de fluxo demonstraram ser o mais apropriado método para alcançar esses efeitos e foram projetados especificamente para aplicações na engenharia de tecido ósseo (BANCROFT *et al*, 2003).

As MSC cultivadas em matrizes tridimensionais sob perfusão de fluxo demonstraram: (i) acelerada proliferação ao final da primeira semana de cultura, (ii) aumento na deposição mineral ao final do período de 16 dias de cultura e (iii) melhor distribuição espacial da MEC depositada. Comparados com os resultados da cultura estática, o biorreator acelerou os estágios iniciais do crescimento celular e diferenciação do fenótipo osteoblástico (SIKAVITSAS *et al*, 2005).

Acredita-se que o cisalhamento hidrodinâmico induzido pelo biorreator simula o fluxo intersticial nos espaços canaliculares durante a formação óssea natural associada à carga de compressão. Os biorreatores ósseos atuais são projetados para direcionar o fluxo do meio de cultura através dos construtos, a fim de expor todas as células ao cisalhamento (BANCROFT *et al*, 2002; SIKAVITSAS *et al*, 2003; BRACCINI *et al*, 2005; HOLTORF *et al*, 2005; FRESHNEY *et al*, 2007, FRÖLICH *et al*, 2010).

Resultados de um estudo com ASC em cultura 2D e 3D mostraram que 5 dias em sistema de perfusão de cultura foram suficientes para alcançar propriedades osteogênicas reprodutíveis. Este resultado sugere a possibilidade de um específico comprometimento osteogênico transmitido pela exposição ao cisalhamento induzido pelo fluido, pelo estabelecimento de interações 3D célula-célula ou pela combinação desses fatores (SCHERBERICH *et al*, 2007).

As células *in vivo* são submetidas constantemente ao estresse de cisalhamento por fluido e deformação mecânica, o que influencia as interações e respostas celulares (DAWSON *et al*, 2008). As forças mecânicas são parte integral da fisiologia óssea que regula a

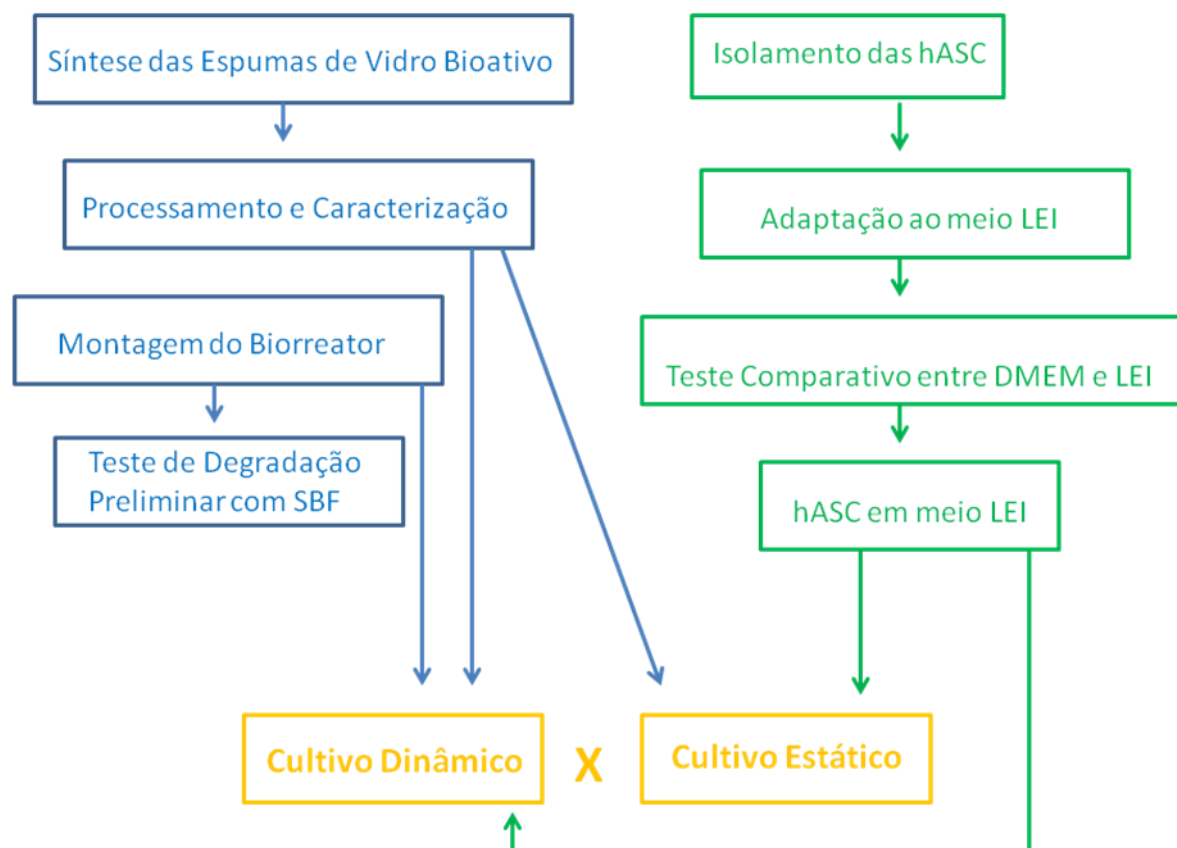
homeostase, remodelagem e reparo ósseo. Poucos estudos aplicam deformação mecânica para explorar seu papel na promoção do crescimento celular e organização tecidual (ALLORI *et al*, 2008). O carregamento dinâmico é necessário para simular o correto microambiente para determinados tipos celulares (FRESHNEY *et al*, 2007). Além disso, o fluxo deve ser tal que não acelere a degradação da matriz e nem remova células viáveis e matriz extracelular depositada (MARTIN *et al*, 2004).

A presença da tensão de cisalhamento do fluido no biorreator de perfusão de fluxo foi considerada suficiente para induzir diferenciação de células do estroma da medula em osteoblasto, na ausência de dexametasona (HOLTORF *et al*, 2005). Embora a dexametasona e a tensão de cisalhamento em conjunto tenham um efeito sinérgico sobre a diferenciação celular, uma série de estudos tentou determinar a utilidade da cultura dentro do biorreator de perfusão de fluxo no sentido de diferenciar as células na ausência de suplementos de meio osteogênico (KRETLOW & MIKOS, 2007). Alguns resultados demonstraram que a mecanoestimulação de células-tronco da medula, mesmo na ausência de estímulo biológico, pode ser suficiente para induzir algumas características de um fenótipo diferenciado. Além disso, os resultados enfatizam que os estímulos mecânicos trabalham sinérgicamente com sinais biológicos para melhorar a expressão do fenótipo osteoblástico e melhorar a funcionalidade de construtos ósseos para a engenharia de tecidos (HOLTORF *et al*, 2005).

Entretanto, é importante destacar um estudo semelhante ao realizado neste trabalho que investigou a capacidade das hASC em formarem enxertos ósseos quando cultivadas em matriz óssea descellularizada, com perfusão de meio de cultura basal e suplementado com fatores osteogênicos. Os resultados mostraram que as hASC dos construtos cultivados em meio osteogênico exibiram a presença de colágeno e osteopontina após 2 semanas de cultura, já os construtos cultivados em meio basal de maneira estática ou dinâmica não exibiram a presença de proteínas ósseas, mostrando que o fluxo do biorreator não foi suficiente para induzir a diferenciação de hASC cultivadas por 5 semanas (FRÖLICH *et al*, 2010).

4. Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biomateriais da Escola de Engenharia e no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas através de uma interação multidisciplinar entre essas duas unidades acadêmicas da UFMG. Os principais tópicos abordados foram representados no Esquema 4.1.



Esquema 4. 1: Principais tópicos da Metodologia.

4.1 Processamento e Caracterização das Espumas de Vidro Bioativo

A primeira etapa do estudo foi o processamento do biomaterial escolhido para a pesquisa, no caso a espuma de vidro bioativo e sua caracterização, para que fossem verificadas as suas características químicas e estruturais.

4.1.1 Síntese de Espumas de Vidro Bioativo

As sínteses das espumas de vidro bioativo seguiram o método sol-gel, rota alcóxido. Os reagentes utilizados foram: água deionizada; ácido nítrico 2N – *Synth*; alcóxido tetraetil ortosilicato (TEOS) - *Aldrich*, 98% de pureza, $Si(OC_2H_5)_4$, precursor de SiO_2 ; trietilfosfato (TEP) - *Aldrich*, precursor de PO_4 ; nitrato de cálcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) - *Synth*, como precursor de CaO ; solução 5% v/v ácido fluorídrico (HF) - *Merck*, catalisador da gelificação; surfactante lauril éter sulfato de sódio (LESS).

A metodologia de obtenção de espumas de vidro bioativo usada foi desenvolvida anteriormente por Coelho (Coelho, 2003). A síntese de 1 mol de vidro bioativo (Figura 4.1) ocorreu pela hidrólise de 133,8 mL de TEOS e 13,6 mL de TEP na presença de 97,9 mL de água deionizada e 16,3 mL ácido nítrico 2N, por uma hora sob agitação (1), e subsequente adição de 85,01 g de nitrato de cálcio, deixando solubilizar por uma hora (2). Foi então adicionada a uma alíquota de 41,5 mL de sol, 1,5 mL de surfactante sob suave agitação durante 5 minutos e 3,0 mL da solução de HF (3). O sol foi misturado sob vigorosa agitação (4) de modo a se obter uma espuma e, por fim, a porosidade desejada. A espuma foi vertida em moldes (Figura 4.2) (5), onde a gelificação se completou. O gel formado foi envelhecido por 72 horas em estufa a 60°C (6) e a secagem ocorreu com uma temperatura inicial de 70°C e acréscimo de 10°C por dia durante sete dias (7). Para finalizar, um tratamento térmico de estabilização foi realizado (8) em forno do tipo mufla com um aquecimento até 700°C com taxa de aquecimento de 1°C por minuto, manutenção desta temperatura por 4 horas e depois diminuição da temperatura até 40°C (taxa de 1°C por minuto).

4.1.2 Esterelização das Espumas de Vidro Bioativo

Para a realização de todos os testes *in vitro* com células-tronco, as espumas de vidro bioativo foram esterelizadas por irradiação a 15 kGy por 30 minutos. A irradiação foi realizada no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear da UFMG (CDTN/UFMG).

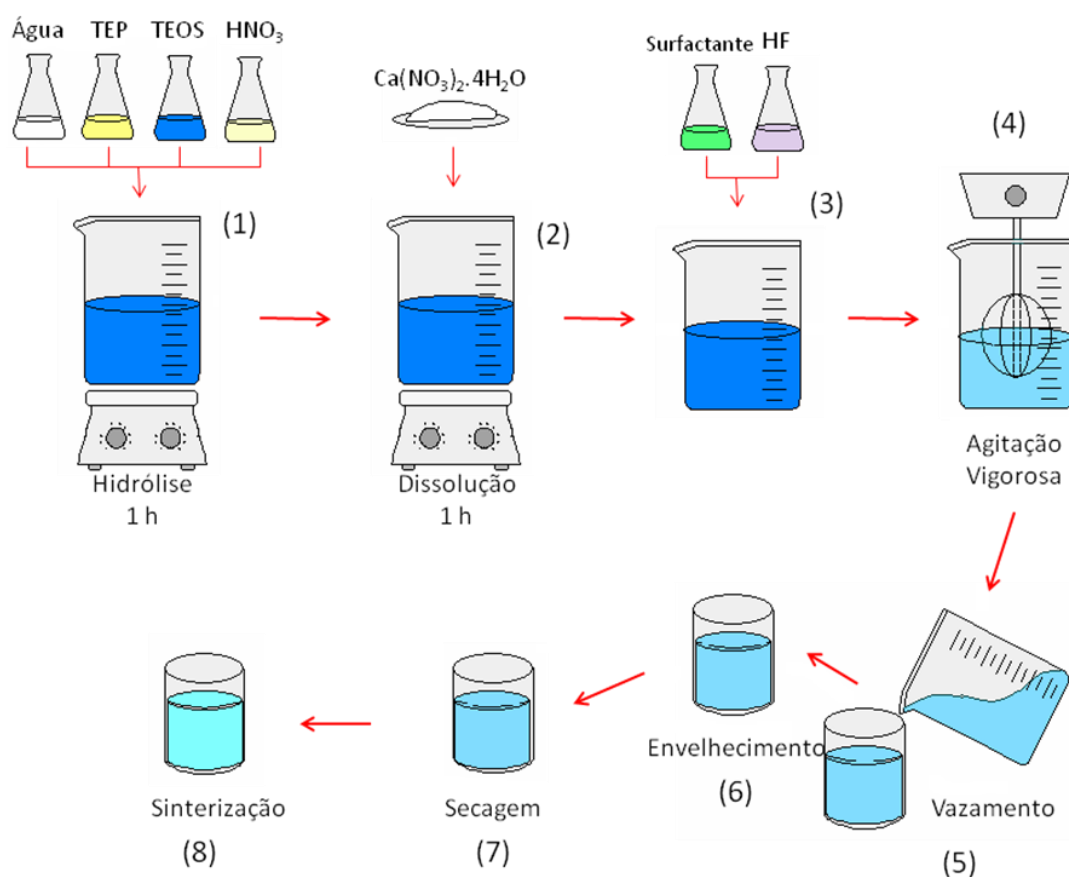


Figura 4. 1: Ilustração do esquema da síntese do vidro bioativo.

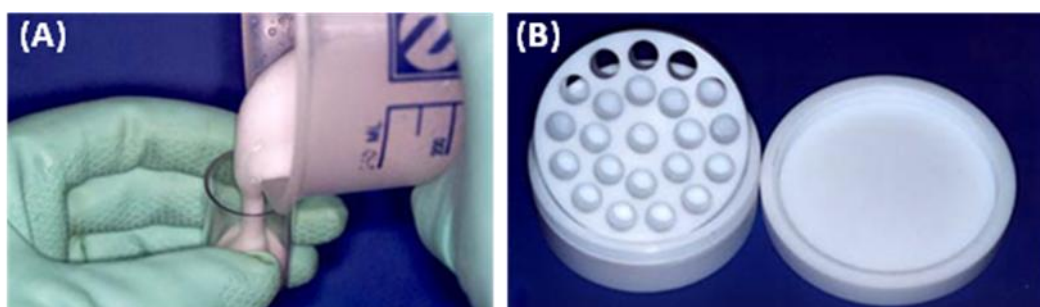


Figura 4. 2: Vazamento da espuma de vidro bioativo (A) e recipiente de Teflon projetado para tornar mais eficiente a vazão da espuma (B).

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) permite a obtenção de informações estruturais das amostras. Quando um feixe colimado de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra, parte dele é refletido e coletado por um detector que converte

o sinal em uma imagem. A interação com a amostra emite elétrons produzindo uma imagem de elétrons secundários ou elétrons retroespalhados.

Amostras da espuma de vidro bioativo foram cobertas com ouro (*Sputter Coater – SPI Supplies*) por 90 segundos, 13mA. As imagens foram adquiridas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) no equipamento Quanta 200 - FEG - FEI – 2006 do Centro de Microscopia da UFMG, para avaliação qualitativa da presença e faixas de tamanhos de poros.

4.1.4 Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia

A espectroscopia dispersiva de energia, realizada em conjunto com o MEV, foi utilizada para analisar a composição química qualitativa das espumas de vidro bioativo produzidas.

4.1.5 Picnometria de Hélio

A densidade verdadeira (ρ_{ver}) foi obtida pelo método de Picnometria de Hélio com o auxílio do Multipycometer.

A amostra em forma de pó foi colocada em um porta amostra e sua massa foi obtida seis vezes para melhorar a precisão das medidas. O aparelho foi então ligado e as medidas realizadas. O equipamento fornece dados de medidas P1 e P2 e que devem ser calculados de acordo com a fórmula abaixo:

$$V_P = V_C - V_R ((P1/P2) - 1)$$

Equação 4. 1: Cálculo do Volume Aparente da Amostra.

Onde $V_C = 12,3532$ e $V_R = 6,84216176$

O cálculo da densidade volumétrica foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\rho_{\text{vol}} = m/V$$

Equação 4. 2: Cálculo da Densidade Volumétrica da Amostra.

O cálculo da Porosidade Total das amostras é obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Porosidade Total (\%)} = (\rho_{\text{ver}} - \rho_{\text{vol}}) / \rho_{\text{ver}}$$

Equação 4. 3: Cálculo da Porosidade Total.

4.1.6 Difração de Raios X

A avaliação das fases cristalinas presentes na matriz de vidro bioativo foi realizada utilizando-se a difração de raios X (pó fino, radiação Cu K α , $\lambda=1,54\text{\AA}$, passo= $0,02^\circ\text{s}^{-1}$, PW1710, Philips).

4.1.7 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Nicolet Nexus 470, da marca Centaurus) foi utilizada para a verificação de bandas características das espumas de vidro bioativo, com espectro entre os números de onda 4000cm^{-1} e 400cm^{-1} .

4.2 Projeto e Montagem do Biorreator de Perfusão

O biorreator de perfusão desenvolvido para este trabalho é um sistema fechado, passivo de sofrer esterilização, onde o meio de cultura celular é constantemente bombeado a uma taxa de fluxo constante por uma bomba peristáltica através de mangueiras de conexão que conduzem este fluxo através de um construto adequadamente adaptado ao interior de uma câmara de perfusão e retorna através das mangueiras de conexão ao reservatório de meio de cultura, conforme esquematizado na Figura 4.3.

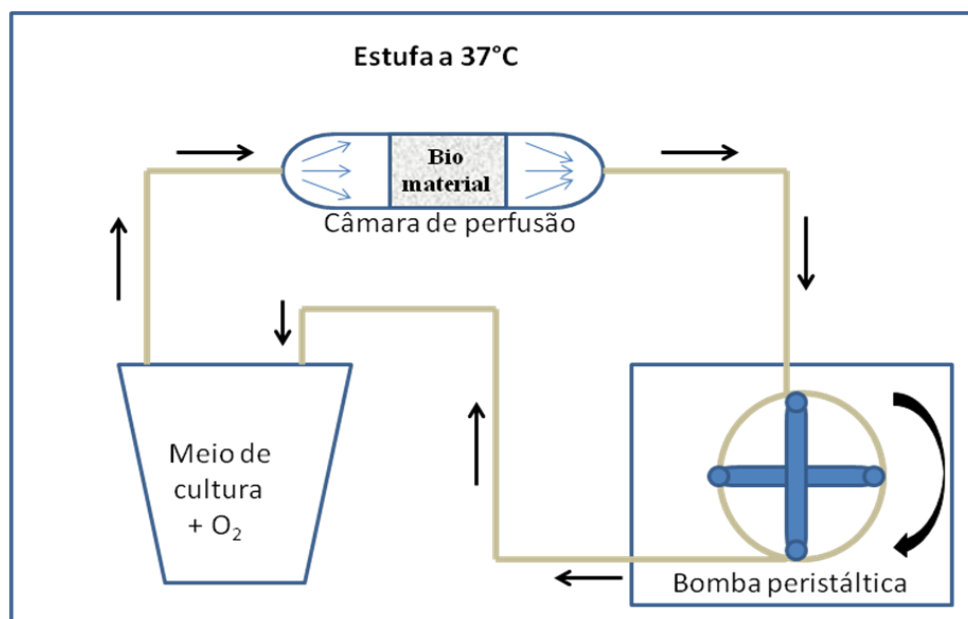


Figura 4. 3: Ilustração do esquema de organização do biorreator: câmara de perfusão, bomba peristáltica e tubos de conexão dentro da estufa de CO₂.

A câmara de perfusão foi projetada com uma entrada e uma saída para permitir a perfusão do meio de cultivo por todo o seu interior, onde o construto (biomaterial e células semeadas) deve estar adequadamente adaptado. As câmaras de perfusão, projetadas para encapsular matrizes com 6 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento, foram usinadas na oficina mecânica do Departamento de Engenharia Metalúrgica da UFMG. O material escolhido para a confecção das câmaras foi o polipropileno, uma resina de baixa densidade que oferece um bom equilíbrio de propriedades térmicas e elétricas e moderada resistência. O polipropileno de escolha permitiu fácil usinagem, autoclavagem e é atóxico.

Os tubos escolhidos para conectar o sistema do biorreator são tubos peristálticos calibrados de silicone com 2,6 mm de diâmetro interno. Estes tubos foram escolhidos por serem autoclaváveis, translúcidos e apresentarem biocompatibilidade e elevada permeabilidade a gases.

O reservatório para os meios de cultura de escolha foram garrafas de estoque de meio de cultura, que são garrafas de vidro da marca Sarsdest. Na tampas das garrafas, foram confeccionados três furos, dois deles para a adaptação das mangueiras de conexão – um

para entrada e outro para saída do meio de cultura - e um deles para a adaptação de um filtro de respiro da marca Millipore, com o intuito de evitar a formação de vácuo no interior das garrafas durante os testes e possibilidade de ser mais uma via de troca de gases.

A bomba peristáltica de escolha foi a Bomba Miniplus 3, que produz um fluxo suave e livre de pulsos, possui 8 canais, ou seja, permite o trabalho de até 8 câmaras de perfusão ao mesmo tempo alimentadas por um fluxo constante de meio de cultura. Esta bomba atende uma ampla faixa de fluxo: desde 0,05mL/min até 40mL/min por canal.

O método escolhido para esterilização dos acessórios do biorreator foi a autoclavagem.

Em relação à troca de meio no biorreator durante o cultivo celular, foi realizada uma troca parcial, para não eliminar os novos componentes produzidos pelas células, como os fatores de crescimento, hormônios e enzimas, que são importantes na regulação dos próprios mecanismos celulares (GOLDSTEIN *et al*, 2001; MARTIN *et al*, 2005). Portanto, metade do meio de cultura foi trocado a cada sete dias.

O sistema do biorreator de perfusão foi adaptado para o uso dentro de um banho-maria, dessa forma, mantendo uma temperatura de 37°C. Para garantir a manutenção do pH das culturas celulares, foi testado um meio de cultura que não dependesse do CO₂, chamado Meio Leibovitz Independente de CO₂ (Gibco), que é capaz de manter a estabilidade do pH a longo prazo sob CO₂ atmosférico. Dessa forma, alguns testes preliminares com as células-tronco do tecido adiposo foram realizados, visto que a estabilidade do pH da cultura depende do tipo celular utilizado. Esses testes serão descritos posteriormente.

Algumas condições fisiológicas do biorreator puderam ser controladas como a temperatura de 37°C, garantida pela manutenção das mangueiras e reservatórios de meio de cultura em banho e monitorada diariamente com o auxílio de um termômetro e o pH, monitorado a cada troca de meio de cultura com o auxílio de um pHmetro.

4.3 Avaliação da Degradação e Bioatividade das Espumas de Vidro Bioativo

Após a montagem do biorreator, os primeiros testes realizados foram a avaliação da degradação e bioatividade das espumas de vidro bioativo, os quais visam a avaliação da formação de uma camada superficial de hidroxiapatita carbonatada quando o material é embebido em solução que simula o plasma humano.

Para a realização dos testes de degradação e bioatividade, foram realizadas medidas iniciais das amostras, incluindo peso, altura e diâmetro. Para as medidas foram utilizadas uma balança analítica e o Paquímetro Mitutoyo Digimac Caliper e os valores foram obtidos a partir da média de três medidas de cada amostra. A partir desses dados, foram calculados os valores médios das amostras e o desvio padrão.

Com esses dados, também foi calculada a área do cilindro da amostra e assim estimado o volume de *Simulated Body Fluid* (SBF) a ser utilizado no teste estático.

$$S_a = 2\pi rh = 2\pi r^2$$

Equação 4. 4: Cálculo da Área da Amostra.

$$V = S_a / 10$$

Equação 4. 5: Volume da Solução para a Amostra.

A relação do volume de SBF e a área da amostra têm sido usadas em estudos de bioatividade na literatura (KOKUBO & TAKADAMA, 2006; ISO/FDIS 23317, 2007).

Os testes estáticos foram realizados em triplicata, em banho-maria a 37°C. Cada amostra foi colocada em um recipiente com tampa e mantida durante 1, 7, 14 e 21 dias.

A taxa de fluxo de 0,1mL/min foi escolhida a partir de estudos semelhantes que utilizaram biorreatores de perfusão e células-tronco ou células do estroma da medula

óssea (WANG *et al*, 2003; SIKAVITSAS *et al*, 2005; PORTER *et al*, 2007; BJERRE *et al*, 2008; ZHAO *et al*, 2009).

Para se estimar a quantidade de SBF a ser utilizada no ensaio dinâmico, levando-se em consideração que a taxa de fluxo seria 0,1mL/min, para 1 dia de experimento seriam necessários 144mL de SBF por amostra. Para conseguir essa taxa de fluxo, após as amostras serem colocadas dentro dos biorreatores e todos os dispositivos serem conectados, mediu-se de cada conjunto o fluxo no período de 10 minutos para se estimar a rotação da bomba peristáltica, dessa forma, estimou-se 0,45rpm. Essa rotação foi reavaliada a cada dois dias para verificar a necessidade de um possível aumento ou diminuição do fluxo.

O pH foi medido antes da imersão da amostra e foi escolhida uma amostra para a medida diária do pH por grupo. O pHmetro utilizado da marca Micronal B474 foi calibrado diariamente. No final do teste de cada período, foi medido o pH do SBF a 37°C de todas as amostras. Ao serem retiradas do SBF, as amostras foram lavadas suavemente com acetona e mantidas em estufa a 60°C por 24 horas para a secagem e posterior caracterização.

As medidas finais foram realizadas medindo-se primeiro o peso e depois as medidas de altura e diâmetro. A superfície do material e seções transversais evidenciando o interior das amostras foram analisadas por MEV, EDS, FTIR e DRX.

4.4 Isolamento e Cultivo das Células-Tronco a Partir do Tecido Adiposo Humano

Quando se planeja realizar testes *in vitro* com células, o primeiro passo é a escolha de um meio de cultura adequado para o tipo celular a ser estudado. O meio de cultura amplamente utilizado pela comunidade científica para os estudos em células-tronco mesenquimais é o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Cinética Química Ltda), 10% de SFB (Cripion), 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 filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 μm (Millipore).

Para induzir osteogênese, adiciona-se ao meio DMEM suplementado 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Ecibra), 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich) e 0,1 μM dexametasona (Aché). O pH do meio também deve ser ajustado para 7,2 e o meio filtrado como descrito acima.

O isolamento e cultivo das células-tronco a partir do tecido adiposo humano (hASC) foram realizados conforme descrito por Zuk (Zuk *et al.*, 2001). As hASC foram obtidas do lipoaspirado resultante de pacientes do sexo feminino, entre 20 e 40 anos, submetidas à cirurgia de lipoaspiração realizada no Núcleo de Cirurgia Plástica, coordenado pelo Dr. Luis Alberto Lamana dos Santos, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer nº ETIC - 0107.0.203.000-10).

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% CO_2 , 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 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 (Figura 4.4).

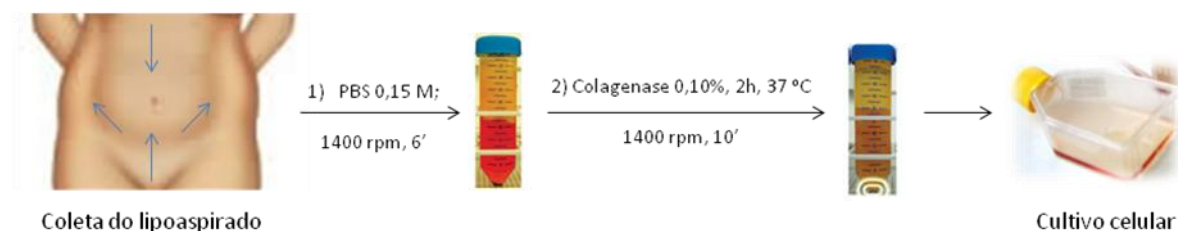


Figura 4. 4: Obtenção de células-tronco a partir do tecido adiposo humano.

A cada dois dias, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2, 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 e tratadas com 1 mL de tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen), por 5 minutos em estufa a 37°C. 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 (Figura 4.5). As células foram expandidas dessa maneira até a 4^a passagem para serem utilizadas nos experimentos.

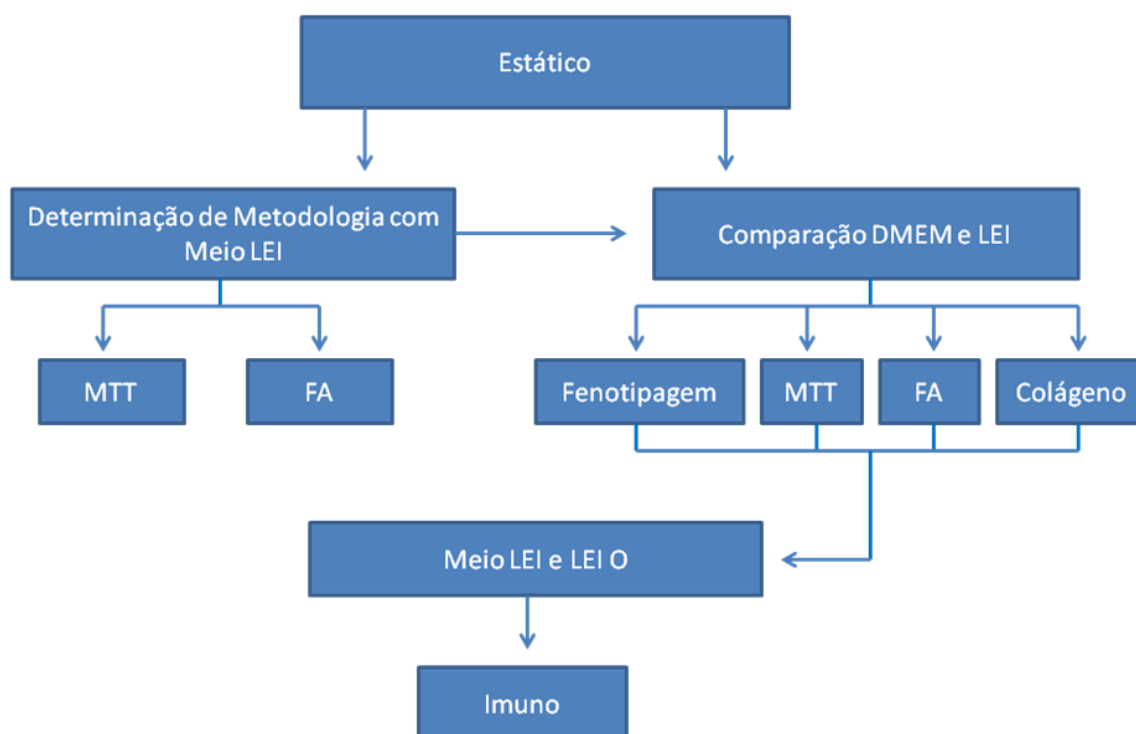


Figura 4. 5: Ilustração de garrafas de 75cm² contendo o meio basal e as células-tronco que inicialmente irão se aderir ao fundo da garrafa e, com a proliferação, irão alcançar a confluência (FRESHNEY *et al*, 2007).

A partir da extração das hASC, alguns testes estáticos (Esquema 4.2) foram delineados para adaptar o cultivo ao meio independente de CO₂ e, em seguida, avaliar se esse meio seria capaz de manter as características fenotípicas, morfológicas, de proliferação e diferenciação celular com a mesma qualidade que o meio padronizado pela comunidade científica.

4.5 Determinação de Metodologia de Cultivo das hASC em Meio Independente de CO₂

Como a montagem do biorreator foi feita em banho-maria para controle e manutenção da temperatura e não se utilizou o cultivo convencional em estufa de CO₂, houve a necessidade de utilizar um meio de cultura que não necessitasse de CO₂ para garantir a manutenção do pH da cultura celular. Com poucas exceções, como o meio Leibovitz's e a solução salina equilibrada de Hanks, a maioria dos meios necessita do uso de 5% CO₂ com bicarbonato de sódio ou outros tampões para manter o pH adequado (LENNON *et al*, 2001). Dessa forma, foi testado o meio de cultura Leibovitz Independente de CO₂ (Gibco) (ANEXO I), que é capaz de manter a estabilidade do pH a longo prazo sob CO₂ atmosférico. Este meio tem sido usado para cultivo ou manutenção de células Vero – linhagem de células de rim de macaco e MDCK – células da linhagem epitelial (BARNGROVER *et al*, 1985), tumorais diversas (VISTICA *et al*, 1990), embrionárias (PERIN *et al*, 2007), tronco isoladas do tecido cerebral (WESTERLUND *et al*, 2003), HepG2 – linhagem de células de câncer de fígado (TALÉNS-VISCONTI *et al*, 2006), Caco-2 – linhagem celular de adenocarcinoma epitelial coloretal - para estudo de fármacos (LIND *et al*, 2007). Não foram encontrados na literatura testes relacionado com o meio LEI e hASC.



Esquema 4. 2: Cultivo Estático para Avaliação do meio LEI.

Alguns testes preliminares com as hASC foram realizados, visto que a estabilidade do pH da cultura depende do tipo celular utilizado e não há na literatura estudos envolvendo o cultivo de hASC em meio Leibovitz (LEI). Assim como o DMEM, o meio LEI também foi suplementado com 10% de SFB, 1000 unidades/mL de penicilina, 1 mg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B e 60 mg/L de gentamicina. O pH do meio foi ajustado para 7,4 (de acordo com as especificações do fabricante) e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm. Inicialmente, foi tentado o isolamento das hASC diretamente com o meio LEI, mas sem sucesso. A alternativa foi desenvolver uma nova metodologia de adaptação de hASC ao meio LEI, mantendo o isolamento com o meio tradicional DMEM e a partir da primeira passagem, adaptar as células ao novo meio de cultura. Portanto, foram realizados os testes de Viabilidade e Proliferação Celular e Produção de Fosfatase Alcalina durante a adaptação das células a três grupos quando comparadas às células cultivadas em meio DMEM: (G1) adaptação lenta a partir da adição de 10% de meio LEI na primeira passagem, 25% na segunda, 50% na terceira, 75% na quarta e finalmente 100% de LEI na quinta passagem; (G2) adaptação mais rápida com 25% de meio LEI na primeira passagem, seguido de 50 e 75% na segunda e terceira passagem e 100% na quarta

passagem e, por fim, (G3) adaptação rápida com 50% de LEI na primeira passagem, 75% na segunda passagem e 100% na terceira passagem.

4.5.1 Viabilidade e Proliferação Celular

A viabilidade e proliferação das hASC foi mensurada 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 ótica pode ser determinada pelo espectrofotômetro a 595 nm. O número de células viáveis é diretamente proporcional a quantidade de cristais de formazan produzidos.

As hASC cultivadas em meio de cultura DMEM e nos três grupos de adaptação ao meio LEI foram semeadas em placas de 24 poços (NUNC) na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura. As células foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 7, 14 e 21 dias.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado e 210 µL/poço do respectivo meio de cultura foram adicionados. Em seguida, foi acrescentado 170 µL/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 ótico (M.O.) para visualização dos cristais de formazan. Estes foram solubilizados através da adição de 210 µL/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 µL de cada poço para uma placa de 96 poços (fundo reto), em triplicata, e a densidade ótica 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 ± EMP (erro médio padrão).

4.5.2 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 pela célula. Essa reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico), formando um precipitado insolúvel de cor púrpura (SMEJKAL & KAUL, 2001).

As hASC cultivadas em meio de cultura DMEM e nos três grupos de adaptação ao meio LEI foram semeadas em placas de 24 poços (NUNC) na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura. Em seguida, foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 7, 14 e 21 dias.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado, as 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., 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 ótica 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.

4.5.3 Novo Meio de Cultura Basal e para Indução da Osteogênese no Biorreator

A partir dos testes da metodologia desenvolvida neste trabalho, o meio de cultura basal das hASC passou a ser o meio LEI com adaptação mais gradual (Grupo 1). E para induzir osteogênese, foram adicionados ao meio LEI: 50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerofosfato e 0,1 µM dexametasona. O ajuste do pH do meio e a filtração se seguiram da mesma forma para o meio osteogênico (LEI O).

4.6 Estudos Básicos Comparativos em Culturas de hASC

Alguns ensaios básicos comparativos entre as hASC cultivadas em meio DMEM e meio LEI foram realizados como forma de avaliar se as células cultivadas em meio LEI apresentariam as mesmas características morfológicas e funcionais das células cultivadas em meio convencional DMEM.

4.6.1 Caracterização do Imunofenótipo das hASC

As hASC cultivadas em meio DMEM e LEI foram caracterizadas na quinta passagem por citometria de fluxo através da 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 células-tronco hematopoiéticas (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 à expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II: HLA-ABC e HLA-DR, respectivamente (DOMINICI *et al.* 2006; MITCHEL *et al.* 2006; LINDROOS *et al.*, 2011).

Marcação celular com anticorpos primário e secundário

As hASC cultivadas em meio DMEM e LEI suplementados com SFB plaqueadas na densidade de 5×10^5 células/poço em placa de 96 poços (fundo em U) foram incubadas com 0,4 µg de anticorpos primários (Tabela 4.1) 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 4. 1: Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os conjugados PE e FITC se referem respectivamente aos fluorocromos Ficoeritrina e Isotiocianato de fluoresceína.

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

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 (Figura 4.6). 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.

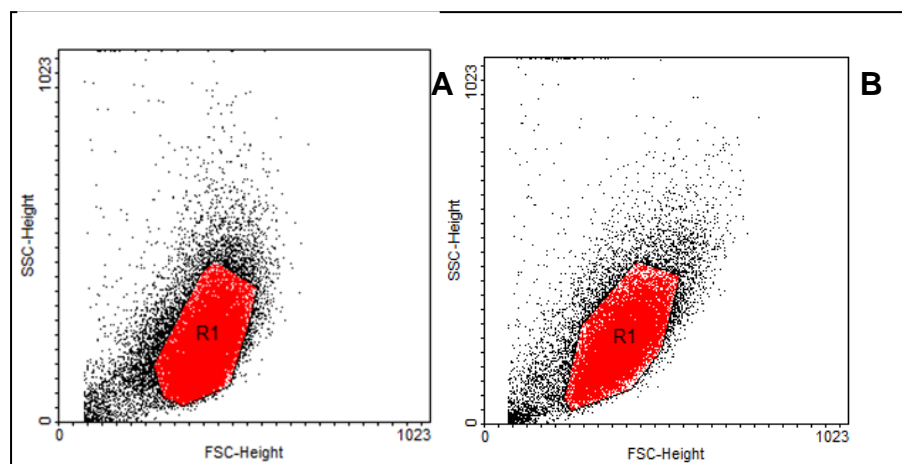


Figura 4. 6: Gráfico de tamanho versus granulosidade. R1 é a população escolhida para análise dos marcadores nas culturas em meio (A) DMEM e (B) LEI.

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 EMP.

4.6.2 Cultivo das hASC em meios DMEM e LEI

Viabilidade e Proliferação Celular

As hASC cultivadas em meios de cultura DMEM e LEI foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura. As células foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 7, 14 e 21 dias e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT conforme descrito no item 4.5.1.

Atividade da Fosfatase Alcalina

As hASC cultivadas em meios de cultura DMEM e LEI foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura. Em seguida, foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 7, 14 e 21 dias e a atividade da fosfatase alcalina foi avaliada conforme descrito no item 4.5.2.

Avaliação da Síntese de Colágeno

Para avaliar a síntese de colágeno pelas hASC cultivadas em meio DMEM e LEI durante a indução da diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* (TULLBERG-REINERT & JUNDT, 1999).

As hASC cultivadas em meios de cultura DMEM e LEI foram semeadas na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços contendo 1 mL do respectivo meio osteogênico e incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂. As hASC foram induzidas por 7, 14 e 21 dias. Como controle, as 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 µL de NaOH 0,5 M, por 30 minutos sob agitação. Transferiu-se 100 µL da solução para uma placa de 96 poços (fundo reto) e a densidade ótica foi mensurada no espectrofotômetro a 540 nm.

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

Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica

A diferenciação das hASC em células da linhagem osteogênica foi avaliada pela 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 de meios LEI e LEI O à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 7, 14 e 21 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 (Tabela 4.2), por 2 horas, à temperatura ambiente e em câmara úmida.

Tabela 4. 2: 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
Colágeno I	Monoclonal	Camundongo	-	abcam [®]	1: 200

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 (Tabela 4.3) diluídos 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. 3: Anticorpos secundários utilizados na marcação das células 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 30 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 foram montadas com *Hydromount* sobre lâminas.

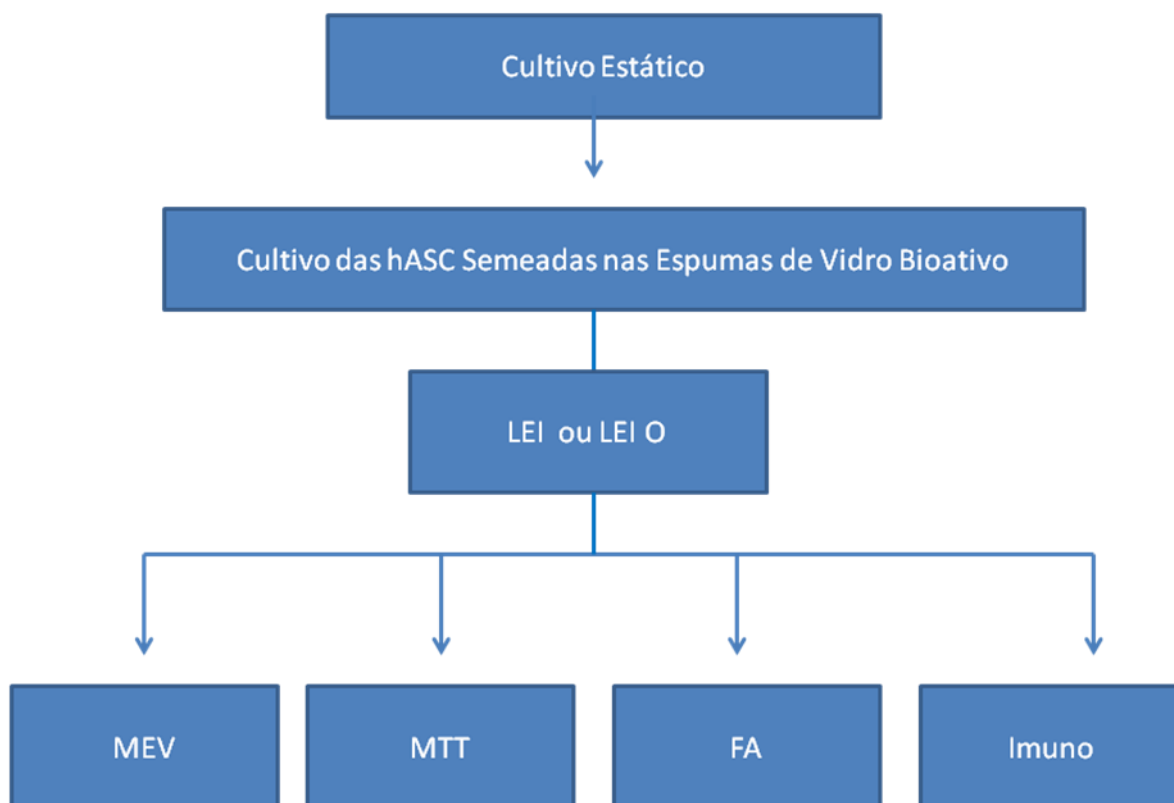
As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas através do Microscópio Confocal (Zeiss LSM 510 Meta) do Centro de Microscopia (CEMEL) do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope* LSM 510©.

4.7 Cultivo Estático das hASC Sementes nas Espumas de Vidro Bioativo

Após os ensaios comparativos entre os meios DMEM e LEI no cultivo das hASC, foram realizados alguns ensaios estáticos das hASC sementes sobre matrizes de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O, representados no Esquema 4.3.

Sobre as espumas de vidro bioativo de 6mm de diâmetro e 3 mm de comprimento, foram sementeadas 1×10^5 células/matriz e cultivadas em placas de 24 poços. As placas foram incubadas 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 LEI ou LEI O e as células foram cultivadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂.



Esquema 4. 3: Cultivo Estático das Espumas de Vidro Bioativo sementeadas com hASC.

4.7.1 Avaliação da Colonização e Adesão Celular

Análises por MEV foram realizadas para confirmar a presença e adesão das hASC à superfície das espumas de vidro bioativo colonizadas.

Após 7, 14 e 21 dias da colonização das espumas, estas foram preparadas para análise por MEV.

A primeira etapa do processamento consistiu 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 seguida pela adição de 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 sucessivamente nas concentrações - 30%, 50%, 70%, 90% - (2 vezes, por 10 minutos cada) e por fim, em álcool absoluto, por 30 minutos.

Finalizada a desidratação, as amostras permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO₂, realizado no aparelho de ponto crítico (Balzers modelo CPD-020), do CEMEL, processo pelo qual o álcool é substituído por CO₂, evitando dano às células, causado pela tensão superficial durante o processo de evaporação natural.

As amostras secas da espuma de vidro bioativo foram cobertas com ouro (*Sputter Coater – SPI Supplies*) por 90 segundos, 13mA e as imagens foram adquiridas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) no equipamento Quanta 200 - FEG - FEI – 2006 do Centro de Microscopia da UFMG.

4.7.2. Viabilidade e Proliferação Celular

A proliferação e viabilidade das hASC cultivadas nas espumas de vidro bioativo em meio LEI e LEI O foram avaliadas pelo ensaio de MTT. As matrizes colonizadas foram mantidas por 7, 14 e 21 dias de cultivo. Após cada período de cultivo, o ensaio de MTT foi realizado conforme descrito no item 4.5.1.

Para evitar a possível interferência da matriz no processo de colorimetria, foi realizado ensaio com as matrizes sem células e a média dos valores da densidade ótica obtida nos diferentes tempos foi subtraída 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.

4.7.3 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina

As espumas de vidro bioativo colonizadas por hASC e cultivadas em meios LEI e LEI O foram avaliadas, após cada intervalo de cultivo, em relação a atividade da fosfatase alcalina das hASC pelo ensaio de BCIP/NBT.

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 ótica obtidos foi subtraído o valor da média obtido somente com as matrizes.

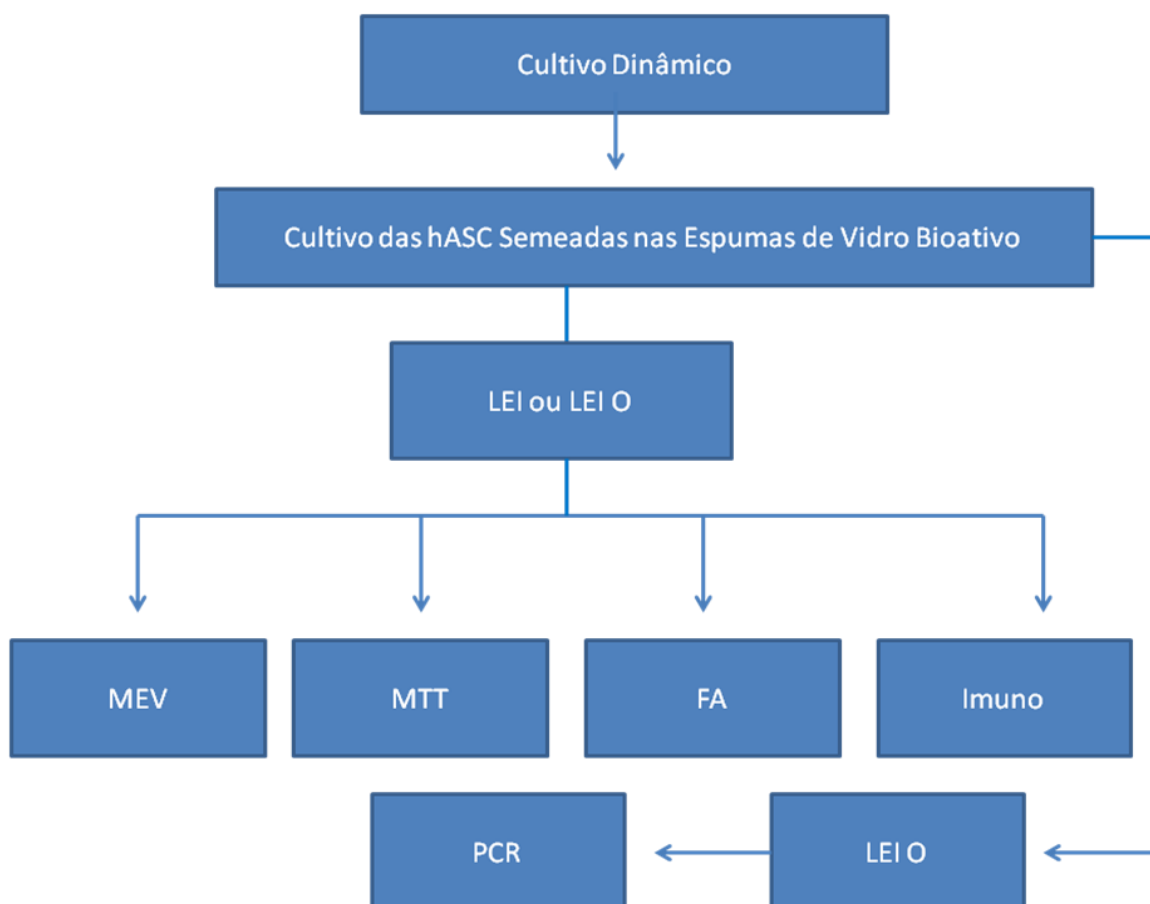
Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP.

4.7.4 Avaliação da Expressão de Marcadores de Células da Linhagem Osteogênica

A diferenciação das hASC em células da linhagem osteogênica, quando cultivadas em matrizes de vidro bioativo em meio LEI, foi avaliada pela expressão de osteopontina e colágeno tipo I, proteínas específicas produzidas por osteoblastos. As células cultivadas nas matrizes foram tripsinizadas, cultivadas em lamínulas estéreis em placas de 6 poços até completa adesão e em seguida foram processadas pela técnica de imunofluorescência descrita anteriormente.

4.8 Efeito do Cultivo Dinâmico em Biorreator de Perfusão Sobre a Diferenciação Osteogênica das hASC

Após os ensaios de cultivo celular estáticos nas amostras de vidro bioativo semeadas com hASC em meio LEI, foram realizados os ensaios nas matrizes de vidro bioativo semeadas com hASC e cultivadas no biorreator de perfusão, conforme o Esquema 4.4.



Esquema 4. 4: Cultivo Dinâmico das hASC Semeadas nas Espumas de Vidro Bioativo.

Sobre as amostras de espumas de vidro bioativo com diâmetro de 6mm e comprimento de 10mm, foram semeadas 3×10^5 células/matriz. O número de células utilizado neste ensaio foi três vezes maior que o número de células dos ensaios estáticos, devido à diferença no comprimento das amostras, que corresponde a uma área proporcionalmente três vezes maior. As amostras foram mantidas em atmosfera úmida com 5% CO₂ por 4 horas para a adesão celular. Foram então colocadas em câmaras individuais de perfusão e cultivadas por 7, 14 e 21 dias em banho-maria a 37°C. A taxa de perfusão utilizada para todos os testes foi de 0,1mL/min. Cada câmara de perfusão foi conectada a um

reservatório individual contendo 150mL de meio LEI ou LEI O, onde metade do volume do meio foi trocado a cada 7 dias (Figura 4.7).

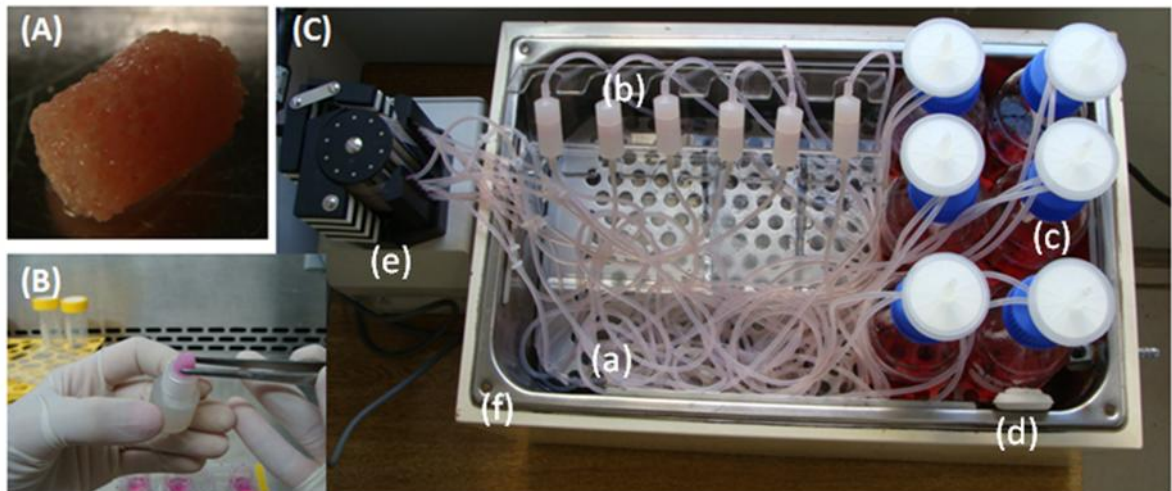


Figura 4. 7: (A) Espuma de vidro bioativo recém semeada com hASC; (B) construído sendo colocado dentro da câmara de perfusão do biorreator; (C) visão superior da montagem do biorreator de perfusão evidenciando (a) mangueiras, (b) câmara de perfusão, (c) reservatório do meio de cultura com filtro de respiro acoplado na tampa, (d) termômetro, (e) bomba peristáltica e (f) banho.

Como as amostras utilizadas nos testes estáticos apresentavam 3mm de comprimento e as amostras cultivadas no biorreator de perfusão apresentavam 10mm, todas as amostras foram cortadas em três partes e submetidas às análises biológicas subsequentes, para possibilitar a comparação dos resultados do cultivo estático e dinâmico.

4.8.1 Avaliação da Colonização e Adesão Celular

As análises por MEV foram realizadas para confirmar a presença e adesão das hASC à superfície e interior das espumas colonizadas cultivadas no biorreator de perfusão. Após 7, 14 e 21 dias, as matrizes colonizadas foram preparadas para análise por MEV cujo processamento foi descrito no item 4.7.1.

4.8.2. Viabilidade e Proliferação Celular

A proliferação e viabilidade das hASC semeadas nas espumas de vidro bioativo e cultivadas no biorreator de perfusão com os meios LEI e LEI O foram avaliadas pelo ensaio de MTT descrito no item 4.5.1.

4.8.3 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina

As espumas de vidro bioativo colonizadas por hASC e cultivadas no biorreator de perfusão com meio LEI e LEI O 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 4.5.2.

4.8.4 Avaliação da Expressão de Marcadores de Células da Linhagem Osteogênica

A diferenciação das hASC em células da linhagem osteogênica quando cultivadas em matrizes de vidro bioativo e em biorreator de perfusão foi avaliada pela expressão de proteínas específicas produzidas por osteoblastos utilizando a técnica de imunofluorescência descrita anteriormente.

4.8.5. Comprovação da Diferenciação Osteogênica Através de PCR

O ensaio utilizado para a verificação de expressão dos genes relacionados à osteogênese foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cuja metodologia se baseia na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA. O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse (SLAVKIN, 1989). Foi considerado o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle de amplificação das reações.

As hASC semeadas no vidro bioativo foram cultivadas no biorreator em meio LEI O por 7, 14 e 21 dias e, após cada período, foi realizada a extração do RNA.

Extração de RNA

Não foi encontrado na literatura um protocolo detalhado de extração de RNA de células cultivadas em amostras semelhantes ao vidro bioativo. Portanto, houve a necessidade de adaptar a extração de RNA de células cultivadas nesse tipo de amostra porosa e inorgânica. Inicialmente foi tentada a extração de RNA das hASC através da aplicação de 1mL de Trizol (Gibco) sobre as matrizes de vidro bioativo, incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. A solução formada foi processada seguindo os passos da extração do RNA usualmente utilizados para células cultivadas em garrafas de cultivo, mas quando realizada a leitura da absorbância a 260/280nm, os resultados foram próximos a zero.

Após outras tentativas sem sucesso, a nova metodologia pode ser assim descrita: as amostras de vidro bioativo semeadas com hASC retiradas do biorreator foram cortadas em três partes e cada uma em quatro partes e tripsinizadas por 5 minutos em estufa de CO₂ para que as células pudessem ser removidas do interior do biomaterial. Durante a tripsinização, as amostras foram agitadas suavemente a cada 2 minutos. Após a tripsinização, o biomaterial foi lavado três vezes com meio LEI e a solução total foi centrifugada por 5 minutos a 252 g. O *pellet* formado foi resuspenso em 1mL de Trizol e mantido em incubação por 5 minutos para a lise e homogeneização das células à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. A solução formada foi transferida para um microtubo de 1,5mL então centrifugada por 15 minutos a 4°C e 12.000 g para separar a solução dos pequenos fragmentos da matriz de vidro bioativo que se soltaram durante a tripsinização. A fase superior foi coletada e transferida para um novo microtubo de 1,5mL onde foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, seguido de homogeneização, dois minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos à 4°C, para separação em três fases onde a fase incolor superficial continha o RNA. A fase incolor foi transferida para um novo microtubo e o RNA foi precipitado com 0,5mL de álcool isopropílico (Merck) por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação a 4°C e 12.000 g por 10 minutos e lavagem com 1 mL de etanol 75% (Merck), seguida de centrifugação de 10 minutos a 4°C e 7.500 g. O RNA foi solubilizado em água destilada

DNase e RNase free (Gibco) e imediatamente estocado a -80°C . A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm em Nanodrop.

Foram realizadas diversas tentativas de extração de RNA das amostras cultivadas de maneira estática, entretanto as leituras de absorbância eram sempre baixas, o que impossibilitou a execução desse teste como forma de comparação das duas formas de cultivo. E em relação ao teste dinâmico com meio LEI, o último teste realizado, uma inesperada contaminação levou à perda de todas as amostras cultivadas. Infelizmente, já não haviam mais amostras disponíveis devido aos diversos testes de adaptação para essa técnica e o prazo para finalizar os experimentos já havia chegado ao fim.

Síntese de cDNA

Os cDNAs foram sintetizados a partir dos RNAs totais, utilizando-se o RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Dois microgramas de cada amostra de RNA total foram incubados com 0,5 µg de oligo(dT)₁₈, a 65°C por 5 minutos e, em seguida, as amostras foram incubadas no gelo. Logo após, foi adicionado às amostras: 5X reaction buffer, 20 unidades Ribolock™ Ribonuclease inhibitor, 10mM dNTP mix, e foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 unidades da enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (Fermentas) e as amostras foram incubadas por 60 minutos a 42°C . A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70°C por 10 minutos.

Os cDNAs resultantes foram utilizados nas reações de PCR descritas a seguir.

PCR

A quantificação relativa da expressão de colágeno tipo I, osteocalcina, fosfatase alcalina e osteopontina foram avaliadas pela técnica de PCR. Como controle positivo da reação foi amplificado o segmento gênico que codifica a gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima expressa constitutivamente por todas as células. Os

oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 4.4. As reações de amplificação para cada primer foi:

<p>GAPDH</p> <p>1- 94°C 4 minutos 2- 94°C 45 segundos 3- 60°C 45 segundos 4- 72°C 30 segundos 5- 30 Ciclos. 6- 72°C 5 minutos. 7- 4°C 2 horas. 8- Fim.</p>	<p>Osteocalcina</p> <p>1- 94°C 4 minutos 2- 94°C 45 segundos 3- 63°C 45 segundos 4- 72°C 30 segundos 5- 30 Ciclos. 6- 72°C 5 minutos. 7- 4°C 2 horas. 8- Fim.</p>
<p>Osteopontina</p> <p>1- 94°C 4 minutos 2- 94°C 45 segundos 3- 62°C 45 segundos 4- 72°C 30 segundos 5- 30 Ciclos. 6- 72°C 5 minutos. 7- 4°C 2 horas. 8- Fim.</p>	<p>Fosfatase Alcalina</p> <p>1- 94°C 4 minutos 2- 94°C 45 segundos 3- 63°C 45 segundos 4- 72°C 30 segundos 5- 30 Ciclos. 6- 72°C 5 minutos. 7- 4°C 2 horas. 8- Fim.</p>

realizadas em termociclador (PTC-100 MJ Research. Inc.). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para a sua visualização. As sequências de nucleotídeos dos genes iniciadores para a PCR estão descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4. 4: Genes e sequências de nucleotídeos dos iniciadores para PCR.

Gene	Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')	pb
------	--	----

GAPDH	<i>foward:</i> TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC <i>reverse:</i> ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	226
Osteocalcina	<i>foward:</i> CCCTCACACTCCTCGCCCTAT <i>reverse:</i> GGCCTCCTGAAAGCCGATGTG	248
Fosfatase Alcalina	<i>foward:</i> TGGTGGAAGGAGGCAGAATTGAC <i>reverse:</i> CAGGACGCTCAGGGGGTAGA	558
Osteopontina	<i>foward:</i> GCCGAGGTGATAGTGTGGTTTATG <i>reverse:</i> ACTGCTTGTGGCTGTGGGTTTC	231

5. Resultados e Discussão

5.1. Processamento e Caracterização das Espumas de Vidro Bioativo

5.1.1. Síntese das Espumas de Vidro Bioativo

A síntese de espumas de vidro bioativo contendo 60%-SiO₂-36%CaO-4%P₂O₅ pelo método sol-gel - rota alcoóxido - levou à obtenção de matrizes tridimensionais com aspecto macroscópico esponjoso, de cor branca e medindo 12 mm de diâmetro e aproximadamente 20 mm de comprimento no molde grande e 6 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento no molde pequeno (Figura 5.1).

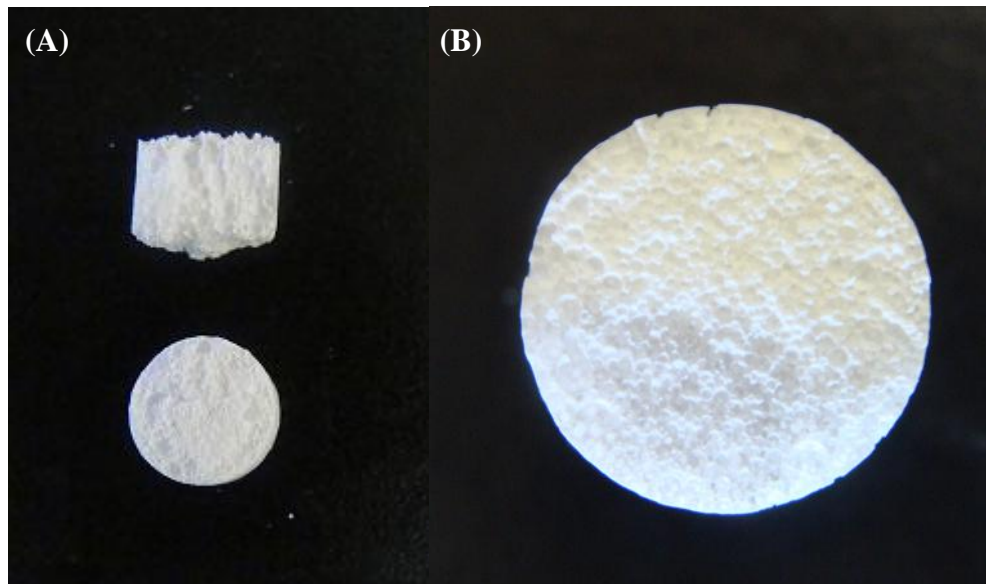


Figura 5. 1: Imagem da espuma de vidro bioativo (A) 6mm e (B) 12 mm.

5.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A estrutura das espumas de vidro bioativo foi avaliada, preliminarmente, através de MEV e observou-se que estas apresentavam elevada porosidade, com poros esféricos, tamanhos médios de poros variando entre 100 e 500µm e uma rede interconectada de poros (Figura 5.2).

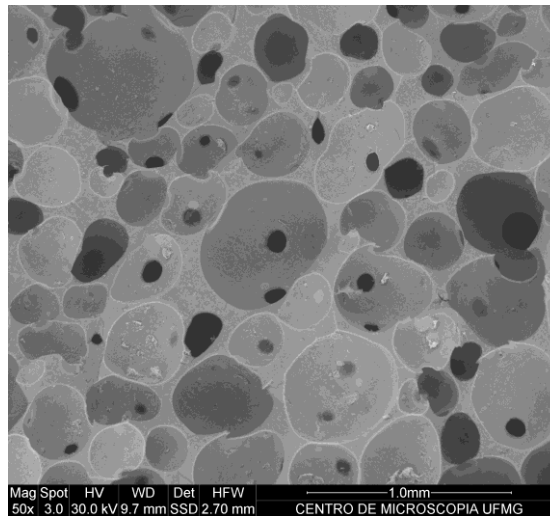


Figura 5. 2: Imagem obtida por MEV da espuma de vidro bioativo.

5.1.3. Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia

A espectroscopia de raios X por dispersão de energia, realizada em conjunto com a MEV, foi utilizada para analisar a composição química qualitativa das espumas de vidro bioativo produzidas. A análise realizada em diversas áreas das espumas de vidro bioativo detectou a presença dos elementos químicos silício (Si), cálcio (Ca), fósforo (P) e ouro (Au), sendo este último, devido ao processo de metalização das matrizes (Figura 5.3).

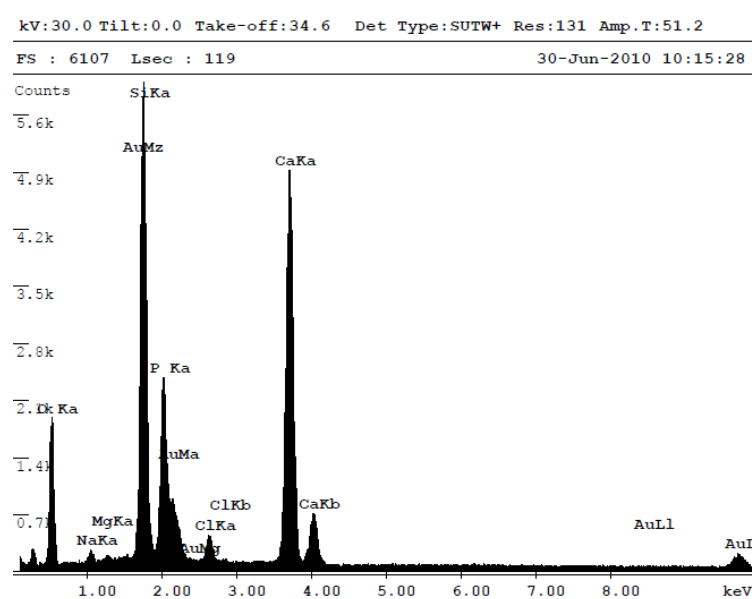


Figura 5. 3: Espectro de EDS evidenciando os componentes presentes na espuma de vidro bioativo.

5.1.4. Picnometria de Hélio

O valor de densidade verdadeira obtida para o vidro bioativo através do método de Picnometria de Hélio foi $2,7 \text{ g/cm}^3$, valor próximo ao encontrado na literatura de $2,518 \text{ g/cm}^3$ (VARSHNEYA, 1994), $2,56 \text{ g/cm}^3$ (COELHO, 2003) e $2,55 \text{ g/cm}^3$ (OLIVEIRA, 2006). O valor da densidade volumétrica foi de aproximadamente $0,324 \text{ g/cm}^3$ e com ambos os resultados de densidade verdadeira e densidade volumétrica, foi possível calcular a porosidade total das amostras de 88%. Aproximadamente 80% de porosidade é o ponto de equilíbrio entre propriedades mecânicas e interconectividade ideais (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005).

5.1.5. Difração de Raios X

A Figura 5.4 mostra o difratograma de raios X da amostra de espuma de vidro bioativo 60S. Observa-se nessa figura que o padrão do material é característico de material amorfo.

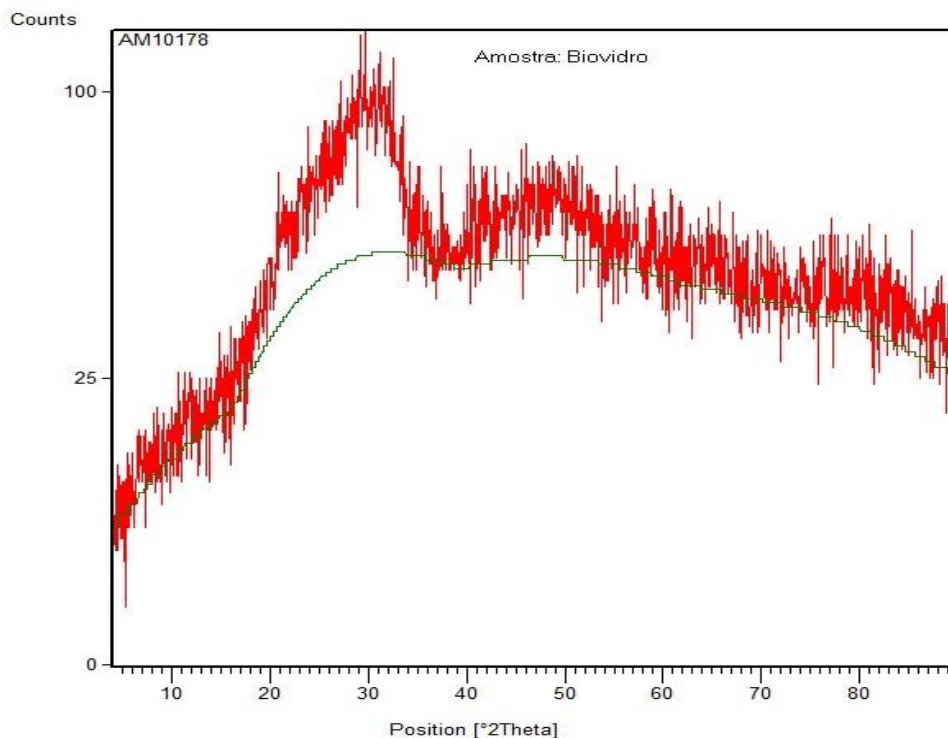


Figura 5. 4: Difratograma de raios X da espuma de vidro bioativo.

5.1.6. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

O espectro de FTIR obtido das espumas de vidro bioativo 60S está demonstrado na Figura 5.5.

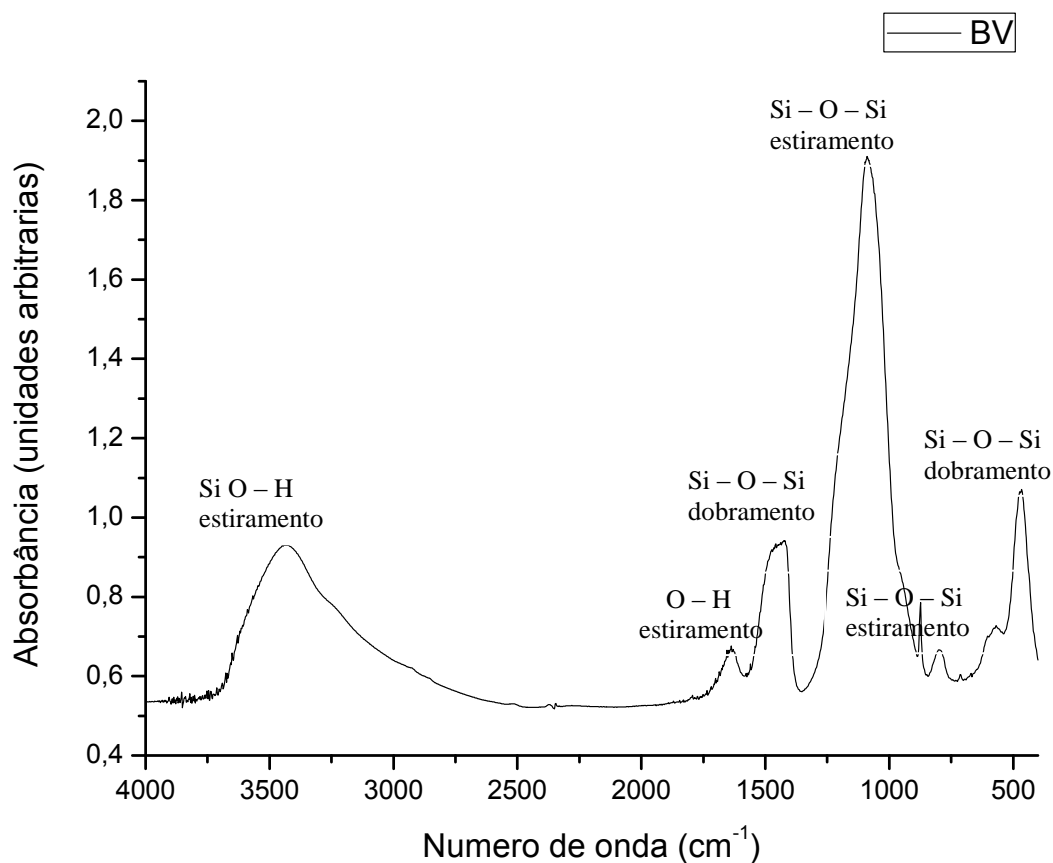


Figura 5. 5: Espectro FTIR obtido da espuma de vidro bioativo.

A banda centrada em 3450 cm^{-1} é relacionada com o estiramento $SiO - H$ dos grupos silanois superficiais que fazem Ligação de Hidrogênio com as moléculas de água. Em relação às vibrações correspondentes ao estiramento dos grupos $O - H$, há a banda em 1630 cm^{-1} relacionada ao modo de deformação das moléculas de água adsorvidas.

As bandas em 1200 e 1090 cm^{-1} são associadas ao estiramento assimétrico das ligações $Si - O - Si$. A banda na faixa de 806 cm^{-1} , relacionada ao estiramento simétrico $Si - O - Si$ e a banda em 470 cm^{-1} é relacionada ao modo de dobramento das ligações $Si - O - Si$ (OLIVEIRA, 2007).

5.2. Avaliação da Degradação e Bioatividade das Espumas de Vidro Bioativo

Os vidros bioativos são materiais quimicamente reativos que sofrem dissolução antes da deposição da camada de HCA na sua superfície (JONES *et al*, 2001). Além disso, o ambiente *in vivo* não é um ambiente fechado e a saturação de íons não é esperada (YUE *et al*, 2011). Dessa forma, a avaliação da degradação e bioatividade desse material devem ser realizadas de maneira a simular o ambiente *in vivo*. Durante os estudos de degradação, foram avaliadas as variações do pH das soluções de SBF usadas nos testes estático e dinâmico, expressas na Figura 5.6A, e a perda de massa das amostras testadas está representada na Figura 5.6B.

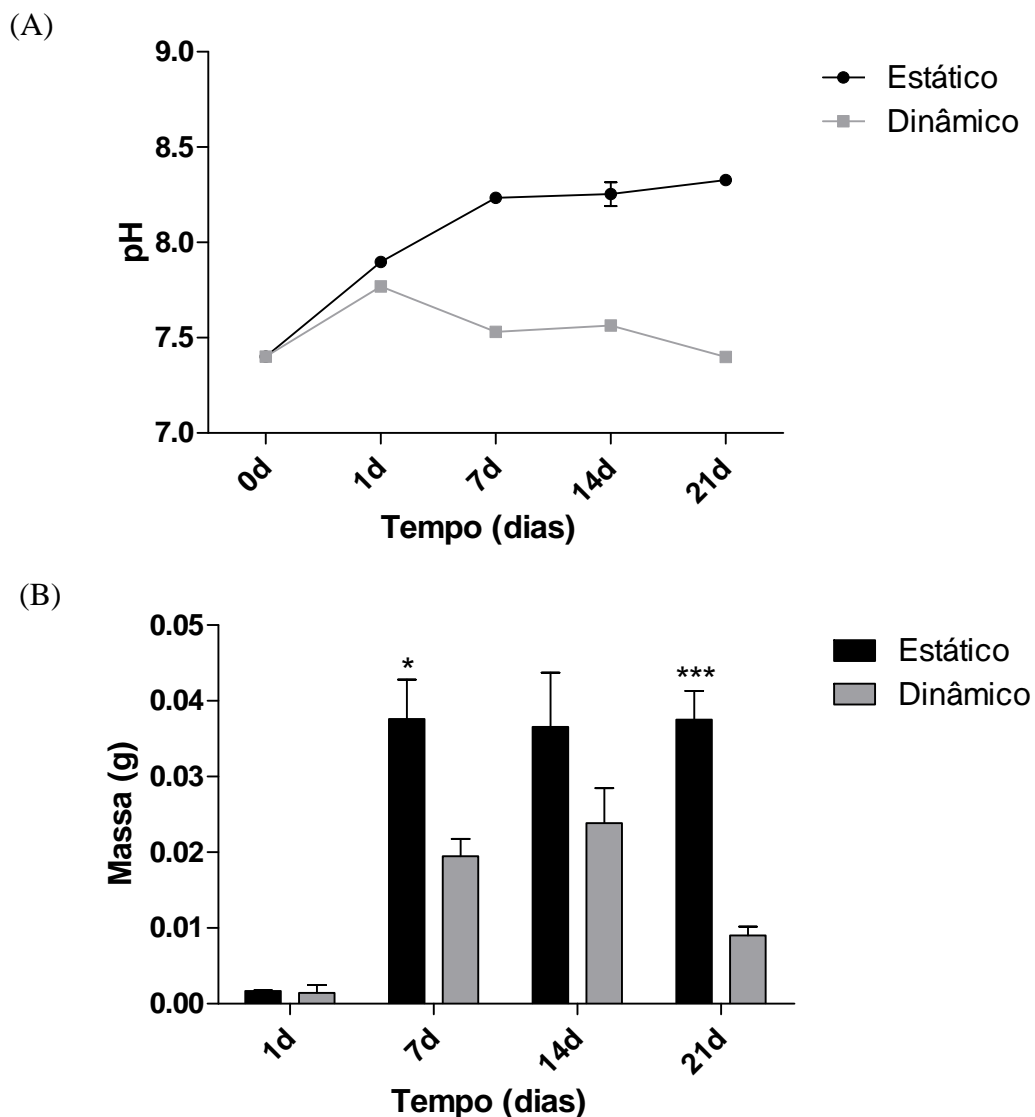


Figura 5. 6: Em (A) os valores do pH das soluções usadas nos testes estático e dinâmico (foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados) e em (B) a

perda de massa das amostras nos testes de degradação (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ estático x dinâmico).

De acordo com o gráfico A, o pH do SBF usado no teste estático aumentou desde o primeiro dia, partindo de 7,4 no tempo zero até 8,3 em 21 dias de experimento, enquanto a solução usada no teste dinâmico sofreu um pequeno aumento no primeiro dia de teste e depois manteve o pH estável até o final do experimento.

Em relação à perda de massa, observa-se que a partir do 7º dia de teste, houve uma maior perda de massa associada às amostras cultivadas de maneira estática. Essa perda se manteve maior até o 21º dia de teste.

A superfície externa de cada amostra e as seções transversais, obtidas através do corte na metade de cada amostra, foram analisadas por MEV, EDS, FTIR e DRX.

Na Figura 5.7, observa-se nas imagens (A) e (C) a formação de uma camada de material cobrindo a superfície das amostras, com estruturas maiores e mais alongadas nas amostras cultivadas no biorreator. Além de regiões com aspecto mais rugoso (setas), devido provavelmente à dissolução parcial da matriz (YUE *et al*, 2011).

Associando-se o resultado da perda de massa às imagens de MEV, sugere-se que no teste dinâmico, a perda de massa foi compensada pela deposição de material nas superfícies externa e interna das amostras, evidenciando inclusive a obliteração completa de algumas interconexões dos poros em 21 dias de experimento (Figura 5.8). Essa diminuição de tamanho dos poros de interconexão também foi observada na literatura (RÁMILA & VALLET-REGÍ, 2001; YUE *et al*, 2011).

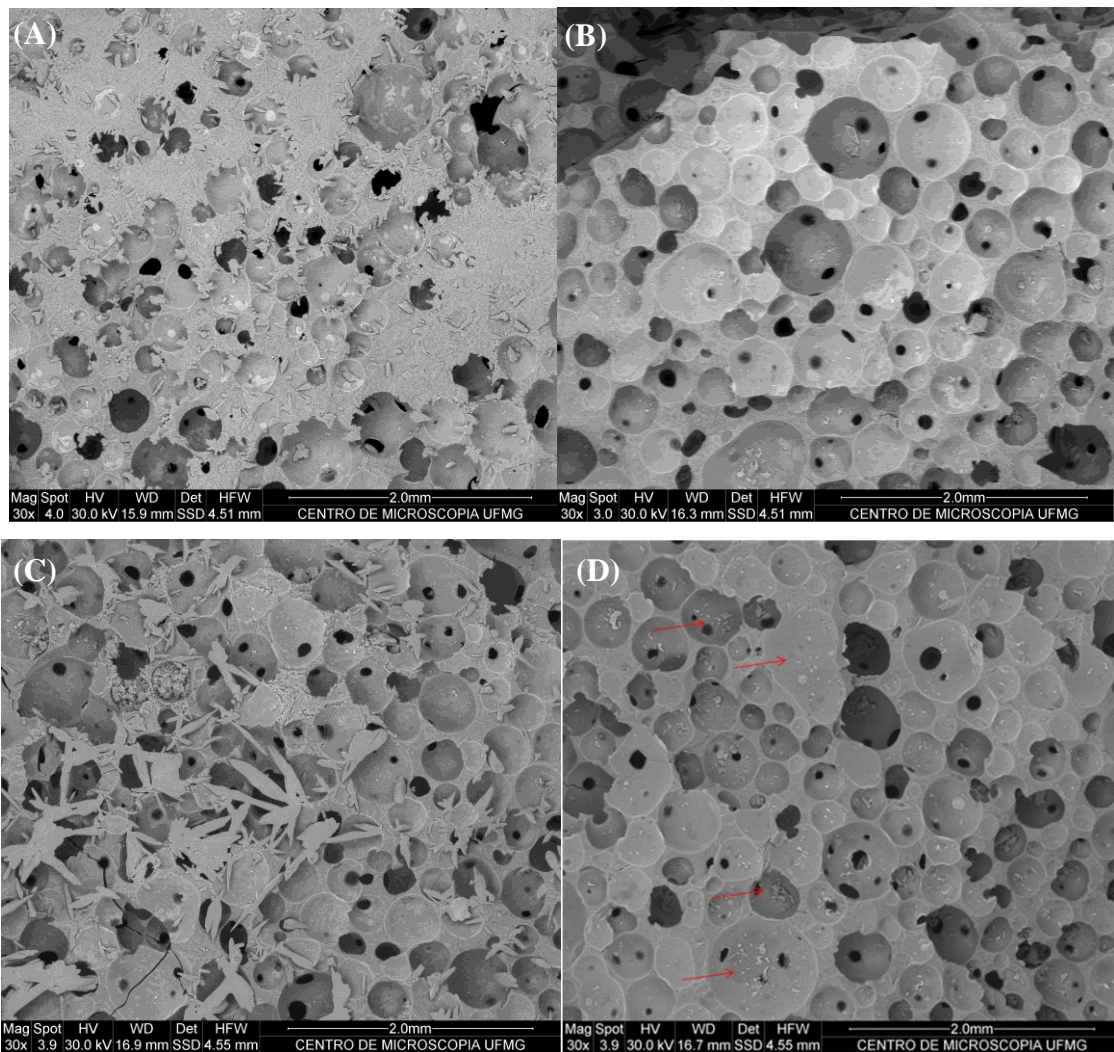


Figura 5. 7: Micrografia da superfície externa da amostra de 14 dias do teste estático (A) e dinâmico (C). E em (B), superfície interna da mesma amostra do teste estático e em (D) do teste dinâmico.

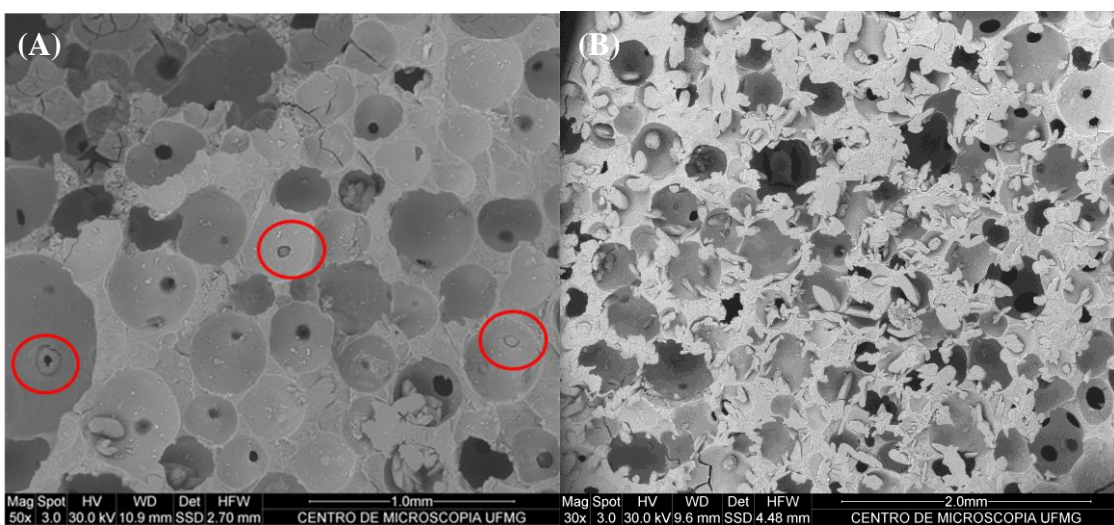


Figura 5. 8: Micrografia da superfície interna (A) e externa (B) da amostra de vidro

bioativo após 21 dias de teste dinâmico. Os círculos vermelhos evidenciam a deposição da camada de HÁ no interior dos poros do interior das amostras.

Além do MEV, foi realizado EDS na camada de material que recobria a superfície das amostras (Figura 5.9) e o resultado, apesar de qualitativo, evidenciou um espectro diferente do realizado para a amostra de vidro bioativo antes da imersão em SBF (Figura 5.9), onde os picos de cálcio e fósforo apareceram mais evidentes que o de silício.

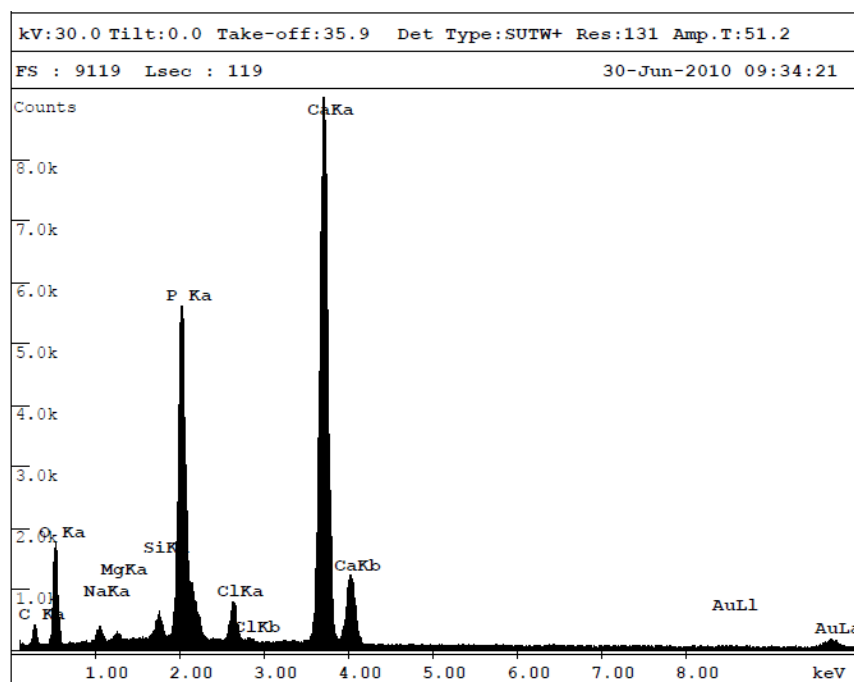


Figura 5. 9: Espectro de EDS representativo dos testes estático e dinâmico evidenciando os componentes presentes na camada que recobre a espuma de vidro bioativo após a imersão em SBF.

De acordo com a literatura, os cristais de HA aparecem nas micrografias eletrônicas sob a forma de agulhas ou tabletes alongados (COELHO, 2003). Portanto, a camada de material formada sobre as superfícies das amostras de vidro bioativo quando imersas em SBF pode ser considerada uma camada de fosfato de cálcio.

Os testes de DRX e FTIR foram realizados para confirmar se as estruturas formadas realmente se tratavam da camada de HCA. A Figura 5.10 representa o difratograma da amostra de espuma de vidro bioativo após a imersão em SFB. Diferente do difratograma da espuma de vidro seca (Figura 5.10) que se apresentou amorfo, este apresentou picos

característicos de fase cristalina. Os picos 002, 216, 211, 112, 310 e 213, que foram representados na figura, estão de acordo com os picos característicos da hidroxiapatita (ORÉFICE *et al*, 2006).

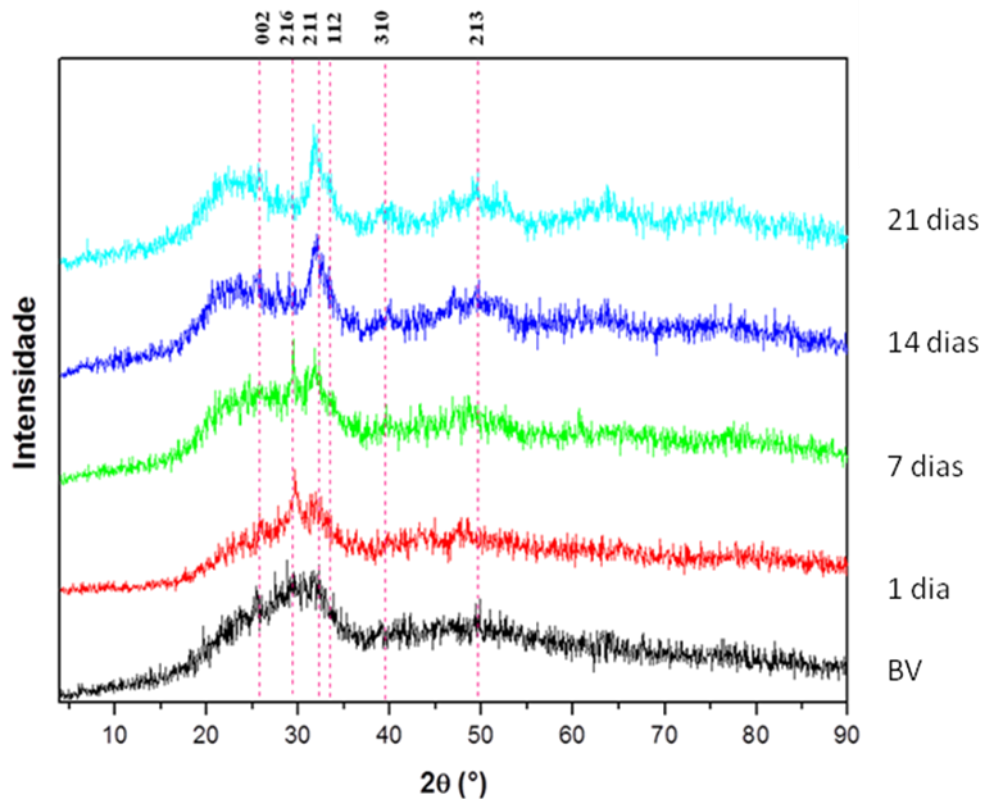


Figura 5. 10: Espectro de DRX evidenciando os picos cristalinos da camada de HCA sobre a superfície da espuma de vidro bioativo após a imersão em SBF em 1, 7, 14 e 21 dias e do material sem imersão (BV).

A evolução dos resultados de FTIR em ambos os testes estático e dinâmico apontam para a formação de uma camada de HCA (Figura 5.11), pois novas bandas aparecem após a imersão do vidro bioativo em SBF e suas intensidades aumentam com o tempo. As novas bandas formadas podem ser relacionadas ao grupamento fosfato a 1043, 963, 603, 566 e 469 cm^{-1} e ao grupo carbonato a 874 cm^{-1} . O espectro de FTIR da superfície do vidro bioativo neste teste é similar ao espectro da HCA encontrado na literatura (RÁMILA & VALLET-REGÍ, 2001).

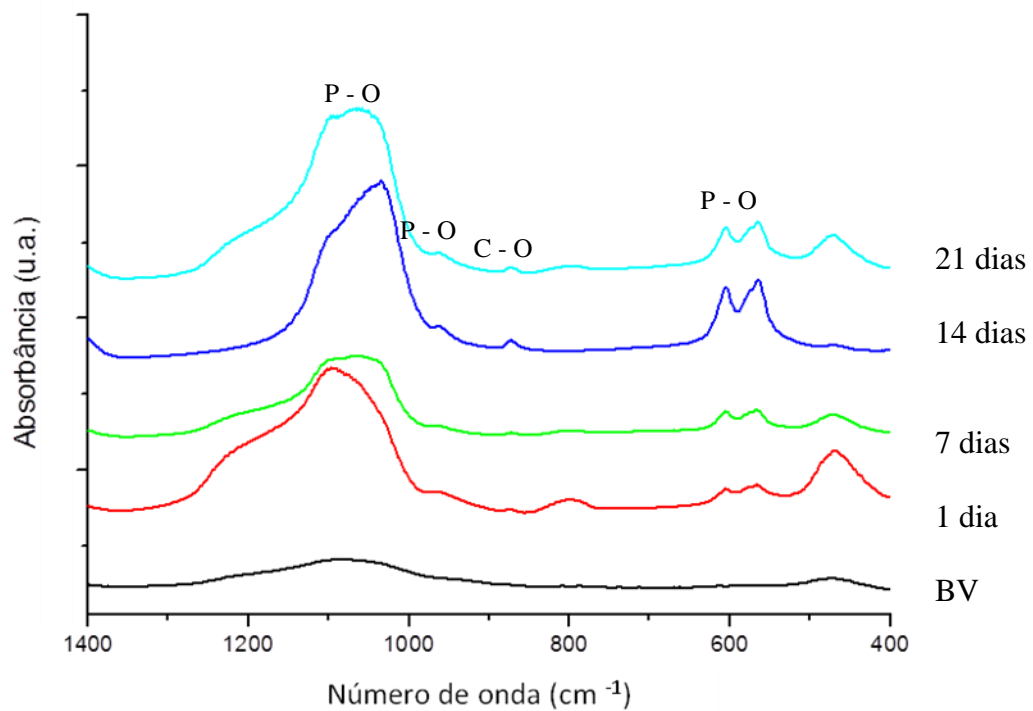


Figura 5. 11: Espectro de FTIR representativo dos testes estático e dinâmico obtido da superfície da espuma de vidro bioativo após a imersão em SBF.

Portanto, de acordo com os resultados dos testes MEV, EDS, DRX e FTIR associados, pôde-se concluir que a camada formada sobre a superfície e poros da espuma de vidro bioativo após a imersão em SBF, de característica cristalina, composta principalmente por cálcio e fósforo, se trata da camada de HCA.

Um aspecto importante é que a camada de HCA depositada tende a reduzir a área superficial do vidro que está em contato com o SBF. Os vidros bioativos se degradam *in vivo*, dessa forma, uma degradação a longo prazo deve ser devido à ação de osteoclastos, o que é preferível à degradação contínua pela dissolução aquosa que pode ser muito rápida para permitir que a remodelação óssea ocorra, que pode levar semanas ou meses, dependendo do local a ser tratado (YUE *et al*, 2011).

O teste de degradação e bioatividade realizado avaliou o comportamento das amostras quando imersas em SBF de maneira estática e dinâmica. Comparativamente, o teste

dinâmico apresentou resultados mais interessantes quando se idealiza o uso do biorreator de perfusão para o cultivo de células. Resultado observado pela manutenção do pH da solução, visto que há uma grande preocupação quando do preparo dos meios de cultura usuais para as células-tronco, onde o pH ideal deve variar entre 7,2 e 7,4.

Outra questão a ser analisada foi a perda de massa, menor e mais uniforme nas amostras cultivadas de maneira dinâmica, provavelmente devido à maior deposição da camada de HCA na superfície externa e de poros. Esta deposição pode ainda acarretar em uma redução da degradação do biomaterial. Portanto, estes resultados associados aos resultados de MEV, EDS, DRX e FTIR, demonstraram que o fluxo da solução de SBF do biorreator foi capaz de permear as amostras de maneira a depositar a camada de HCA no interior e nas interconexões dos poros. Essa capacidade do fluxo de permear a amostra é o grande objetivo do uso de um biorreator no cultivo de células semeadas sobre matrizes tridimensionais, onde a difusão, tanto de nutrientes para as células, quanto de produtos de excreção celular, é deficiente no interior das matrizes e pode levar ao não povoamento dessa região ou à morte celular. A realização desse teste foi crucial para averiguar se o fluxo produzido pelo biorreator desenvolvido neste trabalho seria capaz de cumprir seu papel de permear as amostras e dessa forma, poderia ser usado para suprir as necessidades nutricionais das células no interior das matrizes.

Após a realização dos testes de degradação e bioatividade, os próximos passos foram os testes com as células escolhidas para este trabalho. Portanto, a próxima etapa foi a obtenção de uma quantidade adequada de células-tronco do tecido adiposo humano.

5.3. Isolamento e Cultivo das Células-Tronco a Partir do Tecido Adiposo Humano

As culturas primárias obtidas após o processamento enzimático do lipoaspirado eram compostas por uma população heterogênea de células, apresentando células aderentes à 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 do meio de cultura basal, o número de células não aderentes diminuiu, predominando a população de células aderentes de formato fusiforme, com potencial de auto-renovação e formação de colônias (Figura 5.12).

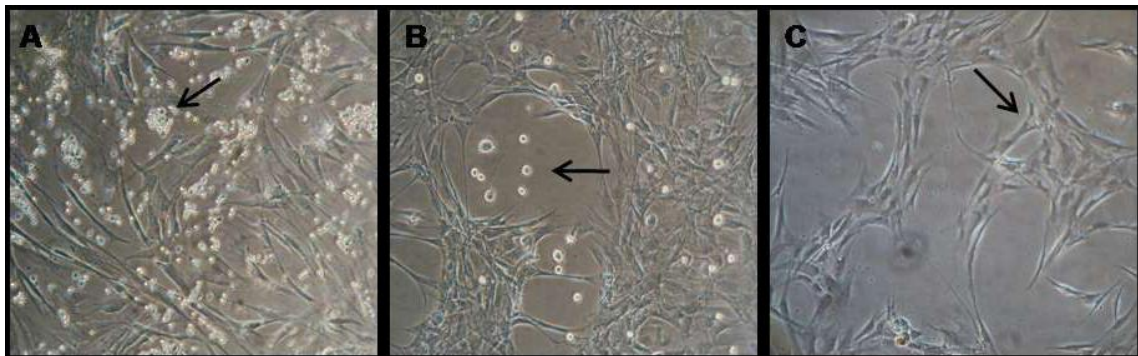


Figura 5. 12: Aspectos da morfologia das células extraídas do tecido adiposo humano. Em (A) população heterogênea de hASC na 1^a passagem com células não aderentes (seta); em (B) hACS na 2^a passagem com uma pequena população de células não aderentes (seta); e em (C) hASC na 4^a passagem, ausência de células não aderentes, população homogênea de células aderentes, fusiformes e capazes de formar colônias (seta).

Portanto, as hASC isoladas a partir da fração vascular estromal resultante do processamento dos lipoaspirados demonstrou resultados satisfatórios, apresentando células com formato tipo fibroblastóide e aderentes a superfície plástica, corroborando com os dados de Zuk (ZUK *et al*, 2001).

5.4. Determinação de Metodologia de Cultivo das hASC em Meio Independente de CO₂

Devido às condições impostas pela montagem do biorretor, tornou-se necessária a adaptação das hASC a um meio de cultura que não necessitasse de CO₂ para a manutenção do pH do meio.

5.4.1. Viabilidade e Proliferação Celular

De acordo com o teste de viabilidade e proliferação celular, quando comparado ao grupo controle - hASC na quarta passagem em meio DMEM - o grupo que apresentou o

melhor resultado foi o G1 de adaptação mais lenta e gradual ao meio LEI quando comparado aos grupos de adaptações mais rápidas (Figura 5.13). Quando o meio continha 100% de LEI nos três grupos testados, o resultado de absorbância do G1 foi o que mais se aproximou à absorbância das hASC cultivadas em meio DMEM.

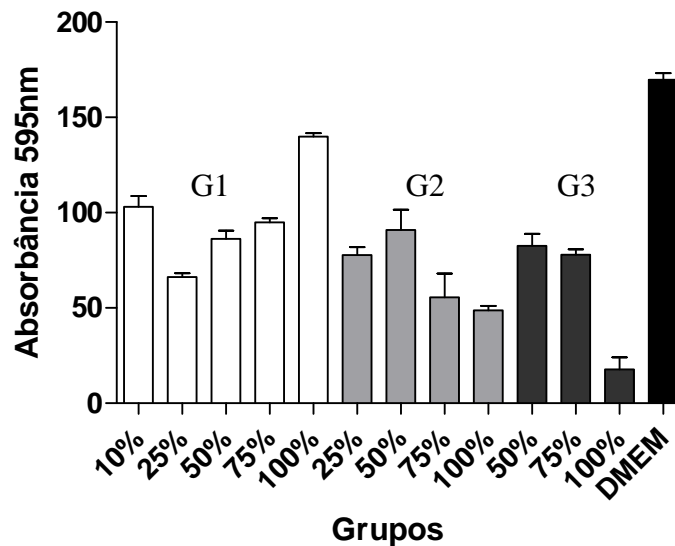


Figura 5. 13: MTT comparativo entre as hASC cultivadas em meio DMEM e os grupos G1, G2 e G3 de adaptação gradativa das hASC ao meio LEI, no qual a adaptação mais lenta - G1 - apresentou o melhor resultado.

5.4.2. Atividade da Fosfatase Alcalina

O teste de avaliação da atividade da fosfatase alcalina também foi utilizado para comparar o desempenho de produção dessa enzima pelas hASC nos diferentes grupos de adaptação ao meio LEI quando comparadas ao meio controle DMEM. Assim como no teste de viabilidade e proliferação celular, o grupo que apresentou o resultado mais semelhante ao controle foi o G 1, ou seja, o grupo de adaptação mais lenta das hASC do meio DMEM ao meio LEI (Figura 5.14).

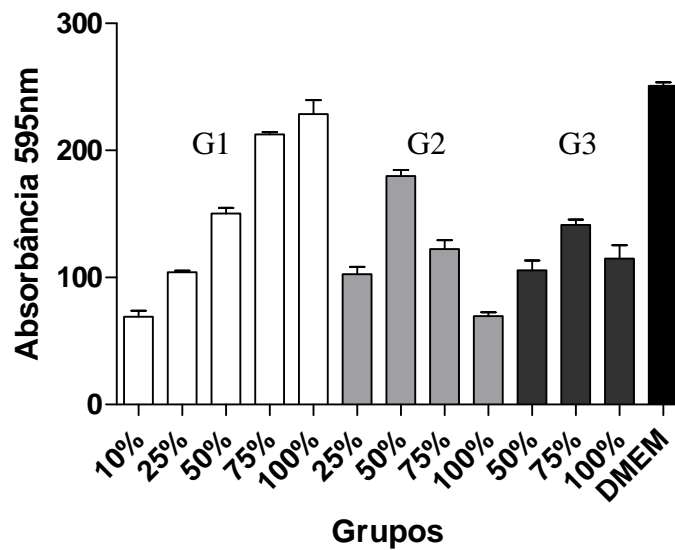


Figura 5. 14: Teste da FA comparativo entre as hASC cultivadas em meio DMEM e os grupos G1, G2 e G3 de adaptação gradativa das hASC ao meio LEI, no qual a adaptação mais lenta do G1 apresentou o melhor resultado.

De acordo com os resultados acima, nos quais ficou demonstrado que as hASC necessitam de um período de adaptação mais gradual a um meio de cultura não usual, houve a necessidade de realizar alguns testes básicos comparativos entre as hASC cultivadas em meio DMEM e meio LEI, como forma de avaliar se as células cultivadas em meio LEI apresentariam as mesmas características morfológicas e funcionais das células cultivadas em meio convencional DMEM.

5.5. Estudos Básicos Comparativos em Culturas de hASC

O primeiro teste comparativo entre as hASC em meio DMEM e LEI foi realizado por microscopia ótica (MO). Quando comparadas desde a segunda passagem, hASC cultivadas em meio DMEM e em adaptação ao meio LEI apresentaram aspectos bastante semelhantes como aderência ao plástico, formação de colônia e perfil de crescimento (Figura 5.15).

Observa-se ainda que, na quarta passagem, há uma densidade de população celular maior em meio LEI quando comparadas ao meio DMEM, o que sugere uma excelente adaptação ao novo meio proposto.

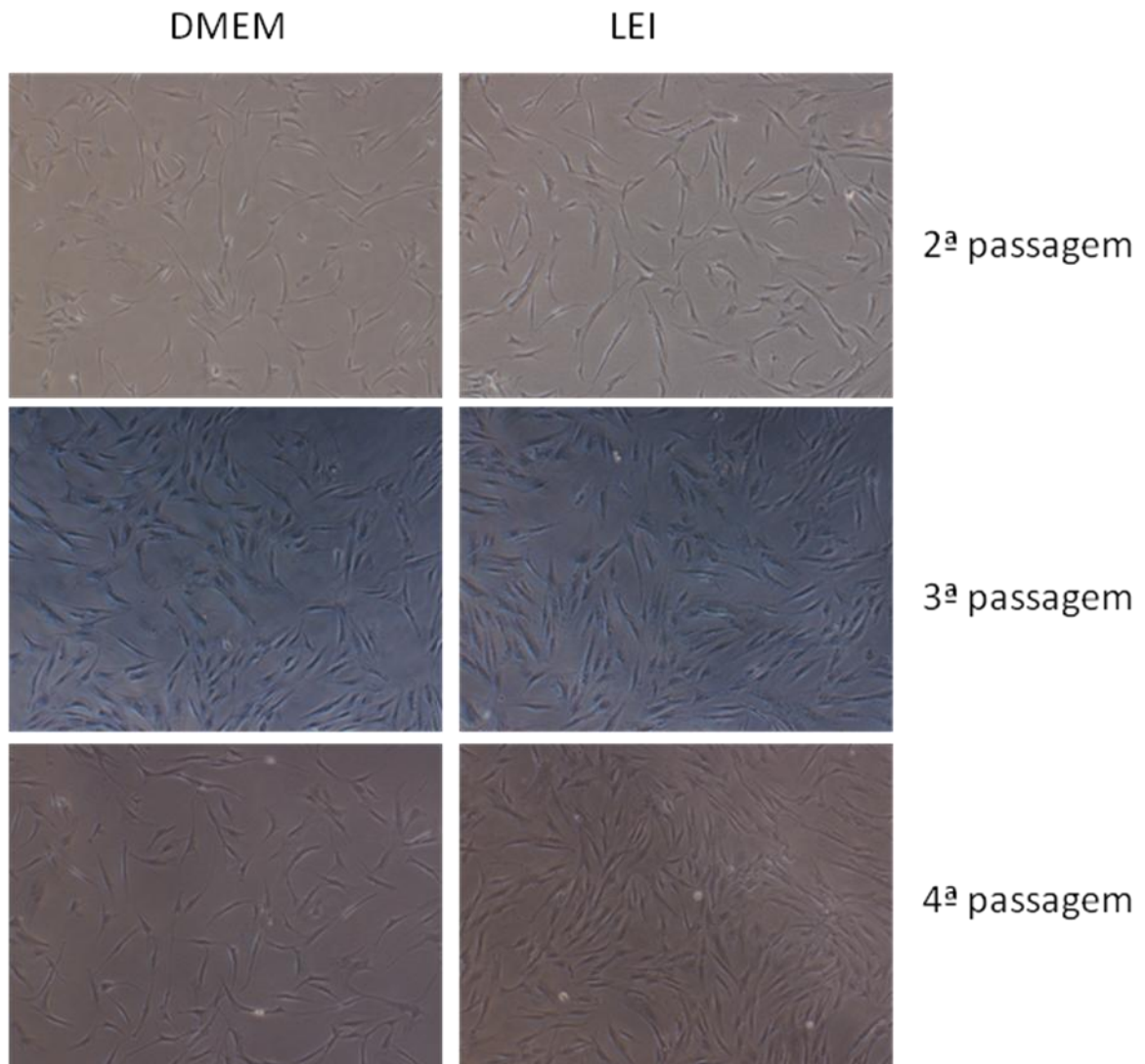


Figura 5. 15: Imagens obtidas por MO das hASC cultivadas em meio DMEM e em adaptação ao meio LEI da 2ª à 4ª passagem.

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 em ambas as culturas de hASC.

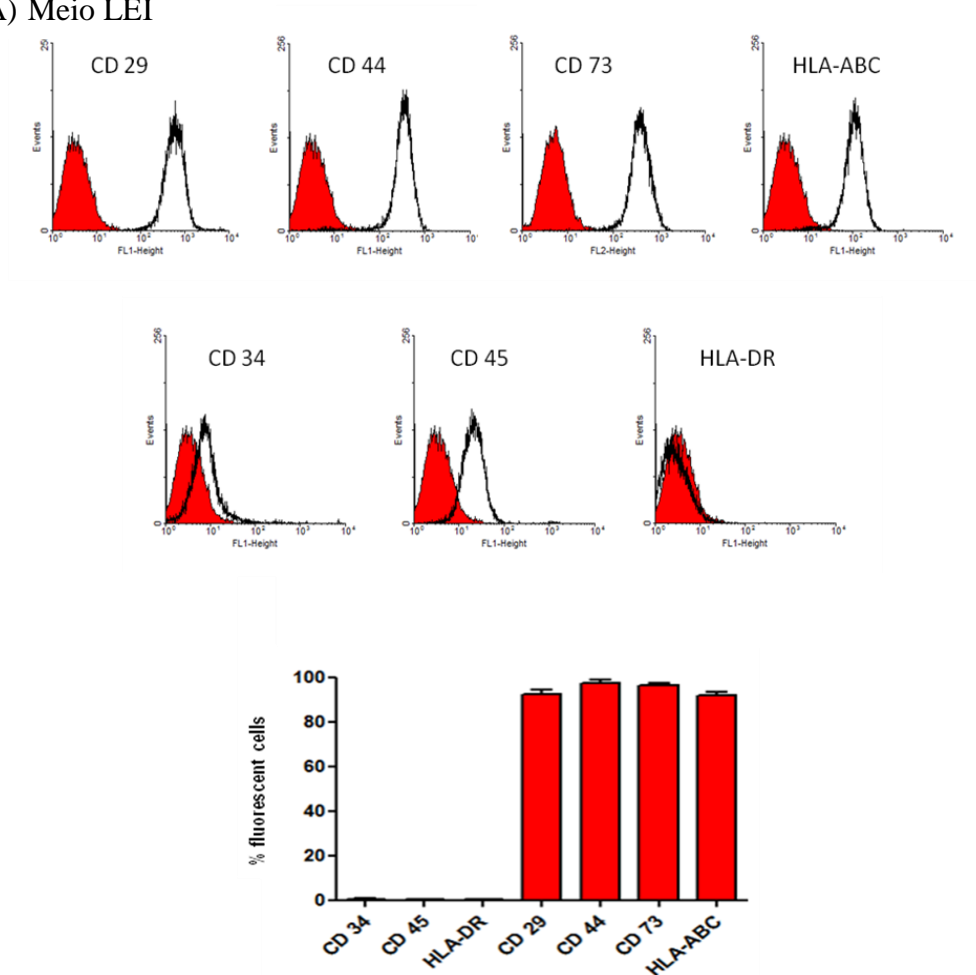
5.5.1. Caracterização do Imunofenótipo das hASC

Como uma população celular pode ser definida pelos tipos de antígenos expressos na membrana plasmática de suas células, na 5ª passagem foi feita a análise fenotípica das células cultivadas em meio DMEM e LEI. As células foram incubadas com anticorpos

específicos para os seguintes marcadores: CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, HLA-ABC e HLA-DR.

A população escolhida para a análise dos marcadores de superfície foi determinada a partir de um gráfico de tamanho *versus* granulosidade obtido de células sem nenhum tipo de marcação. A análise dos histogramas demonstrou que aproximadamente 96% das células cultivadas em meio LEI expressam CD 29, 96% expressam CD 44, 96% expressam CD 73 e 96% expressam HLA-ABC. O CD 34 foi expresso em 5%, o CD 45 em 2% e o HLA-DR em menos de 1% das células (Figura 5.16).

(A) Meio LEI



(B) Meio DMEM

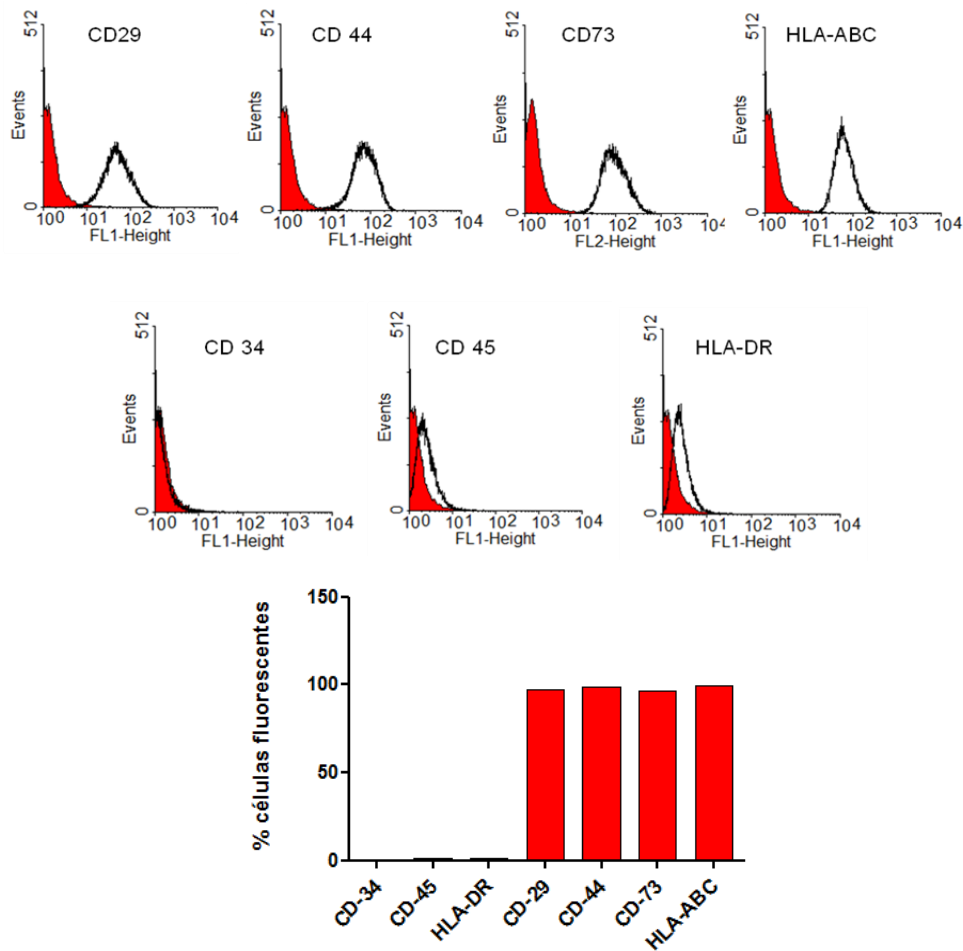


Figura 5. 16: Análise fenotípica através de citometria de fluxo das hASC cultivadas em meio (A) LEI e (B) DMEM. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva vermelha é o controle negativo da fluorescência, a linha preta apresenta a população de células avaliada para um marcador específico e o seu deslocamento para direita indica a existência da marcação.

As hASC cultivadas tanto em meio DMEM quanto em meio LEI constituíram, *in vitro*, uma população homogênea de células que expressaram os marcadores de superfície característicos de MSC: CD29, CD44, CD73 e o HLA-ABC e não expressaram os marcadores de linhagens hematopoiéticas: CD34 e CD45 e o HLA-DR, não havendo interferência do tipo de meio de cultura utilizado 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.

A caracterização do imunofenótipo das células é fundamental para informar o grau de pureza da cultura. Dessa forma, tendo em vista a boa adaptação das hASC ao meio LEI e os resultados positivos em relação às análises morfológica e fenotípica quando comparadas às hASC cultivadas em meio DMEM, tornou-se imprescindível avaliar o cultivo destas células nos tempos usualmente testados para avaliar a diferenciação osteogênica.

5.5.2. Cultivo Comparativo das hASC em Meios DMEM e LEI

As hASC foram induzidas à diferenciação osteogênica através da adição de meio de diferenciação, que contém ácido ascórbico, β -glicerolfosfato e dexametasona. Para verificar se ocorreu diferenciação das hASC, foram realizados os ensaios de viabilidade e proliferação celular, produção da fosfatase alcalina, dosagem de colágeno e imunofluorescência utilizando anticorpos para moléculas específicas de células osteogênicas. Esses ensaios foram realizados tanto com células cultivadas no meio de cultura basal como com células cultivadas em meio de diferenciação após 7, 14 e 21 dias de indução.

Viabilidade e Proliferação Celular

A viabilidade e proliferação celular das hASC cultivadas em ambos os meios DMEM e LEI foram avaliadas pelo ensaio de MTT, que consiste na metabolização do reagente MTT por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, levando à formação de cristais de formazan. Esses cristais foram observados durante o ensaio das hASC cultivadas em ambos os meios de cultura (Figura 5.17).

Após a solubilização dos cristais com SDS-HCl 10%, foi feita a leitura de absorbância a 595nm. Na Figura 5.18, é possível observar que houve uma maior proliferação das hASC após 14 dias de cultivo em ambos os meios suplementados com fatores osteogênicos quando comparados aos meios basais.

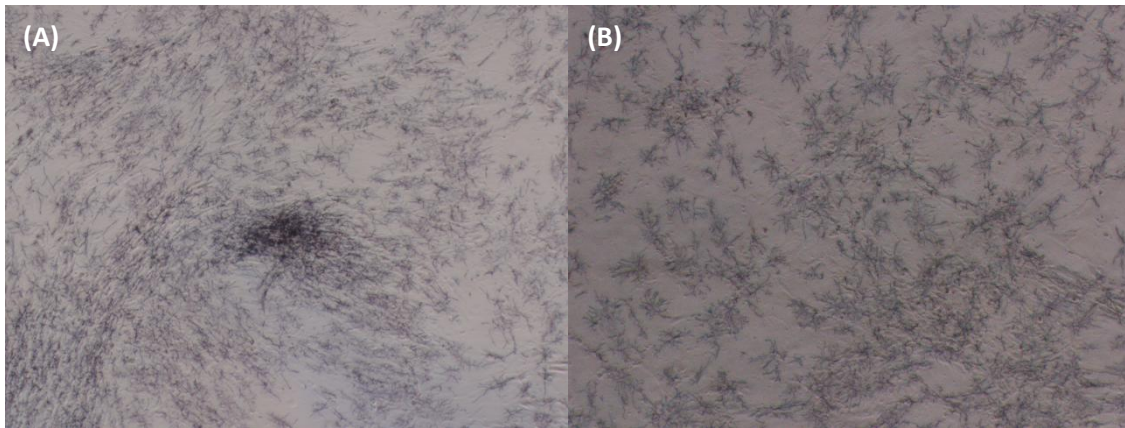


Figura 5. 17: Visualização por MO dos cristais de formazan no ensaio de MTT.hASC cultivadas em (A) DMEM e (B) LEI. Aumento: 100x.

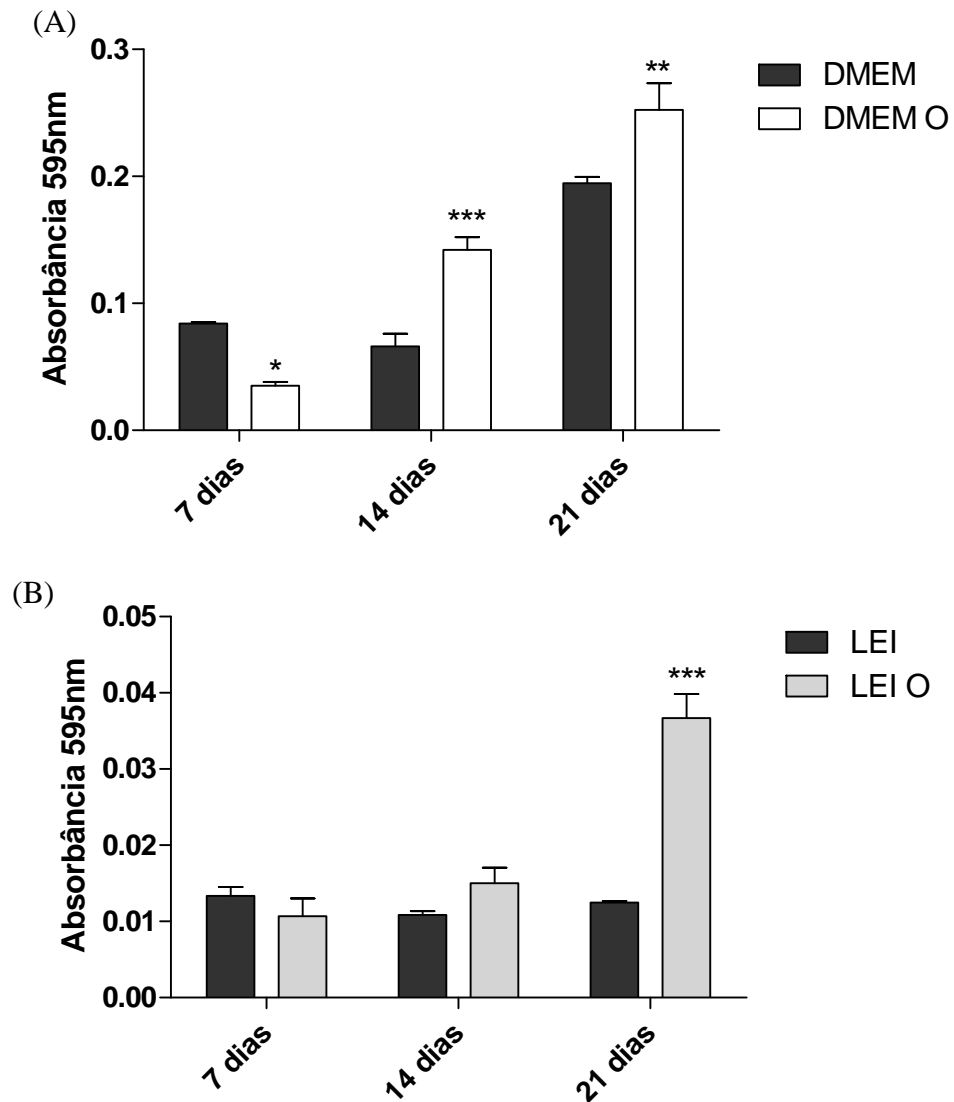


Figura 5. 18: Representação gráfica da proliferação celular das hASC cultivadas em meio DMEM e DMEM O (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ DMEM x DMEM O em cada tempo) (A) e LEI e LEI O (***) $p < 0,001$ LEI x LEI O em cada tempo) (B).

As células cultivadas em todos os meios testados foram capazes de metabolizar o MTT e produzir cristais de formazan. Inicialmente, as células em ambos os meios basais apresentaram crescimento um pouco maior que aquelas cultivadas em meios osteogênicos. Pode-se sugerir uma menor proliferação celular graças a uma mudança de composição dos meios, que foram suplementados com fatores osteogênicos. Em seguida, o aumento da absorvância a partir do 14º dia nas hASC cultivadas nos meios osteogênicos indicam que o suplemento utilizado favoreceu a proliferação dessas células até o 21º dia de teste. Nota-se também que as células cultivadas em meio LEI seguiram um perfil de crescimento semelhante ao observado nas células cultivadas em meio DMEM.

Atividade da Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima presente em células indiferenciadas, por isso é utilizada como um marcador de células-tronco, entretanto, essa enzima é produzida em altos níveis na fase inicial da diferenciação osteogênica, sendo considerada um marcador precoce da diferenciação (BRUDER *et al*, 1998). Sendo assim, o ensaio de produção de fosfatase alcalina foi realizado para verificar se as células cultivadas em meio LEI mantinham níveis semelhantes de produção quando cultivadas em meio DMEM.

No ensaio de produção da fosfatase alcalina, o precipitado na cor púrpura é formado quando a enzima cliva o grupamento fosfato presente no BCIP, produzindo um próton que reduz o NBT. Através da MO, foi possível observar o precipitado púrpura nas hASC cultivadas em meio DMEM O e LEI O. (Figura 5.19).

A Figura 5.20 mostra que os níveis de produção da fosfatase alcalina aumentaram ao longo do tempo de cultivo das hASC em meio DMEM, especialmente quando cultivadas em meio DMEM O, enquanto que nas células cultivadas em meio LEI, os níveis de produção da fosfatase alcalina aumentaram significativamente em todos os tempos estudados quando em meio osteogênico.

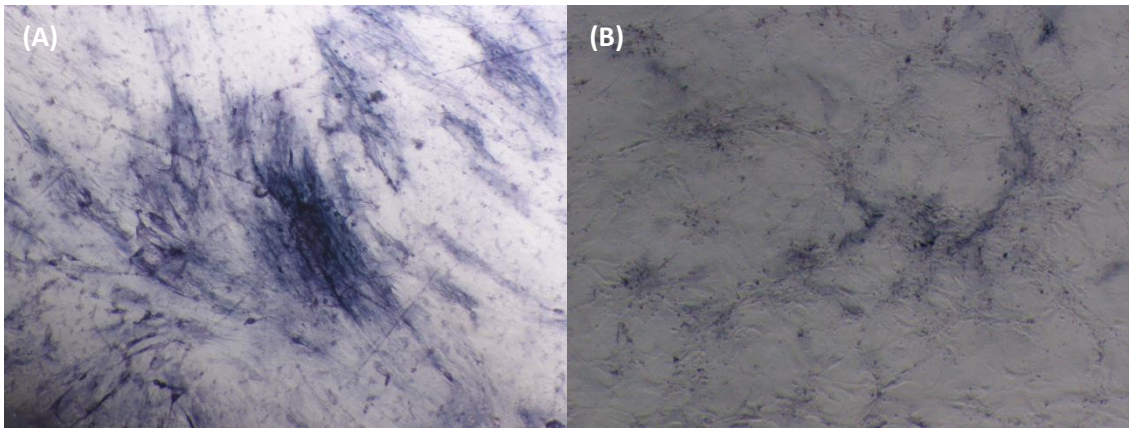


Figura 5. 19: Visualização por MO do precipitado púrpura no ensaio de produção da fosfatase alcalina. hASC cultivadas em (A) DMEM O e (B) em LEI O. Aumento: 100X.

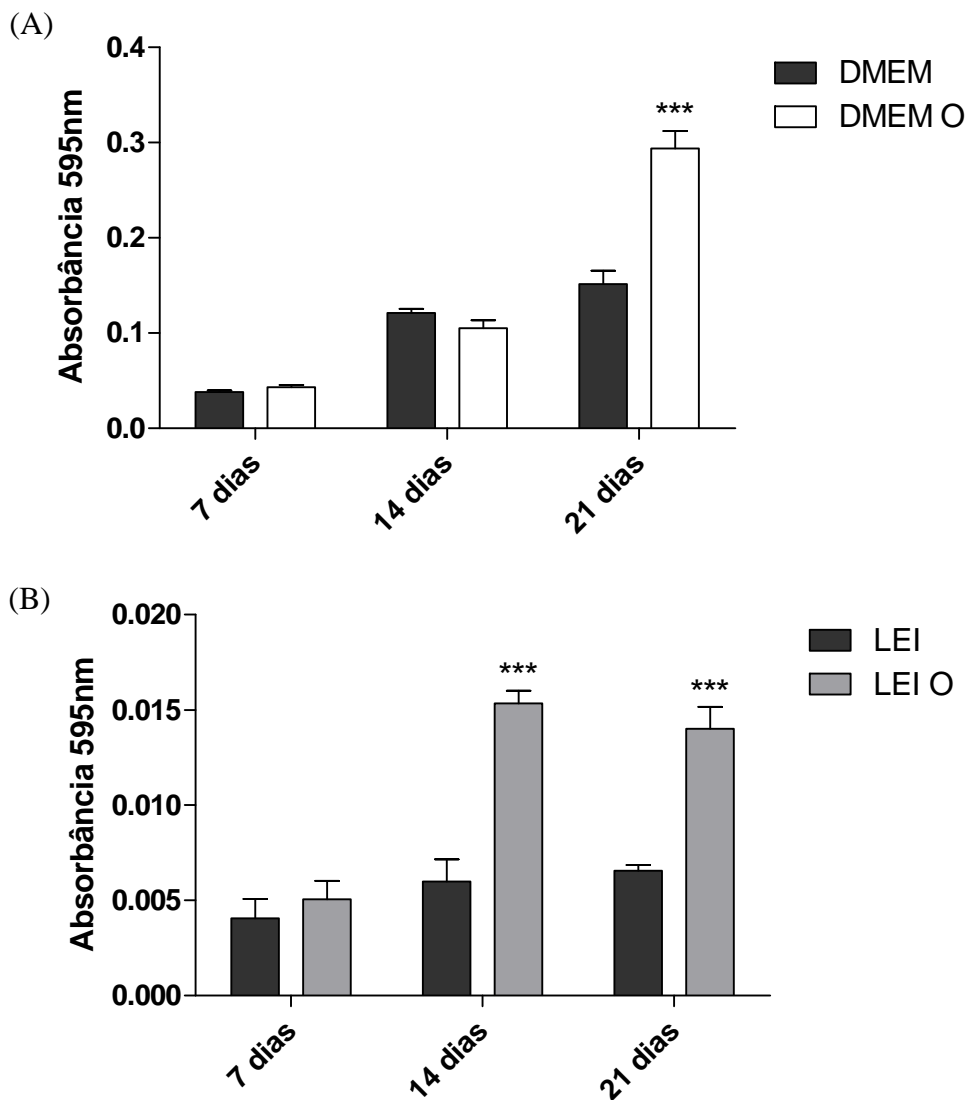


Figura 5. 20: Representação gráfica da detecção da atividade da fosfatase alcalina em hASC cultivadas em (A) DMEM e DMEM O (***) $p < 0,001$ DMEM x DMEM O) e em (B) LEI e LEI O (***) $p < 0,001$ LEI x LEI O em cada tempo).

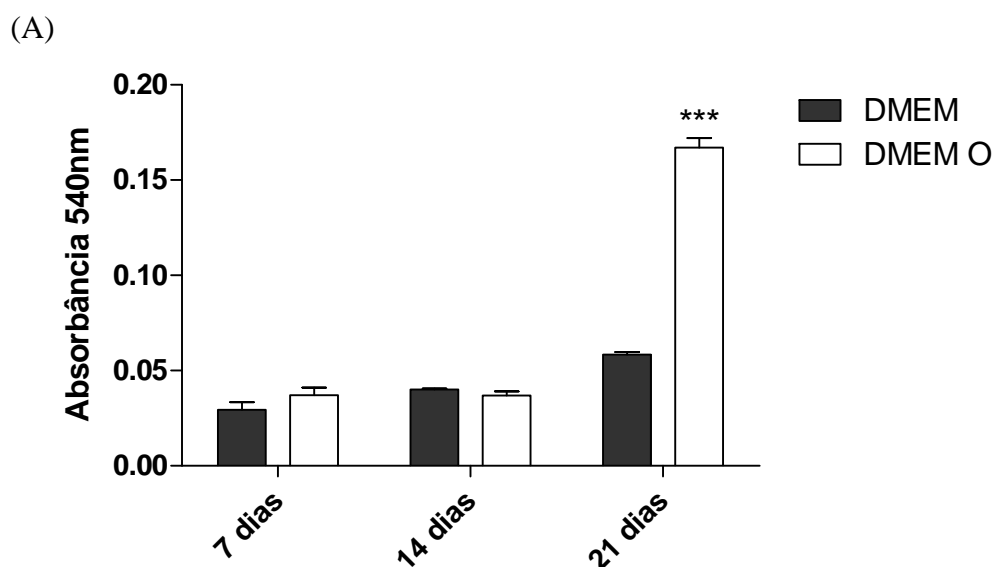
Quando comparados os gráficos da atividade da fosfatase alcalina, levando-se em consideração os gráficos do ensaio de MTT, observa-se que os níveis da absorbância foram superiores no 14º dia para as células cultivadas em meio LEI O com manutenção dessa produção até o 21º dia, enquanto que no meio DMEM O, os níveis de absorbância foram significativamente superiores no 21º dia de cultivo.

Nota-se um pico de atividade da enzima fosfatase alcalina em 14 dias de cultivo em meio LEI O, o que está de acordo com a literatura (BRUDER *et al*, 1998; PAYUSHINA *et al*, 2006).

Avaliação da Síntese de Colágeno

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

Pôde-se observar na Figura 5.21 um aumento significativo da síntese de colágeno a partir do 21º dia nas células cultivadas em meio DMEM O, enquanto que nas hASC cultivadas em meio LEI O, o aumento na síntese de colágeno ocorreu a partir do 7º dia de cultivo, tendo seu pico no 14º dia.



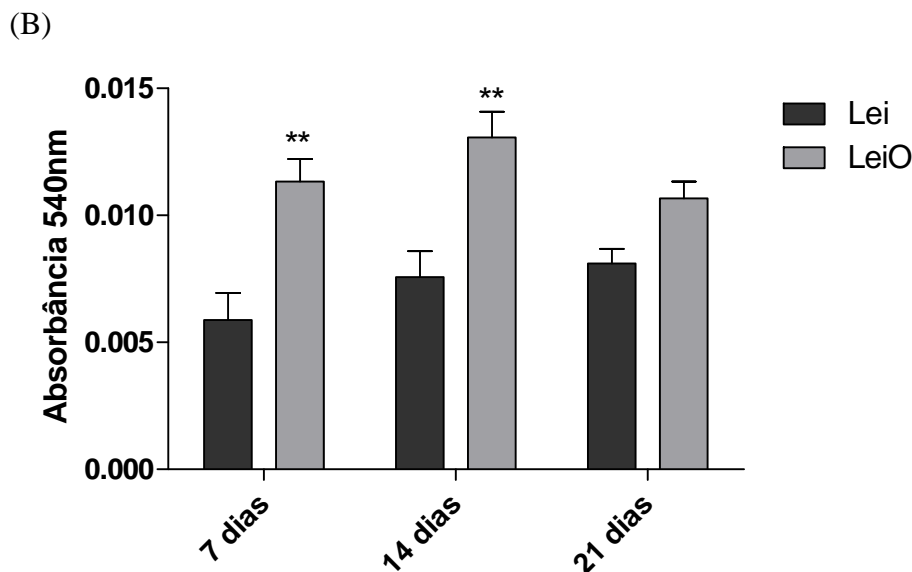


Figura 5. 21: Representação gráfica da síntese de colágeno por hASC cultivadas em (A) DMEM e DMEM O (***) $p < 0,001$ DMEM x DMEM O) e em (B) LEI e LEI O (** $p < 0,01$ LEI x LEI O).

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). Dessa forma, os níveis da absorbância produzidos pela síntese de colágeno pelas hASC cultivadas em meio LEI O sugerem já haver um comprometimento com o fenótipo osteogênico a partir do 7º dia de cultivo.

Uma observação experimental que merece ser destacada: em todos os gráficos de MTT, fosfatase alcalina e dosagem de colágeno, as absorbâncias das hASC cultivadas em meio DMEM são cerca de 1 ordem de grandeza maior que as cultivadas em meio LEI. Pode-se atribuir essa diferença às condições de cultivo, já que ao microscópio ótico foi possível detectar que as hASC cultivadas em meio LEI em garrafas T75 totalmente vedadas proliferavam significativamente mais que as cultivadas em placas de cultivo, mesmo quando vedadas com parafilme ou fita-crepe. As Figuras 5.13 e 5.14 mostram que, quando cultivadas em garrafas T75 totalmente vedadas, as absorbâncias do meio LEI são comparáveis às do meio DMEM. Pode-se sugerir dessa forma que o meio LEI seja mais eficaz em um ambiente totalmente livre de CO₂.

Avaliação da Expressão de Marcadores de Células da Linhagem Osteogênica

Para determinar se durante o processo de indução da diferenciação as hASC passaram a expressar marcadores de células osteogênicas, foi realizado o ensaio de imunofluorescência utilizando-se anticorpos específicos para osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I. Esse ensaio foi realizado com células cultivadas em meios LEI e LEI O após 7, 14 e 21 dias de indução.

Verificou-se, em microscópio confocal, a expressão das proteínas específicas. As imagens obtidas foram aqui representadas em painéis, dispostas na primeira coluna as imagens adquiridas pela fluorescência do microscópio (luz UV) que representam os núcleos celulares pela marcação em azul. Na segunda coluna, as imagens adquiridas utilizando o laser 488 representam a marcação das proteínas específicas (anticorpo específico) pela fluorescência verde. Na terceira coluna, as imagens representam uma sobreposição das imagens adquiridas em diferentes comprimentos de onda.

Dessa forma, observou-se que as células cultivadas em meio de cultura basal não apresentaram marcação para as três proteínas testadas. Já as células cultivadas em meio de diferenciação passaram a expressar as três proteínas em pequena quantidade a partir do sétimo dia de indução. A expressão desses marcadores permaneceu e se intensificou após 14 e 21 dias de indução osteogênica (Figuras 5.22, 5.23 e 5.24).

A osteopontina pode ser expressa em diversos tecidos, inclusive no osso onde é produzida por osteoblastos em diferentes estágios de maturação. Durante a formação óssea *in vitro*, ocorre uma produção inicial de osteopontina e esta se encontra em níveis altos de expressão mesmo após a mineralização. A expressão de osteopontina intracelular em células osteogênicas, ainda em proliferação, parece estar relacionada à migração celular. Enquanto a osteopontina extracelular parece regular o processo de mineralização (SODEK *et al.*, 2000).

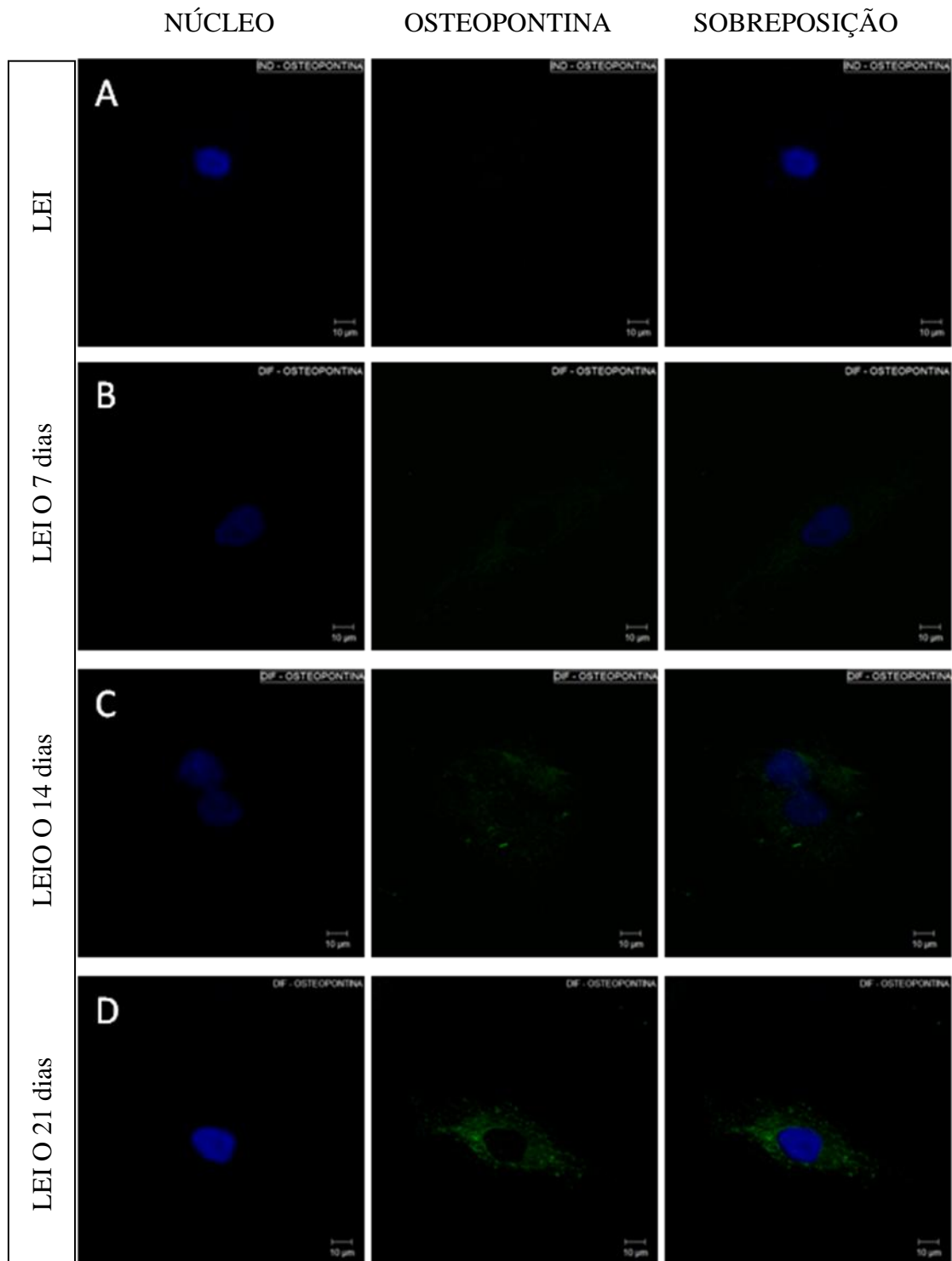


Figura 5. 22: Análise de imunofluorescência para a proteína osteopontina. (A) hASC cultivadas em meio LEI de cultura basal. hASC cultivadas em meio de diferenciação osteogênica após (B) 7, (C) 14 e (D) 21 dias.

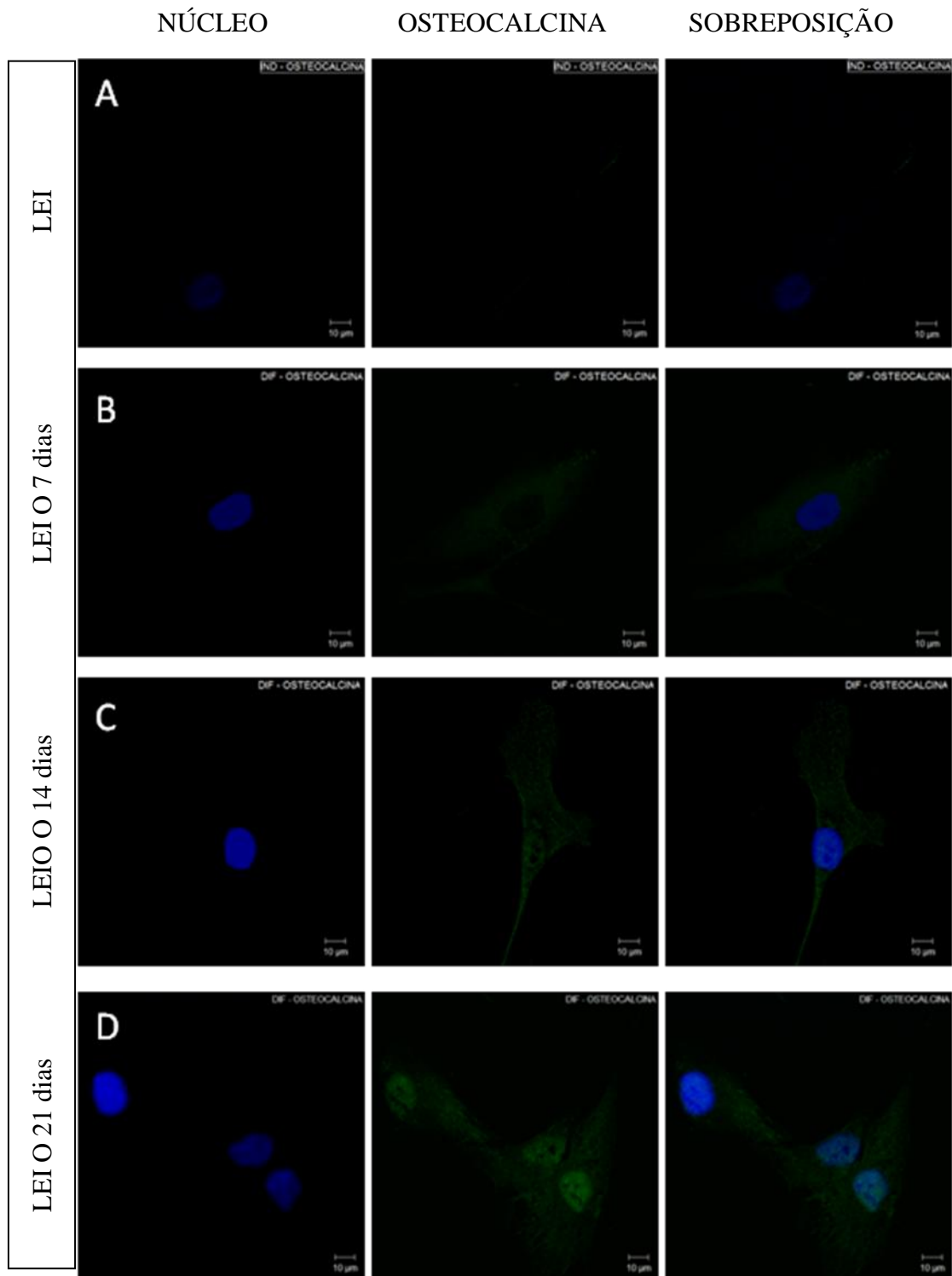


Figura 5. 23: Análise de imunofluorescência para a proteína osteocalcina. (A) hASC cultivadas em meio LEI de cultura basal. hASC cultivadas em meio de diferenciação osteogênica após (B) 7, (C) 14 e (D) 21 dias.

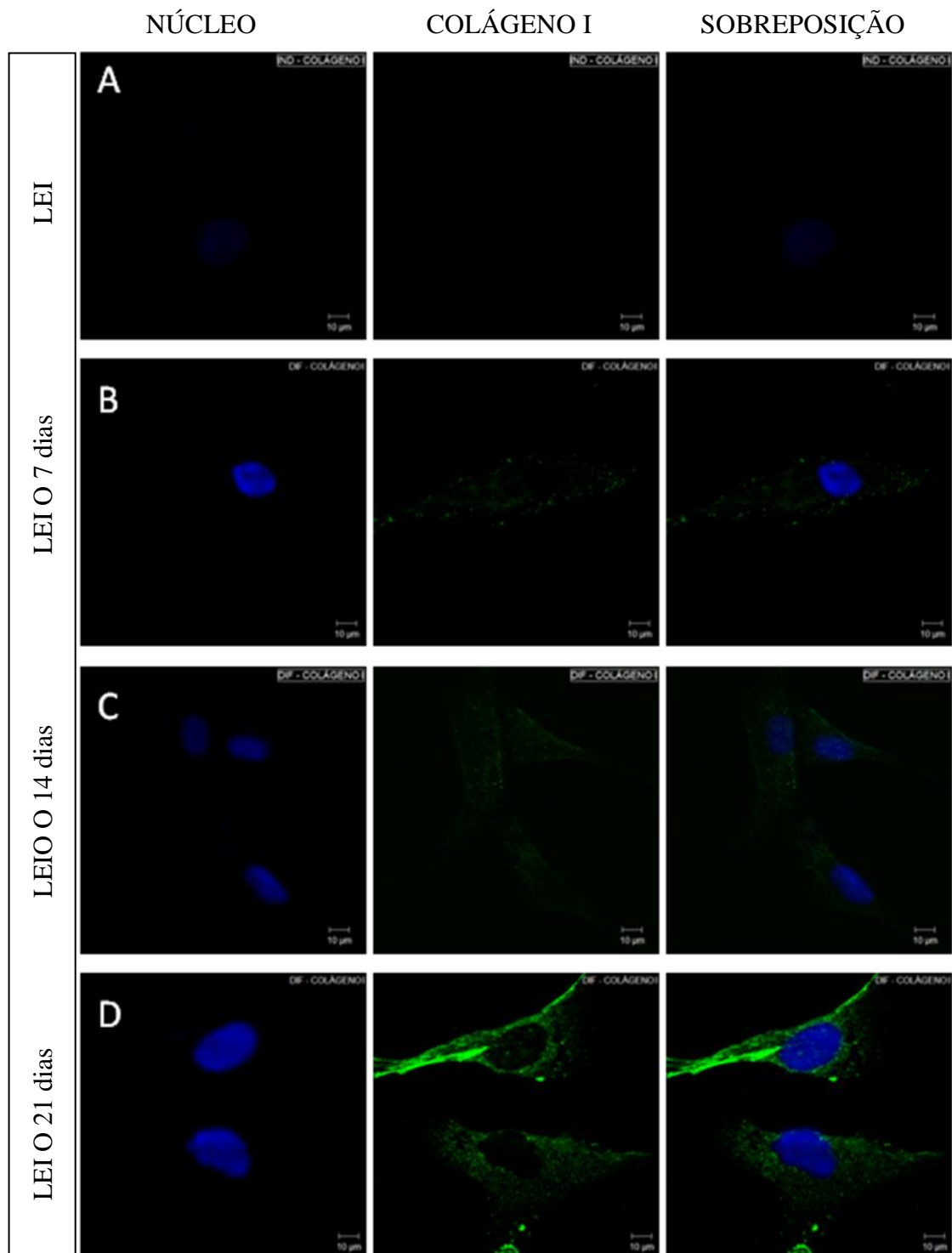


Figura 5. 24: Análise de imunofluorescência para a proteína colágeno tipo I. (A) hASC cultivadas em meio LEI de cultura basal. hASC cultivadas em meio de diferenciação osteogênica após (B) 7, (C) 14 e (D) 21 dias.

A osteocalcina, por sua vez, apresenta maior expressão somente na fase após a proliferação, concomitante com a mineralização da matriz extracelular. Portanto, sua

expressão é tardia no desenvolvimento de osteoblastos e contribui 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 prever 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 nos testes de atividade da fosfatase alcalina, dosagem de colágeno e imunofluorescência demonstram que houve um comprometimento das hASC na diferenciação osteogênica quando cultivadas em meio LEI osteogênico.

As células-tronco podem se diferenciar em osteoblastos dependendo apenas das condições do meio de cultivo, dessa forma, a dexametasona, o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato são fatores indispensáveis para a diferenciação (BRUDER *et al.*, 1998). A dexametasona induz o estágio inicial de diferenciação, que é acompanhado pelo aumento da expressão da fosfatase alcalina. Já o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato são essenciais para as células atingirem os estágios tardios da diferenciação, nos quais ocorrem a formação e a mineralização da MEC (PAYUSHINA *et al.*, 2006).

A adaptação das hASC ao meio Leibovitz independente de CO₂ é uma metodologia nova e foi desenvolvida neste trabalho para o uso desse meio no biorreator de perfusão adaptado ao banho-maria. Analisando os resultados dos testes comparativos entre os meios DMEM e LEI, pôde-se concluir que as células cultivadas em meio LEI apresentam similaridades morfológicas e fenotípicas com as cultivadas em meio DMEM e resultados adequados quando avaliadas a viabilidade e proliferação celular, atividade da fosfatase alcalina, dosagem de colágeno e expressão de marcadores da diferenciação osteogênica em meio LEI e LEI O.

A partir desses resultados, o meio de cultura de escolha para todos os testes comparativos estáticos e dinâmicos passou a ser o meio LEI suplementado com 10% de SBF como meio basal e suplementado com os fatores de indução osteogênica como meio de indução da osteogênese.

Apesar da cultura celular clássica em 2D ter fornecido a maior parte do conhecimento da biologia moderna, as células residem, proliferam e se diferenciam dentro do corpo em microambientes complexos em 3D. A estrutura 3D fornece uma plataforma ideal para a comunicação célula-célula e célula material e as propriedades do material podem ser variadas para promover diferenciação de células em linhagens específicas (DAWSON, 2008).

Portanto, o próximo passo após os testes de indução da diferenciação das hASC através do meio de cultura foi a colonização *in vitro* das espumas de vidro bioativo e avaliação da adesão, proliferação e diferenciação celular.

5.6. Cultivo Estático das hASC Semeadas nas Espumas de Vidro Bioativo

5.6.1. Avaliação da Colonização e Adesão Celular

Realizou-se a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura para verificar se as células estavam realmente aderidas à matriz de vidro bioativo. Após os períodos de incubação de 7, 14 e 21 dias, as amostras foram cuidadosamente processadas para obtenção das imagens (Figura 5.25).

As imagens obtidas revelaram células com aspecto morfológico homogêneo, formato achatado e com formação de prolongamentos citoplasmáticos com diversos pontos de adesão à matriz.

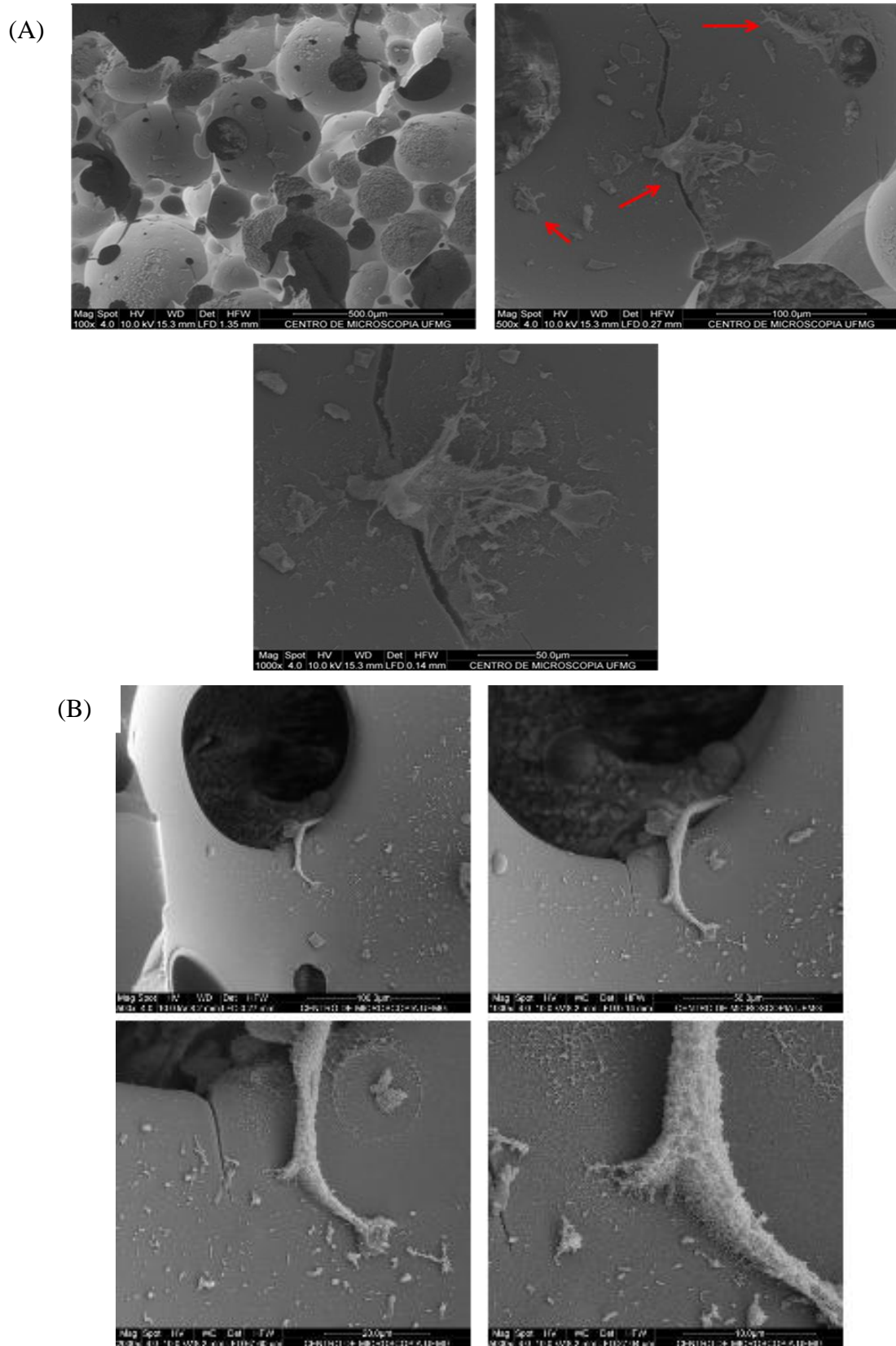


Figura 5. 25: Imagens por MEV evidenciando as hASC aderidas à matriz de vidro bioativo através de prolongamentos citoplasmáticos (A) 7 dias (setas) e (B) 21 dias.

Os resultados de MEV revelaram que as hASC foram capazes de aderir a superfície do material e proliferar. Portanto o tamanho dos poros e a interconectividade foram adequados, permitindo a colonização das matrizes.

5.6.2. Avaliação da Viabilidade e Proliferação Celular

A viabilidade e proliferação celular das hASC cultivadas em matrizes de vidro bioativo em meio LEI e LEI O foram avaliadas pelo ensaio de MTT.

Na figura 5.26, é possível observar que inicialmente houve uma proliferação maior nas células cultivadas em meio LEI, entretanto houve uma proliferação significativamente maior das hASC cultivadas em meio LEI O a partir do 14º dia de cultivo quando comparadas às células cultivadas em meio basal. Sugere-se que as células levaram alguns dias para se adaptarem à suplementação dos fatores de crescimento no meio LEI.

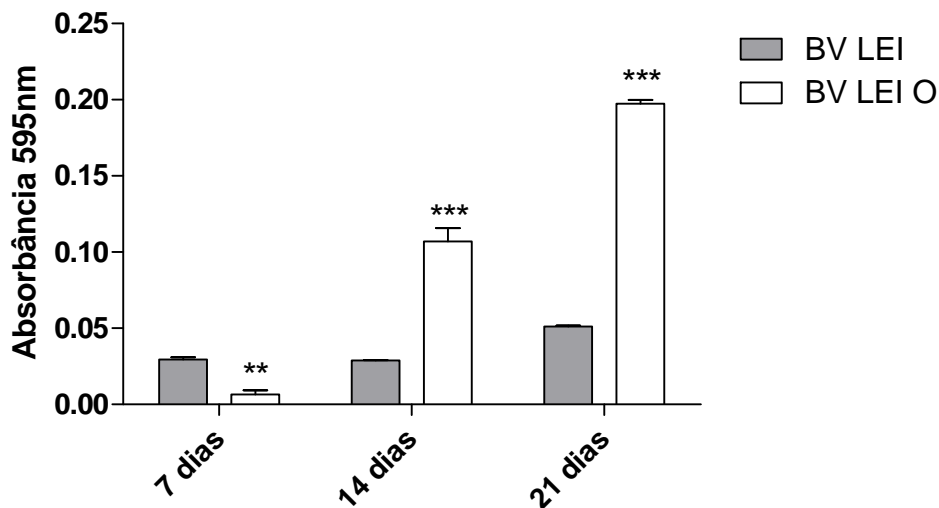


Figura 5. 26: Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ BV LEI x BV LEIO).

5.6.3. Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina durante a diferenciação osteogênica foi avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT. Pôde-se observar na Figura 5.27 uma atividade crescente da

fosfatase alcalina ao longo dos tempos avaliados nas células cultivadas tridimensionalmente em meio LEI O.

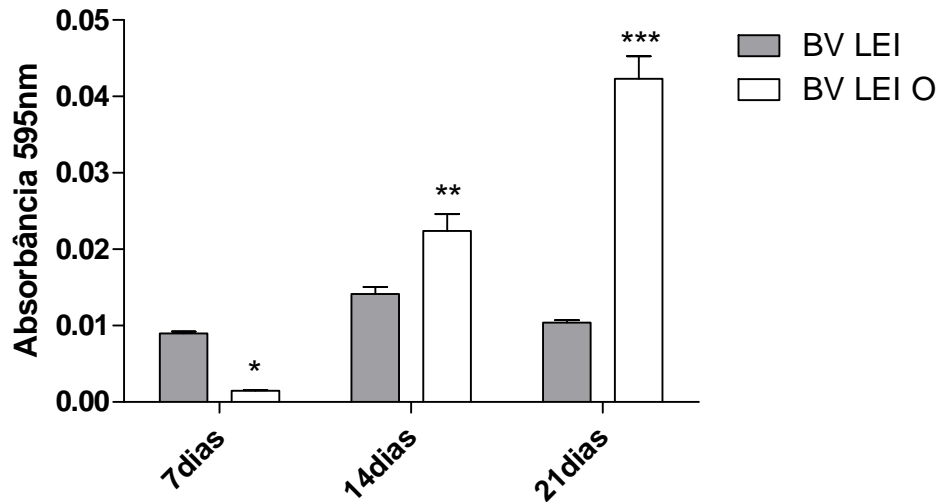


Figura 5. 27: Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ BV LEI x BV LEI O).

Entretanto, analisando o gráfico da atividade da fosfatase alcalina (Figura 5.27) junto com o gráfico de MTT (Figura 5.26), o grupo que mais produziu fosfatase alcalina foi o das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo em meio basal ao 14º dia de indução, sendo que essa produção se equiparou à produzida no tempo de 21 dias para os construtos cultivados na matriz em meio basal e osteogênico, demonstrando a influência positiva da matriz de vidro bioativo nas hASC.

Considerando o aumento da atividade da fosfatase alcalina, um marcador precoce das células em diferenciação osteogênica, o pico da atividade dessa enzima no 14º dia de cultivo na matriz de vidro bioativo sem a adição dos fatores de indução evidencia a ação do biomaterial sobre as células e pode indicar o início da diferenciação em um fenótipo osteogênico sem a adição dos fatores de indução osteogênicos.

5.6.4 Avaliação da Expressão de Marcadores de Células da Linhagem Osteogênica

As hASC cultivadas na matriz de vidro bioativo foram capazes de expressar osteopontina e colágeno tipo I a partir de 14 dias de cultivo, mesmo quando cultivadas somente em meio basal (Figura 5.28).

Este resultado corrobora com os ensaios de viabilidade e proliferação celular e atividade da fosfatase alcalina, onde a partir de 14 dias, as hASC semeadas sobre a matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio basal foram capazes de produzir uma maior quantidade de fosfatase alcalina quando comparadas às células sob as mesmas condições associadas ao meio de indução osteogênica.

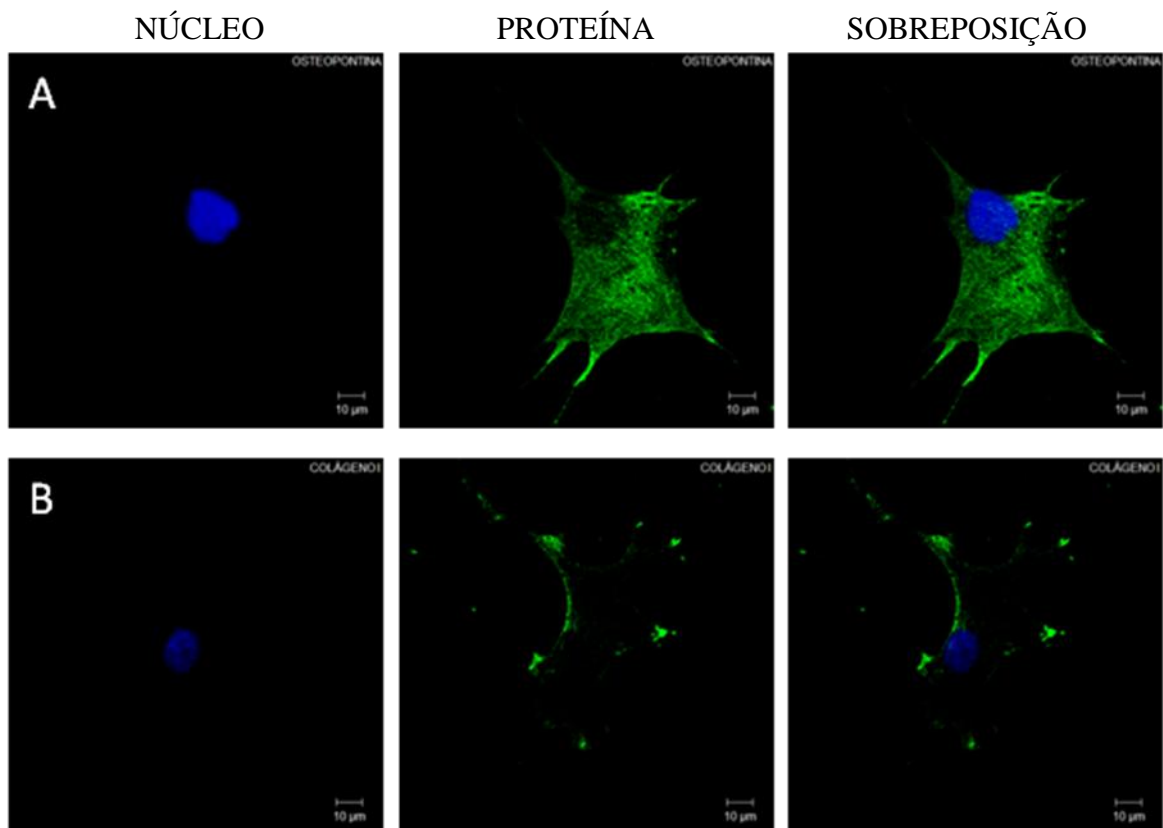


Figura 5. 28: Análise de imunofluorescência para as proteínas (A) osteopontina e (B) colágeno tipo I de hASC semeadas sobre a matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura basal por 14 dias.

Quando as ASC foram cultivados em matrizes tridimensionais, a diferenciação osteogênica pôde ser determinada pela expressão de fosfatase alcalina e secreção de

osteocalcina (HATTORI *et al*, 2004). Essas células têm o potencial de diferenciar em células mecanossensíveis como o osso e dessa forma podem fornecer uma promissora ferramenta para a engenharia de tecido ósseo (KNIPPENBERG *et al*, 2005).

Frente aos resultados expostos, os quais sugeriram uma ação indutora da diferenciação osteogênica relacionada à matriz de vidro bioativo, o último passo do presente trabalho foi avaliar o cultivo tridimensional das hASC semeadas sobre a matriz de vidro bioativo no biorreator de perfusão.

5.7 Efeito do Cultivo Dinâmico em Biorreator de Perfusão Sobre a Diferenciação Osteogênica das hASC

Ao final de 7, 14 e 21 dias de cultivo no biorreator de perfusão, as amostras foram removidas de maneira estéril e preparadas para as seguintes análises que se seguem.

5.7.1 Avaliação da Colonização e Adesão Celular

Para avaliar se as hASC realmente aderiram ao vidro bioativo, realizou-se MEV, cujos resultados demonstraram que as hASC foram capazes de aderir à matriz e estabelecerem conexões entre si e foi possível observar a presença de pequenas vesículas nas superfícies das membranas celulares, que indicam atividade de síntese e secreção proteica após 14 (Figura 5.29A-D) e 21 dias (Figura 5.30A-D).

5.7.2. Viabilidade e Proliferação Celular

No ensaio da viabilidade e proliferação celular das hASC semeadas em matrizes de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O no biorreator, representado na Figura 5.31, pôde-se observar que no tempo de 7 dias de cultivo no biorreator de perfusão, as hASC cultivadas em meio LEI apresentaram uma proliferação significativamente maior que as células cultivadas em meio LEI O, entretanto, a partir do 14º dia, houve uma inversão desse resultado, no qual as células cultivadas em meio LEI O apresentaram uma viabilidade significativamente maior até o 21º dia de cultivo em biorreator.

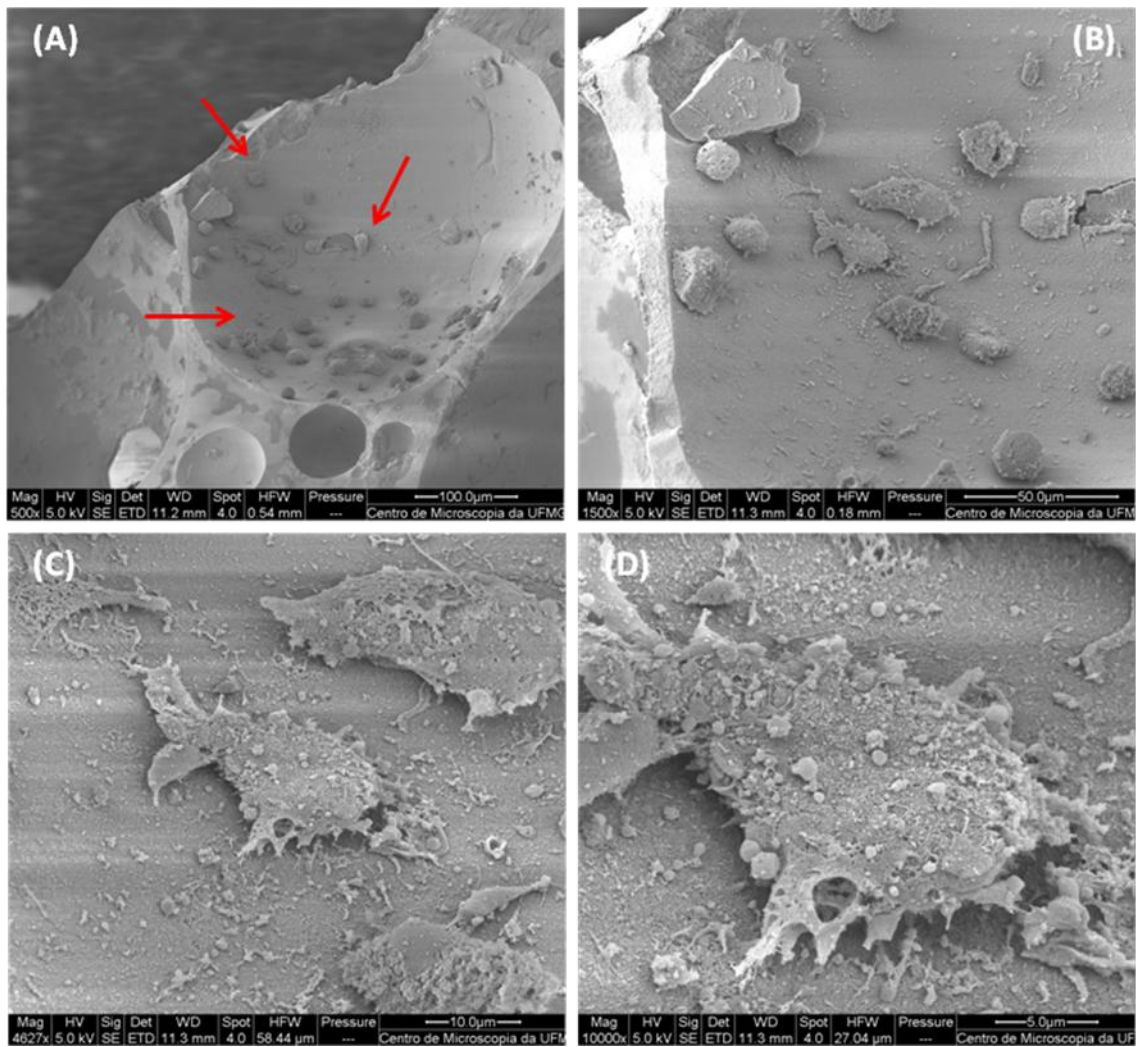


Figura 5. 29: Imagens por MEV evidenciando (A) um corte em um poro da amostra de vidro bioativo com várias células aderidas (setas), (B) maior aumento do poro evidenciando melhor as células, (C) e (D) maior aumento das hASC aderidas ao material e grânulos de secreção na membrana plasmática celular.

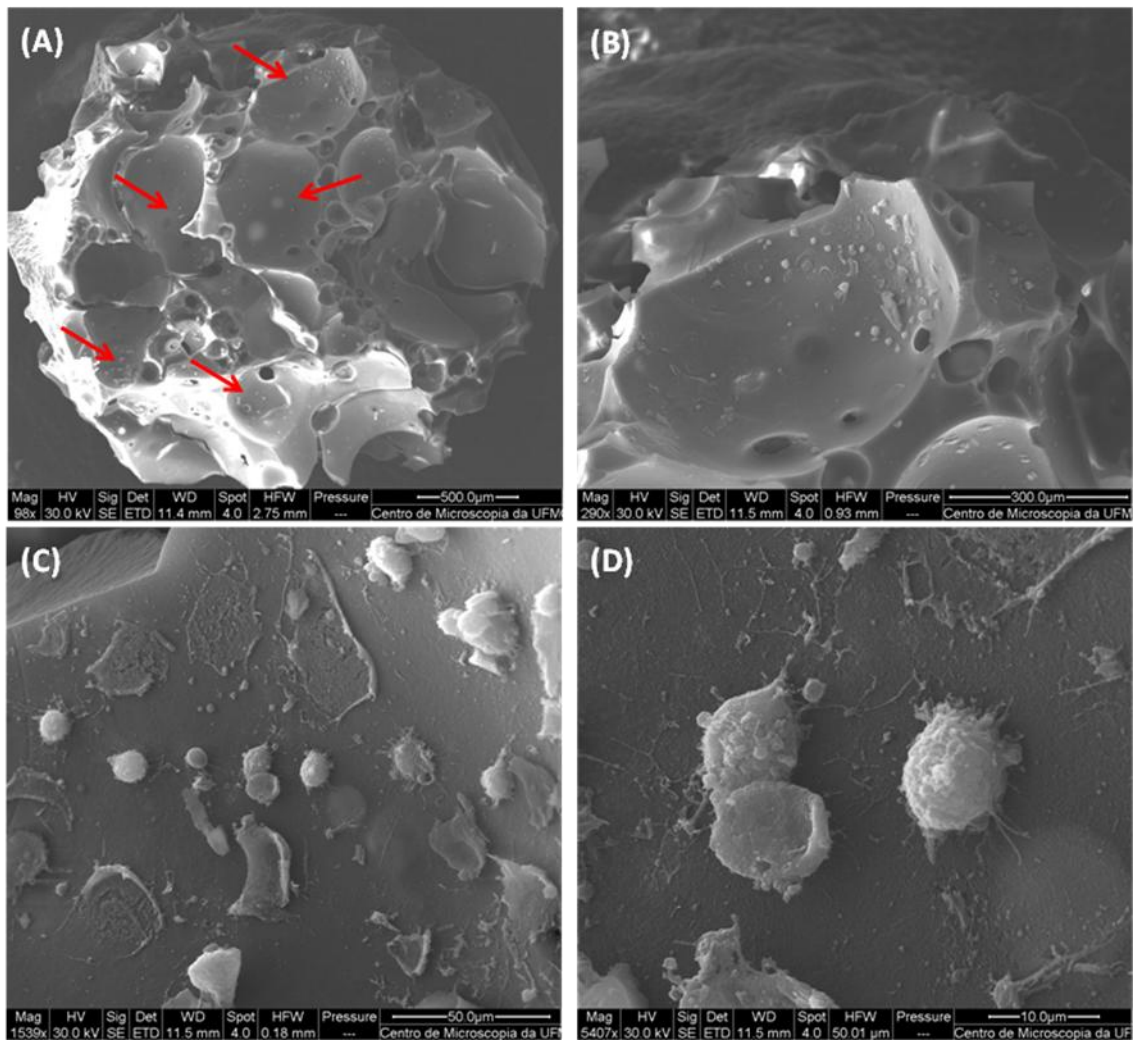


Figura 5. 30: Imagens por MEV em 21 dias de cultivo no biorreator evidenciando (A) a superfície da amostra de vidro bioativo com vários aglomerados de células aderidas (setas) (B) um poro da amostra com várias células aderidas, (C) maior aumento do poro evidenciando melhor as células e a rugosidade do material, e (D) maior aumento das hASC aderidas ao material e grânulos de secreção na membrana plasmática celular.

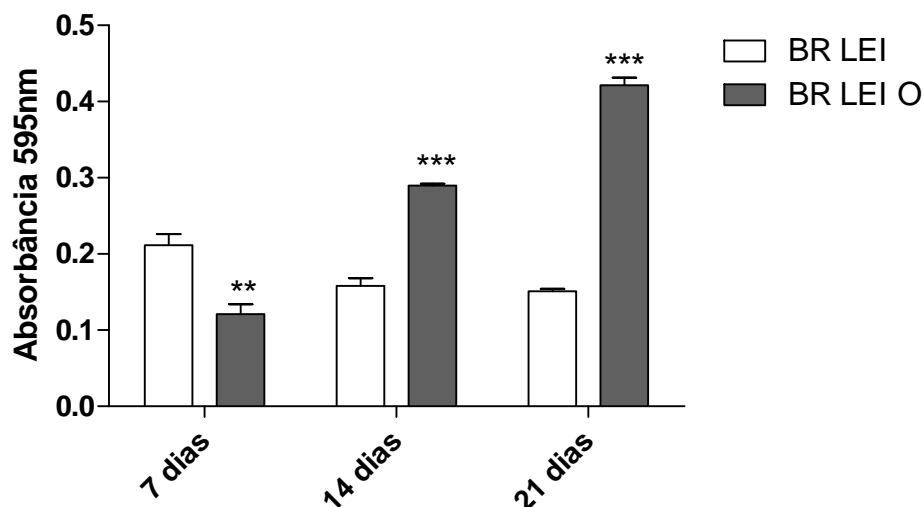


Figura 5. 31: Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular das hASCs semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O no biorreator de perfusão O (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ BR LEI x BR LEI O).

Quando se comparam os resultados obtidos com as hASCs semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em biorreator de perfusão aos resultados do cultivo estático sob as mesmas condições (Figura 5.32), pode-se observar uma semelhança no perfil de proliferação celular, onde inicialmente, as células cultivadas em meio LEI apresentaram uma proliferação celular maior, sendo esta proliferação significativamente maior entre as células cultivadas no biorreator de perfusão, porém, a partir do 14º dia, a proliferação celular aumentou consideravelmente entre as células cultivadas em meio LEI O, independente do cultivo ser estático ou dinâmico.

Os valores de absorbância obtidos no ensaio de MTT foram superiores quando o cultivo foi realizado no biorreator de perfusão, demonstrando a viabilidade e proliferação celular favorecidas e, quando este dispositivo foi conjugado aos fatores de indução osteogênica, aumentou significativamente a proliferação celular. Esse resultado demonstrou que o cultivo tridimensional em biorreator de perfusão exerce um efeito positivo na proliferação e viabilidade das hASCs.

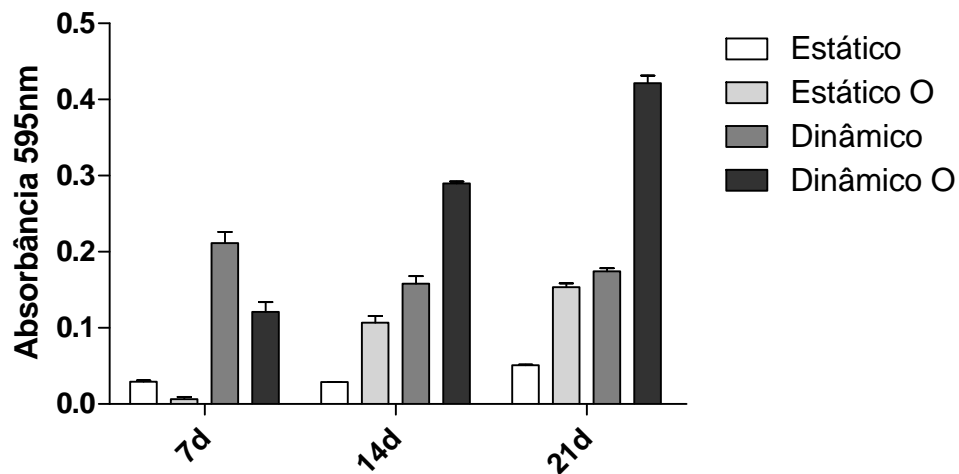


Figura 5. 32: Gráfico representativo da viabilidade e proliferação celular das hASC cultivadas em matrizes de vidro bioativo e meios LEI e LEI O de maneira estática e dinâmica (todos os tempos entre estático e dinâmico e entre estático O e dinâmico O são $p < 0,001$).

É conhecido na literatura 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 semeadas sobre a matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI no biorreator apresentaram uma proliferação inicial significativa e uma redução a partir do 14º dia de indução, entretanto as hASC cultivadas em meio de diferenciação osteogênica apresentaram uma proliferação significativa até o 21º dia.

A avaliação da proliferação e viabilidade celular é uma ferramenta importantíssima para definir o material ou forma de cultivo adequado, entretanto, sozinha não permite que conclusões sejam tomadas. Uma técnica complementar, no caso da avaliação do comprometimento celular com o fenótipo osteogênico, é a avaliação da atividade da fosfatase alcalina apresentada a seguir.

5.7.3 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina

No ensaio de BCIP-NBT das hASC cultivadas em meio LEI e LEI O em biorreator de perfusão, pôde-se observar na Figura 5.33 uma atividade da fosfatase alcalina maior nas células cultivadas em meio LEI em 7 e 14 dias e significativamente maior nas células cultivadas em meio LEI O em 21 dias de cultivo quando comparada aos demais tempos de cultivo.

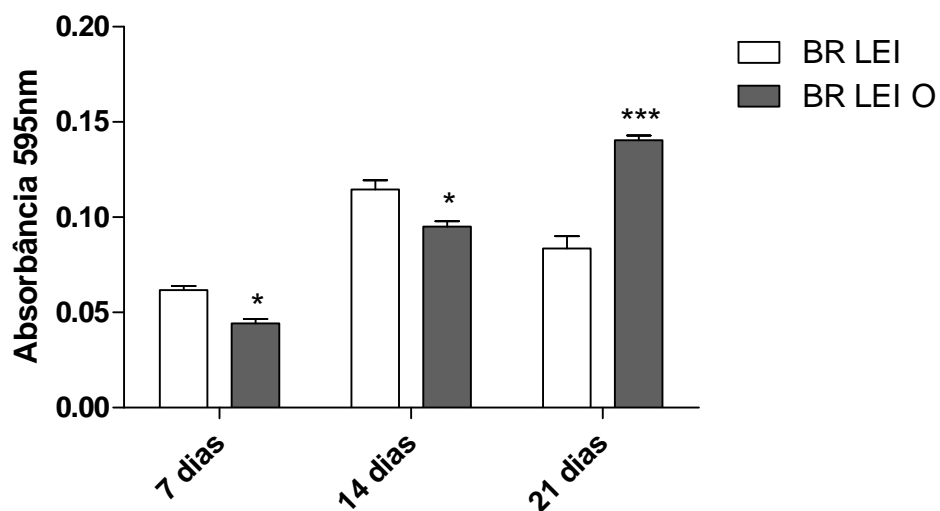


Figura 5. 33: Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI e LEI O no biorreator de perfusão O (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ BR LEI x BR LEI O).

E quando realizada a análise do gráfico representativo da produção de fosfatase alcalina (Figura 5.33) junto com o gráfico da viabilidade e proliferação celular (Figura 5.31), pôde-se observar que houve uma maior produção da fosfatase alcalina pelas células cultivadas em meio LEI entre 14 e 21 dias, quando comparadas às células cultivadas em meio LEI O.

Considerando o aumento da atividade da fosfatase alcalina, um marcador precoce das células em diferenciação osteogênica (JAISWAL *et al.*, 1997; AUBIN, 2001), o pico da atividade dessa enzima no 14º dia sem indução das hASC semeadas sobre a matriz tridimensional e cultivadas no biorreator, corrobora com o ensaio de proliferação, onde

evidencia a ação do fluxo sobre as células e indica o início da diferenciação em um fenótipo osteogênico sem a adição de fatores de indução.

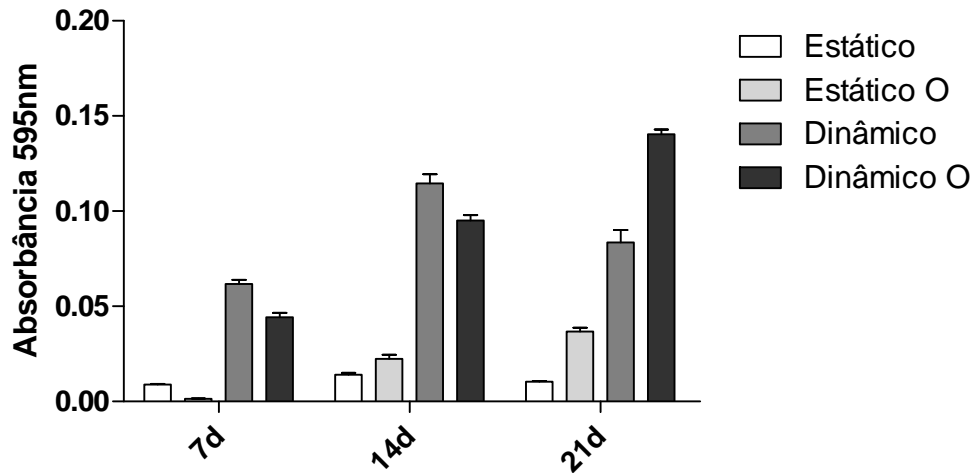


Figura 5. 34: Gráfico representativo da atividade da fosfatase alcalina das hASC cultivadas em matrizes de vidro bioativo e meios LEI e LEI O de maneira estática e dinâmica (todos os tempos entre estático e dinâmico e estático O x dinâmico O são *** $p < 0.001$).

A análise do gráfico da atividade da fosfatase alcalina entre os grupos estático e dinâmico da Figura 5.34, levando em consideração o gráfico de MTT da Figura 5.32, permitiu a seguinte avaliação: em 7 dias de cultivo, as células cultivadas de maneira estática apresentaram maior produção da enzima fosfatase alcalina, quando comparadas ao ensaio dinâmico. Não houve diferença significativa entre os meios LEI e LEI O, sugerindo não haver uma ação complementar entre a atividade osteoindutora do vidro bioativo e os fatores de diferenciação no meio LEI O.

A partir do 14º dia de cultivo, houve uma maior produção da enzima quando as amostras foram cultivadas em meio LEI, independente do cultivo ser estático ou dinâmico, e, comparando ambos os cultivos, a produção da fosfatase alcalina foi maior no cultivo dinâmico com meio LEI. Neste momento, o vidro bioativo exerceu uma ação decisiva em relação à atividade da fosfatase alcalina e, somada à ação do fluxo, conferiu ao grupo dinâmico LEI o melhor resultado.

No 21º dia de cultivo, houve uma diminuição dessa atividade nas células cultivadas em meio LEI e manutenção da atividade nas células cultivadas em meio LEI O. Esse

resultado sugere que o vidro bioativo exerceu uma ação osteoindutora representada pela maior produção da enzima no período de 14 dias e diminuição dessa produção no 21º dia, sugerindo um provável comprometimento com o fenótipo osteogênico. E neste caso, o fluxo teve uma ação sinérgica à do vidro bioativo, a qual demonstrou um aumento da síntese de fosfatase alcalina nos construtos cultivados no biorreator.

Portanto, esses resultados sugerem que a ação do fluxo do biorreator de perfusão teve um papel importante quando da proliferação celular aos 7 dias e aumento da atividade da fosfatase alcalina aos 14 dias de cultivo na ausência dos fatores de indução osteogênica.

5.7.4 Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica

O ensaio de imunofluorescência foi realizado para verificar se as hASC semeadas em espumas de vidro bioativo e cultivadas no biorreator de perfusão passaram a expressar marcadores de células osteogênicas.

Os anticorpos específicos utilizados foram osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I e inicialmente o teste foi realizado em células cultivadas em meio LEI após 21 dias de cultivo.

Pode-se observar nas imagens de microscopia confocal que as hASC apresentaram marcação para as três proteínas testadas (Figuras 5.35). Este resultado corrobora com os resultados do MTT e da atividade da fosfatase alcalina, nos quais, a partir do 14º dia, houve uma diminuição da proliferação celular e um aumento na produção da enzima fosfatase alcalina, sugerindo um comprometimento das hASC com o fenótipo osteogênico. Além disso, as imagens de microscopia confocal também mostram uma diminuição no comprimento das hASC, sugerindo também uma alteração na morfologia relacionada à alteração no fenótipo.

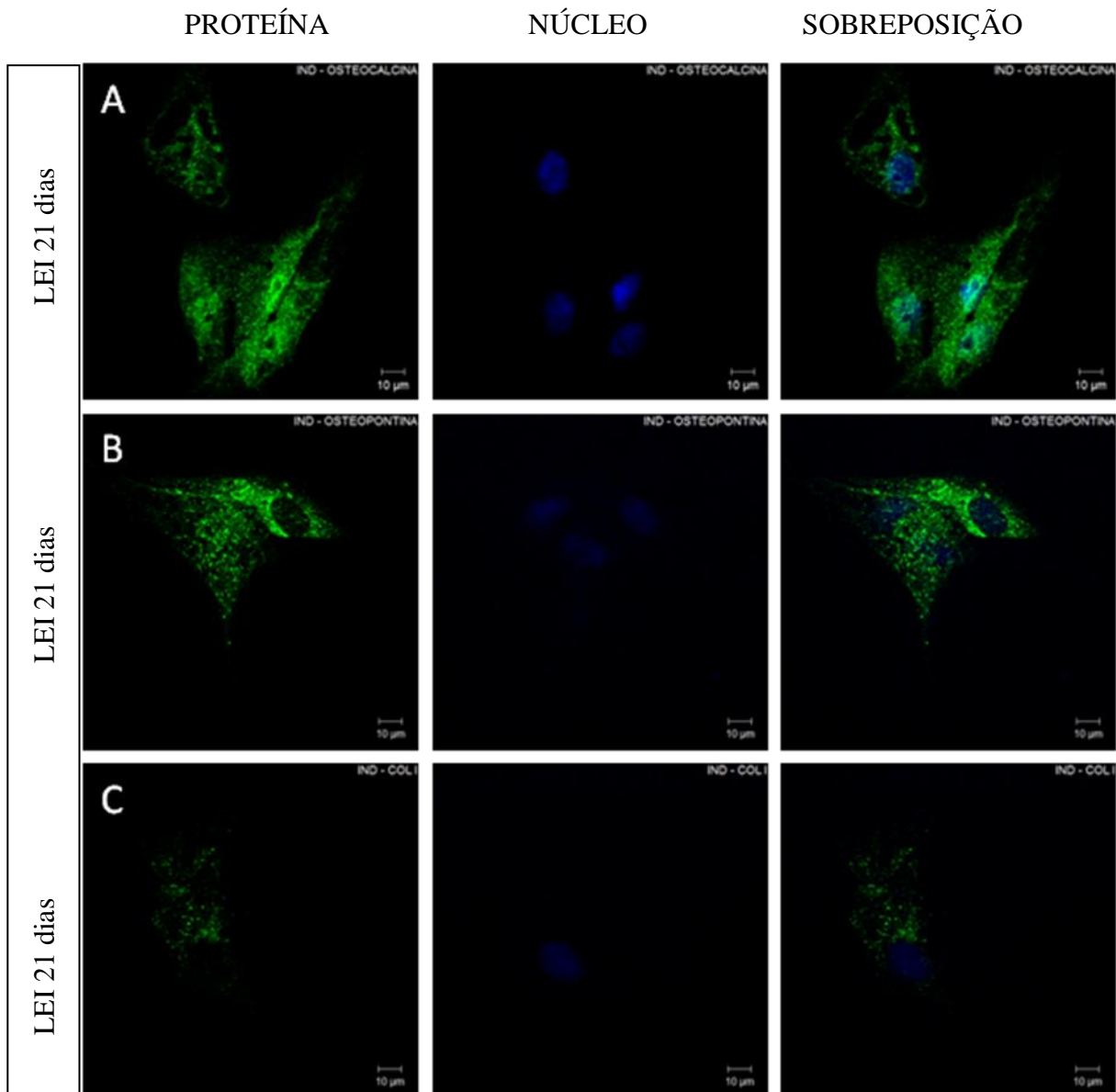


Figura 5. 35: Análise de imunofluorescência para as proteínas (A) osteocalcina, (B) osteopontina e (C) colágeno tipo I de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura basal em biorreator de perfusão após 21 dias.

Portanto, de acordo com os resultados expostos e em relação à hipótese da diferenciação osteogênica das hASC quando cultivadas em matriz de vidro bioativo e em meio LEI no biorreator de perfusão, pode-se sugerir que a partir do 14º dia de cultivo, as hASC parecem ter se comprometido com o fenótipo osteogênico. Entretanto, serão necessários mais ensaios em uma etapa futura para finalmente concluir essa hipótese.

A avaliação dos marcadores de diferenciação osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I foi realizada em hASC cultivadas no vidro bioativo em meio LEI O por 7, 14 e 21 dias no biorreator de perfusão.

As seguintes imagens de microscopia confocal evidenciam uma evolução na marcação das fluorescências a partir do 7^o até o 21^o dia para as três proteínas testadas: osteocalcina (Figura 5.36), osteopontina (Figura 5.37) e colágeno tipo I (Figura 5.38); além de uma evolução na morfologia, na qual, as células passam de um formato fusiforme típico de uma célula-tronco para o formato romboidal, característico das células osteoblásticas (Figura 5.39). Estes resultados, associados aos resultados de MTT e da atividade da fosfatase alcalina indicam uma alteração do fenótipo osteogênico das hASC.

De acordo com a literatura, no ensaio de imunofluorescência, as fluorescências 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).

Portanto, pode-se sugerir que as hASC semeadas na matriz tridimensional de vidro bioativo e cultivadas em meio LEI O no biorreator demonstraram um comprometimento com o fenótipo osteogênico.

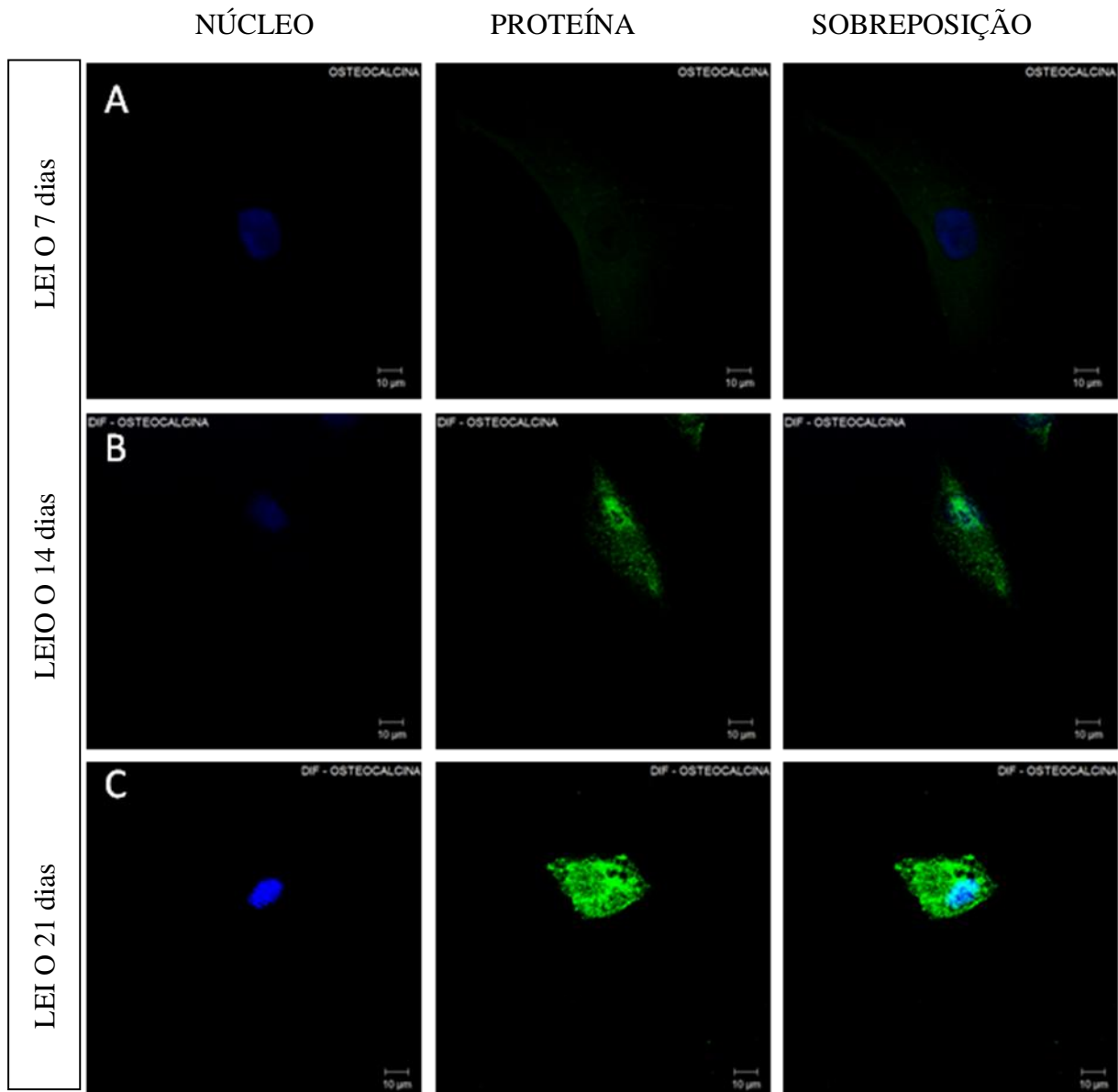


Figura 5. 36: Análise de imunofluorescência para a proteína osteocalcina de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura osteogênico em biorreator de perfusão após (A) 7, (B) 14 e (C) 21 dias.

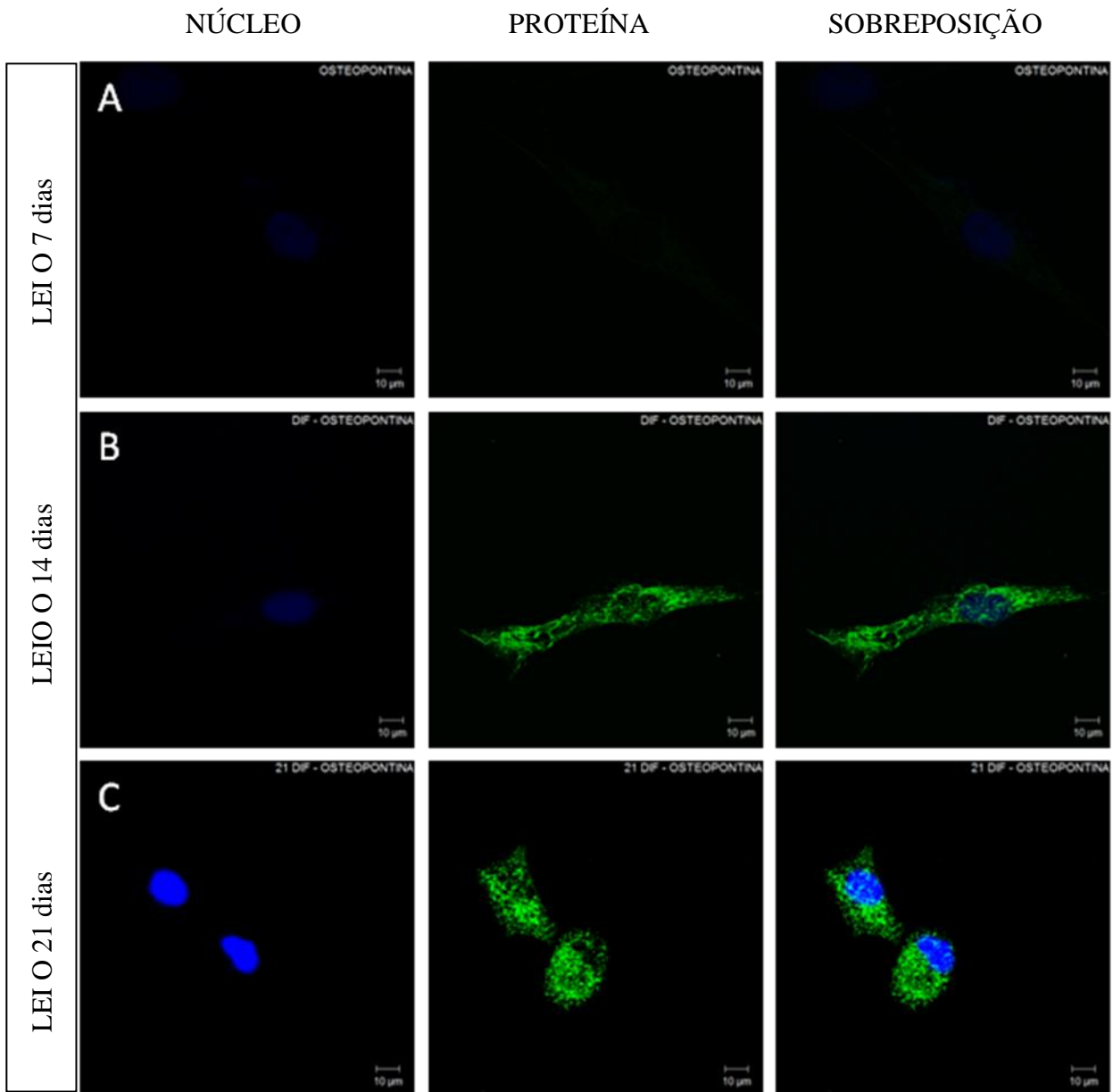


Figura 5. 37: Análise de imunofluorescência para a proteína osteopontina de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura osteogênico em biorreator de perfusão após (A) 7, (B) 14 e (C) 21 dias.

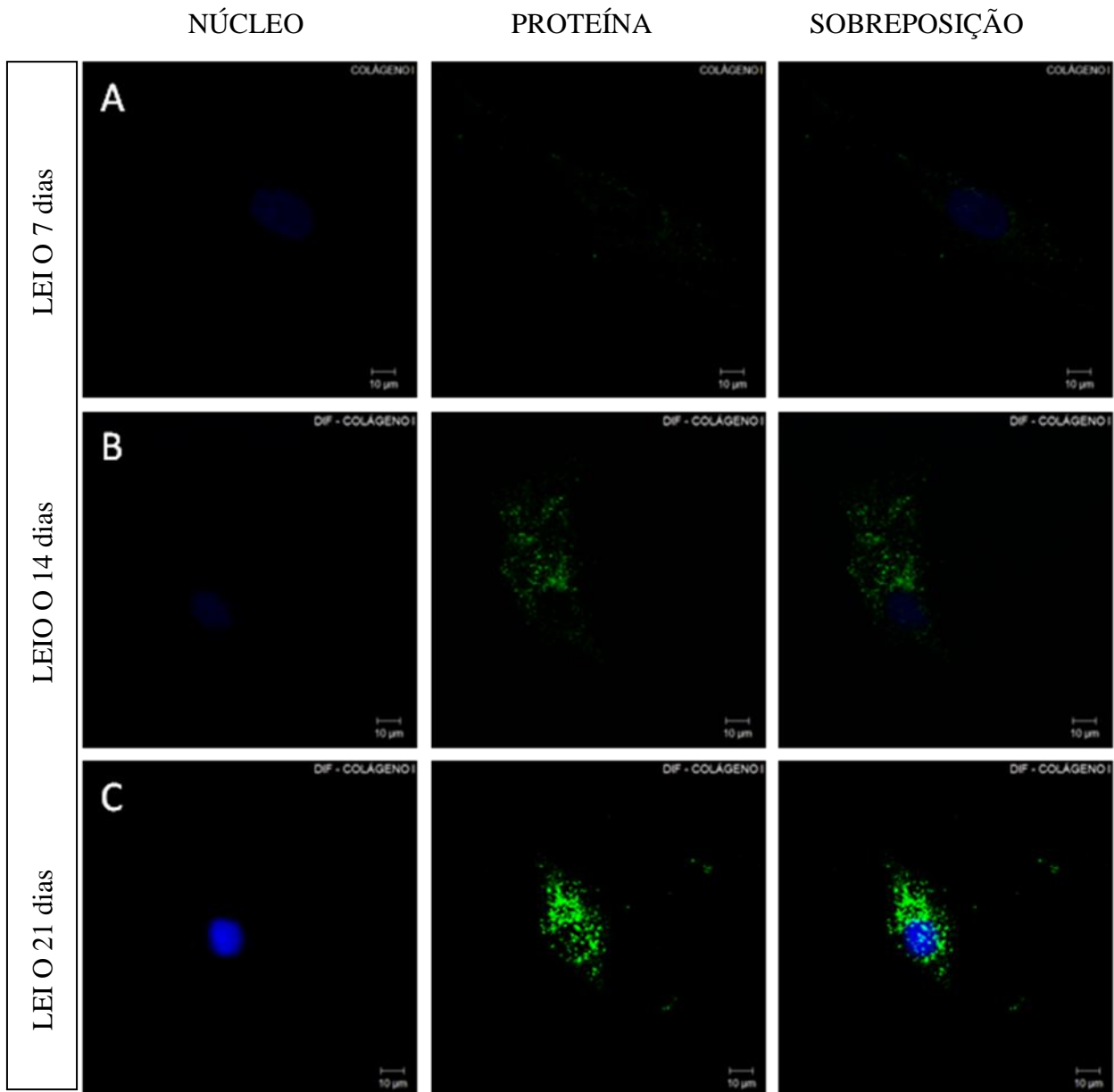


Figura 5. 38: Análise de imunofluorescência para a proteína colágeno tipo I de hASC semeadas em matriz de vidro bioativo e cultivadas em meio de cultura osteogênico em biorreator de perfusão após (A) 7, (B) 14 e (C) 21 dias.

Da mesma forma como foi observado nas imagens de imunofluorescência, pôde-se observar uma alteração progressiva da morfologia celular, especialmente nos estágios mais tardios, nos quais além das células cultivadas em meio LEI O dinâmico apresentarem uma maior expressão dos marcadores, ainda apresentaram uma morfologia cuboidal, observada por MO (Figuras 5.41), morfologia típica de osteoblastos.

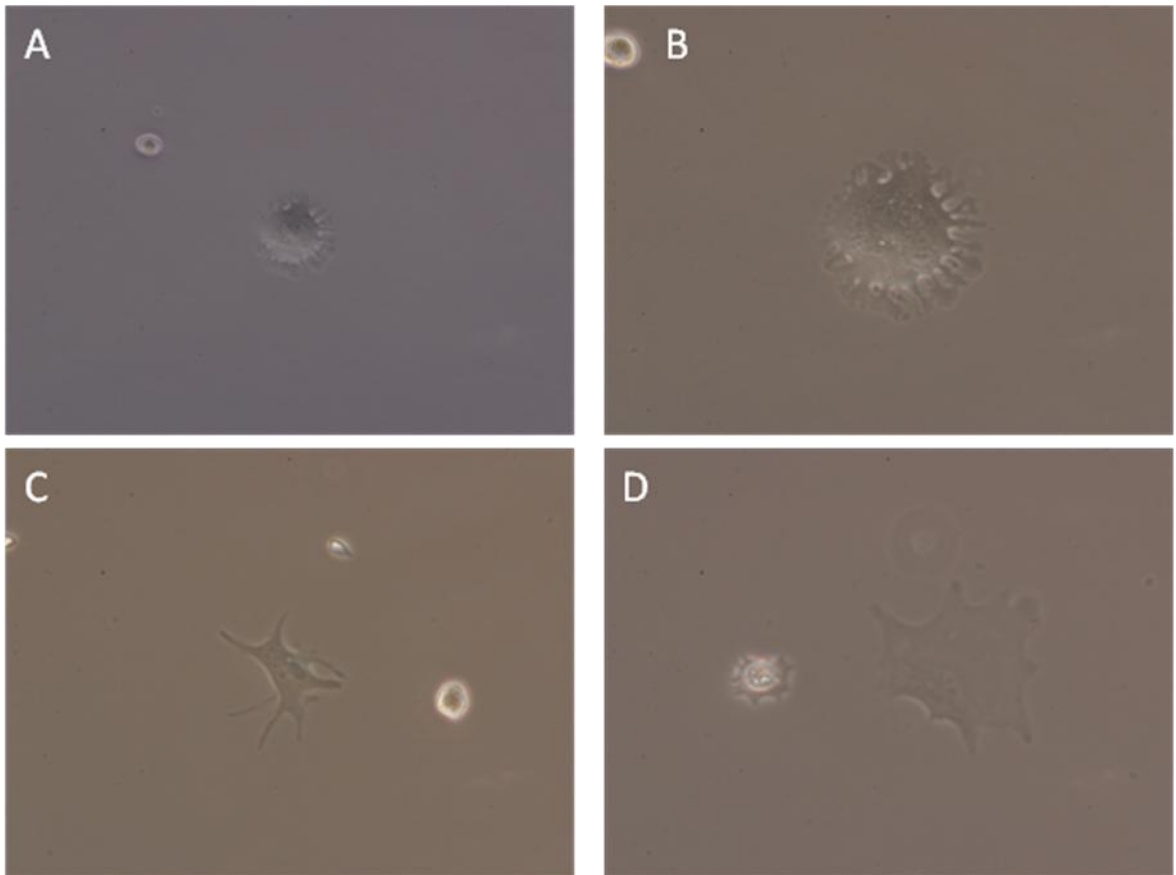


Figura 5. 39: Imagens obtidas por microscopia ótica de células extraídas de uma amostra de vidro bioativo após o cultivo em meio osteogênico por 21 dias no biorreator. Em (A) e (C), aumento de 100X e em (B) e (D), aumento de 300X.

Durante a proliferação, as células tronco adquirem aparência semelhante à fibroblastos, mas durante o processo de diferenciação, as células-tronco alteram completamente sua morfologia, adquirindo morfologia e características semelhantes às das células maduras, com formato cuboidal ou poligonal (PAYUSHINA *et al*, 2006).

Finalmente, para comprovar a diferenciação osteogênica, utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase.

5.7.5 Comprovação da Diferenciação Osteogênica Através de PCR

As expressões dos genes para osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina foram analisadas através da amplificação de segmentos gênicos e observadas pelo resultado de eletroforese em gel de agarose. Essa análise foi feita em células cultivadas em meio LEI O após 7, 14 e 21 dias de indução.

Todos os genes avaliados foram detectados nas hASC e nas células de osteossarcoma humano (SAOS) - usadas como controle positivo das amostras. Como controle positivo da reação foi utilizado o gene GAPDH, enzima constitutivamente expressa por todas as células, e como controle negativo, o *mix* de cada reação (Figura 5.40).

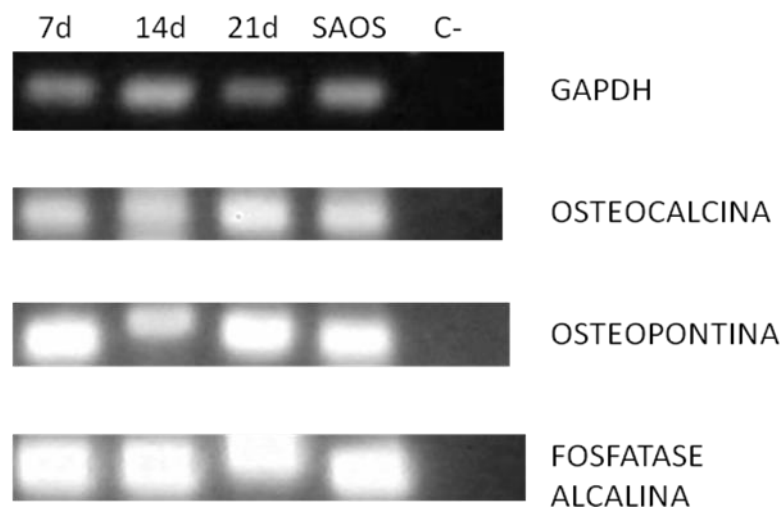


Figura 5. 40: Detecção de osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina em 7, 14 e 21 dias em hASC cultivadas sobre a matriz de vidro bioativo, em meio LEI O e no biorretor de perfusão. SAOS como controle positivo e C- é o controle negativo.

As proteínas não colágenas ósseas têm múltiplas funções relacionadas com a formação, equilíbrio e reparo de tecidos mineralizados. Evidências indicam que a osteocalcina é expressa quase exclusivamente em tecidos mineralizados e apresenta a função de regular o crescimento dos cristais de hidroxiapatita. A atividade da fosfatase alcalina é requerida para gerar fosfato inorgânico a partir da hidrólise de pirofosfato inorgânico extracelular que é necessário para a cristalização da hidroxiapatita (CHUN *et al*, 2005).

O ensaio estático das hASC semeadas sobre a matriz de vidro bioativo já havia evidenciado, assim como outros estudos na literatura com MSC e osteoblastos (JONES & HENCH, 2004; PEREIRA *et al*, 2005; BOSETTI *et al*, 2005; DUTRA *et al*, 2006; HENCH, 2008), que a matriz de vidro bioativo, devido a sua propriedade osteoindutora, exerceu uma ação determinante na diferenciação das hASC em células que expressam proteínas ósseas.

Quando comparados o ensaio estático ao dinâmico, pôde-se concluir que a proliferação e viabilidade celular foi significativamente maior nas hASC cultivadas no biorreator de perfusão em 7 dias de cultivo. Em relação à atividade da fosfatase alcalina, que é um marcador da diferenciação celular e seu pico está relacionado ao 14º dia de cultivo, o resultado foi mais expressivo nas hASC cultivadas em meio LEI e de maneira dinâmica, sugerindo novamente uma ação positiva do fluxo do biorreator de perfusão na diferenciação das hASC, como demonstrado em diversos estudos na literatura para MSC (BANCROFT *et al*, 2002; SIKAVITSAS *et al*, 2005; BRACCINI *et al*, 2005; HOLTORF *et al*, 2005).

Os resultados da PCR corroboram com os resultados de imunofluorescência, atividade da fosfatase alcalina e microscopia ótica, os quais em conjunto indicaram que as hASC se diferenciaram no fenótipo osteogênico quando cultivadas sobre a matriz de vidro bioativo, meio de cultura LEI O e no biorreator de perfusão.

Este trabalho também permite uma indicação preliminar da diferenciação das hASC semeadas no vidro bioativo, meio LEI e no biorreator pelas metodologias que foram possíveis até então, como a atividade da fosfatase alcalina e imunofluorescência.

6. Conclusões

A espuma de vidro bioativo sintetizada apresentou uma rede de poros de 100-500µm interconectados e porosidade de 88%. A verificação da degradação e bioatividade das espumas de vidro bioativo demonstrou que o cultivo dinâmico foi capaz de manter o pH do SBF e o fluxo foi capaz de permear a amostra tridimensional, através da deposição da camada de HCA no interior dos poros do interior das amostras. Foi desenvolvido neste trabalho um protocolo para o cultivo das hASC em meio LEI de maneira gradual. A comparação entre hASC cultivadas em DMEM e LEI demonstrou semelhança morfológica e fenotípica e diferenciação osteogênica em meio LEI O. O cultivo estático das hASC semeadas na matriz de vidro bioativo demonstrou ótima adaptação à matriz e aos meios testados, pico de atividade da fosfatase alcalina aos 14 dias de cultivo em meio LEI e diferenciação celular confirmada por imunofluorescência. Finalmente, o cultivo das hASC em matriz de BV no biorreator demonstrou aumento significativo da viabilidade e proliferação celular aos 7 dias de cultivo, pico de atividade da fosfatase alcalina aos 14 dias de cultivo em meio LEI; imunofluorescência positiva para osteopontina, osteocalcina e colágeno tipo I a partir de 7 dias e com aumento da fluorescência até os 21 dias de cultivo para o meio LEI O, no qual as hASC evoluíram de um formato fusiforme para o formato cuboidal. A PCR evidenciou a expressão dos genes da OP, OC e FA pelas hASC em todos os tempos de cultivo no biorreator com meio LEI O. A imunofluorescência do grupo cultivado em meio LEI aos 21 dias também evidenciou a expressão das três proteínas de maneira menos intensa e com menor alteração na morfologia celular. Portanto, os resultados permitem uma indicação preliminar da diferenciação das hASC semeadas no vidro bioativo, meio LEI e no biorreator e finalmente, pode-se concluir que houve diferenciação das hASC quando cultivadas em matriz de BV, meio LEI O e cultivo em biorreator de perfusão, fornecendo dessa forma, um construto funcional para a engenharia de tecido óssea.

7. Referências

ABUKAWA, H.; SHIN, M.; WILLIAMS, W. B.; VACANTI, J. P.; KABAN, L. B.; TROULIS, M. J. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 601-606, 2004.

AKSU, A. E.; RUBIN, J. P.; DUDAS, J. R.; MARRA, K. G. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-deriver stem cells. *Ann Plast Surg*. 60(3), 306-322, 2008.

ALLORI, A. C.; SAILON, A. M.; WARREN, S. M. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair—Part I: Biochemical Signaling Molecules. *Tissue Engineering: Part B*, v. 14, n. 3, p. 259-273, 2008a.

ALLORI, A. C.; SAILON, A. M.; WARREN, S. M. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair—Part II: Extracellular Matrix. *Tissue Engineering: Part B*, v. 14, n. 3, p. 275-283, 2008b.

ALLORI, A. C.; SAILON, A. M.; PAN, J. H.; WARREN, S. M. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair—Part III: Biomechanical Forces. *Tissue Engineering: Part B*, v. 14, n. 3, p. 285-293, 2008c.

ALTMAN, G. H.; HORAN, R. L.; MARTIN, I.; FARHADI, J. STARK, P. R.; VOLLOCK, V.; RICHMOND, J. C. VUNJAK-NOVAKOVIC, G. KAPLAN, D. L. Cell differentiation by mechanical stress, *FASEB J*, v. 16, p. 270-272, 2002.

AUBIN, J. E. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31 (73), 82, 2001.

BANCROFT, G.N.; SIKAVITSAS, V. I.; VAN DER DOLDER, J.; SHEFFIELD, T. L.; AMBROSE, C. G.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 12600–12605, 2002.

BANCROFT, G.N.; SIKAVITSAS, V. I.; MIKOS, A. G. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Engineering*, v. 9, p. 549–554, 2003.

BARNGROVER, D.; THOMAS, J.; THILLY, W. G. High density mammalian cell growth in Leibovitz bicarbonate-free medium: effects of fructose and galactose on culture biochemistry *J Cell Sci* 78, 173-189, 1985.

BECK, G. R. Jr.; ZERLER, B.; MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97 (15), 8352-8357, 2000.

BIRK, R. Z.; ABRAMOVITCH-GOTTLIB, L.; MARGALIT, I.; AVIV, M.; FORTI, E.; GERESH, S.; *et al.* Conversion of adipogenic to osteogenic phenotype using crystalline porous biomatrices of marine origin. *Tissue Engineering*, v. 12, p. 21–31, 2006.

BJERRE, L.; BÜNGER, C. E.; KASSEM, M.; MYGIND, T. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials*, 29, 2616–2627, 2008.

BOSETTI, M.; CANNAS, M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*, v. 26, p. 3873–3879, 2005.

BRACCINI, A.; WENDT, D.; JAQUIERY, C.; JAKOB, M.; HEBERER, M.; KENINS, L.; WODNAR-FILIPOWICZ, A.; QUARTO, R.; MARTIN, I. Three-Dimensional Perfusion Culture of Human Bone Marrow Cells and Generation of Osteoinductive Grafts. *Stem Cells*, v. 23, p. 1066–1072, 2005.

BRINKER, C.J., SCHERER, G.W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. San Diego: Academic Press, 908p, 1990.

BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; RICALTON, N. S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 355S, S247-S256, 1998.

CANCEDDA, R.; BIANCHI, G.; DERUBEIS, A.; QUARTO, R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*, v. 21, p. 610-619, 2003.

CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, v. 28, p. 4240-4250, 2007.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*, v. 217, p. 318-324, 2009.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, v. 7, n. 6, p. 259-264, 2001.

COELHO, M. B. Desenvolvimento de metodologia para produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação na engenharia de tecidos. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2003. 145p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais).

COWAN, C. M.; SHI, Y. Y.; AALAMI, O. O.; CHOU, Y. F.; MARI, C.; THOMAS, R.; QUARTO, N.; CONTAG, C. H.; WU, B.; LONGAKER, M. T. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 5, p 560-567, 2004.

COWAN, C. M.; AGHALOO, T.; CHOU, Y. F.; WALDER, B.; ZHANG, X. L.; SOO, C.; TING, K. WU, B. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Engineering*, v. 13, n. 3, p. 501-512, 2007.

CUI, L.; LIU, B.; LIU, G.; ZHANG, W.; CEN, L.; SUN, L.; CAO, Y. *et al.* Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*, v. 28, p. 5477–5486, 2007.

DAWSON, E.; MAPILI, G.; ERICKSON, K.; TAQVI, S.; ROY, K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 215-228, 2008.

DAWSON, J. I.; OREFFO, R. O. C. Bridging the regeneration gap: Stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 473, p. 124–131, 2008.

DOMINICI, M.; Le BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317, 2006.

DUDAS, J. R.; MARRA, K. G.; COOPER, G. M.; PENASCINO, V. M.; MOONEY, M. P.; JIANG, S.; RUBIN, J. P.; LOSEE, J. E. The osteogenic potential of adipose derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Annals of Plastic Surgery*, v.56, n. 5, p. 543-548, 2006.

DUTRA, C. E. A.; PEREIRA, M. M.; SERAKIDES, R.; REZENDE, C. M. F. In vivo evaluation of bioactive glass foams associated with platelets rich plasma in bone defects. *J Tissue Eng Regen Med*, v. 2, p. 221-227, 2008.

ENGLER, A. J.; SEN, S.; SWEENEY, H. L.; DISCHER, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, v. 126, p. 677–689, 2006.

FREED, L. E.; VUNJAK- NOVAKOVIC, G. Tissue Engineering Bioreactors, *Principles of Tissue Engineering*, Chapter 13, 143-156, 2000.

FRESHNEY, R. I.; OBRADOVIC, B.; GRAYSON, W.; CANNIZZARO, C.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Principles of Tissue Culture and Bioreactor Design. *Principles of Tissue Engineering*, 3^a ed., Elsevier, Inc, Capítulo 12, p. 155-183, 2007.

FRÖLICH, M.; GRAYSON, W. L.; MAROLT, D.; GIMBLE, J. M.; KREGAR-VELIKONJA, N.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bone Grafts Engineered from Human Adipose-Derived Stem Cells in Perfusion Bioreactor Culture. *Tissue Engineering. Part A*, 16 (1), 2010.

GIMBLE, J. M.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. 5 , 362-369, 2003.

GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circulation Researc*, v. 100, p. 1249-1260, 2007.

GOLDSTEIN, A. S.; JUAREZ, T. M.; HELMKE, C.D.; GUSTIN, M. C.; Mikos, A. G. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, v. 22p. 1279–1288, 2001.

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. Extracellular Matrix Mineralization and Osteoblast Gene Expression by Human Adipose Tissue–Derived Stromal Cells. *Tissue Engineering*. 7(6): 729-741, 2001.

HATTORI, H.; MASUOKA, K.; SATO, M.; *et al.* Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v. 76, p. 230 –239, 2006.

HATTORI, H.; ISHIHARA, M.; FUKUDA, T.; *et al.* Establishment of a novel method for enriching osteoblast progenitors from adipose tissues using a difference in cell adhesive properties. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 343, p. 1118 –1123, 2006.

HENCH, L.L. *et al.* Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.2, n.1, p117-141, 1971.

HENCH L.L.; PASCHALL, H.A Histochemical responses at a biomaterial's interface. *Journal of Biomedical Materials Research Symposium*, v. 5, p. 49–64, 1974.

HENCH, L.L. Biomaterials. *Science*, v.208, p.826-831, 1980.

HENCH, L. L. Bioactive ceramics. *Ann N Y Acad Sci*; 523: 54-71, 1988.

HENCH, L.L. Bioceramics and the Origin of Life. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.23, p.685-703, 1989.

HENCH, L.L., WILSON, J. *An Introduction to Bioceramics*. New Jersey: World Scientific Publishing, 386p. Advanced Series in Ceramics, vol.1, 1993.

HENCH, L. L. Sol-gel materials for bioceramic applications. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, v. 2, p. 604-610, 1997.

HENCH, L .L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*; 41: 511-518, 1998.

HENCH, L.L. Bioceramics. *Journal of American Ceramic Society*, v.81, n.7, p.1705-1728, 1998.

HENCH, L.L., WILSON, J. Bioactive Glasses: Present and Future. In: Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, p.31-36, 1998.

HENCH, L.L. The Challenge of Orthopaedic Materials. *Current Orthopaedics*. v.14, p7-15, 2000.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M.; XYNOS, I. D.; BUTTERY, L. D. K., Bioactive materials to control cell cycle. *Mater. Res. Innovat.*, v. 3, p. 313–323, 2000.

HENCH, L. L. Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 29, n. 7, p. 1257-1265, 2008.

HICOK, K. C.; DU LANEY, T. V.; ZHOU, Y. S.; HALVORSEN, Y. D. C.; HITT, D.C.; COOPER, L. F.; GIMBLE, J. M. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 10, 371-380, 2004.

HOLTORF, H. L.; SHEFFIELD, T. L.; AMBROSE, C. G.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Ann Biomed Eng* 33, 1238–1248, 2005.

ISO/FDIS 23317 - Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. 2007. Disponível em www.iso.org

IZQUIERDO-BARBA, I., SALINAS, A.J. & VALLET-REGÍ, M. Effect of the Continuous Solution Exchange on the *In Vivo* Reactivity of a CaO-SiO₂ sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.51, p191-199, 2000.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E.; CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell Biochem.*, v. 64, p. 295-312, 1997.

JANSSEN, F. W.; OOSTRA, J.; VAN OORSCHOT, A.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*, v. 27, p. 315–323, 2006.

- JELL, G.; NOTINGHER, I.; TSIGKOU, O. et al. Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study. *J Biomed Mater Res A*; 86: 31-40, 2008.
- JONES, J. R.; HENCH, L. L. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 7, p. 301–307, 2003.
- JONES, J.R. & HENCH, L.L. Effect of Porosity on the Mechanical Properties of Bioactive Foam Scaffolds. *Key Engineering Materials*. v.240-242, p209-212, 2003.
- JONES, J. R.; EHRENFRIEDB, L. M.; HENCH, L. L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 964–973, 2006.
- JONES, J. R.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, G.; ATWOOD, R. C.; BERNARD, D.; LEE, P. D. Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds. *Biomaterials*, v. 28, p. 1404–1413, 2007.
- JONES, J. R.; ATWOOD, R. C.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, G.; YUE, S.; LEE, P. D. Quantifying the 3D macrostructure of tissue scaffolds. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 20, p. 463–471, 2009.
- KAKUDO, N.; SHIMOTSUMA, A.; MIYAKE, S.; KUSHIDA, S.; KUSUMOTO, K. Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A* 84A, 191-197, 2008.
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474-5491, 2005.
- KNIPPENBERG, M.; HELDER, M. N.; DOULABI, B. Z.; et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Engineering*; v. 11, p. 1780–1788, 2005.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solution able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 24, p. 721-734, 1990.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*, 27, 2907–2915, 2006.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 35:232-42, 2006.

KRETLOW, J. D.; MIKOS, A. G. From Material to Tissue: Biomaterial Development, Scaffold Fabrication, and Tissue Engineering. *Alpha Chi Sigma Award*, v. 54, n. 12, p. 3048-3067, 2008.

LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, v. 248, 2004

LANGER, R.; VACANTI, J. Tissue engineering: the challenges ahead. *Scientific American*; v. 280, p. 62-65, 1999.

LAWRENCE, B. J.; DEVARAPALLI, M.; MADIHALLY, S. V. Flow Dynamics in Bioreactors Containing Tissue Engineering Scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 3, p. 935-947, 2008.

LEE, J. H.; RHIE, J. W.; OH, D. Y.; AHN, S. T. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 456-460, 2008.

LENNON, D. P.; EDMISON, J. M.; CAPLAN, A. I. Cultivation of Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Reduced Oxygen Tension: Effects on *In Vitro* and *In Vivo* Osteochondrogenesis. *J. Cell. Phys.* 187:345±355, 2001.

- LI, R.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater*; 2: 231-239, 1991.
- LI, N.; Jie, Q.; Zhu, S.; Wang, R. Preparation and characterization of macroporous sol-gel bioglass. *Ceramics International*, v. 31, p. 641-646, 2005.
- LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 3, 269-305, 1992.
- LIND, M. L.; JACOBSEN, J.; HOLM, R.; MULLERTZ, A. Development of simulated intestinal fluids containing nutrients as transport media in the Caco-2 cell culture model: Assessment of cell viability, monolayer integrity and transport of a poorly aqueous soluble drug and a substrate of efflux mechanisms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32, 4-5, 261-270, 2007.
- 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, D. Influence of Porosity and Pore Size on the Compressive Strength of Porous Hydroxyapatite Ceramic. *Ceramics International*, v.23, p.135-139, 1997.
- LIU, W.; ZHANG, W.; CAO, Y. Bone and Cartilage Reconstruction. *Principles of Tissue Engineering*, 3^a ed., Elsevier, Inc, Capítulo 57, p. 861-875, 2007.
- MARTIN, Y.; VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, v. 26, p. 7481-7503, 2005.
- MITCHELL, J. B.; MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; FLOYD, Z. E.; KLOSTER, A.; HALVORSEN, Y. D.; GIMBLE, J. M. *et al.* Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells*, v. 24, p. 376-385, 2006.

- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NAKAMURA, A. *et al.* Osteocalcin Secretion as an Early Marker of *In Vitro* Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 15, 2: 169-180, 2009.
- NANDI, S. K.; KUNDU, B.; DATTA, S.; DE, D. K.; BASU, D. The repair of segmental bone defects with porous bioglass: An experimental study in goat. *Research in Veterinary Science*, v. 86, p. 162–173, 2009.
- OHGUSHI, H.; CAPLAN, A. I. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res B*, v. 48, p. 913-927, 1999.
- OLIVEIRA, A. A. R. Síntese e Caracterização de Espumas Híbridas Vidro Bioativo/PVA para Aplicação na Engenharia de Tecidos. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2007. 117p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais).
- OONISHI, H.; KUTRSHITANI, S.; YASUKAWA, E.; IWAKI, H.; HENCH, L. L.; WILSON, J. Particulate Bioglass ® compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop*, v. 25, p. 334:316, 1997.
- OONISHI, H.; HENCH, L. L.; WILSON, J. *et al* Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*; 51: 37-46, 2000.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. *Biomateriais: Fundamentos & Aplicações*. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2006, 538p.

PATEL, N.; BEST, S. M.; BONFIELD, W.; GIBSON, I. R.; HING, K. A.; DAMIEN, E. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci: Mater Med*; v. 13, n. 12, p. 1199–1206, 2002.

PATEL, S. A.; SHERMAN, L.; MUNOZ, J.; RAMESHWAR, P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v. 56, p. 1–8, 2008.

PAULA, A. C. C. Indução da osteogênese de células-tronco humanas em matriz tridimensional de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato utilizando meio suplementado com soro humano. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2011, 82p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica e Imunologia).

PAYUSHINA, O. V.; DOMARATSKAYA, E. I.; STAROSTIN, V. I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol.*, 33 (1), 2-18, 2006.

PEREIRA, M.M., CLARK, E.A., HENCH, L.L. Homogeneity of Bioactive Sol-Gel-Derived Glasses in the System $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$. *Journal of Materials Synthesis and Processing*, v.2, n.3, p.189-195, 1994.

PEREIRA, M.M., CLARK, E.A., HENCH, L.L. Calcium Phosphate Formation on Sol-Gel-Derived Bioactive Glasses *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.28, p.693-698, 1994.

PEREIRA, M.M., HENCH, L.L. Mechanisms of Hydroxyapatite Formation on Porous Gel-Silica Substrates. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v.7, p.59-68, 1996.

PEREIRA, M. M.; JONES, J. R.; OREFICE, R. L.; HENCH, L. L. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 16, p. 1045–1050, 2005a.

PEREIRA, M. M.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Bioactive glass and hybrid scaffolds prepared by sol–gel method for bone tissue engineering. *Advances in Applied Ceramics*, v. 104, n. 1, p. 35-42, 2005b.

PERIN, L.; GIULIANI, S.; JIN, D.; SEDRAKYAN, S.; CARRARO, G.; HABIBIAN, R.; WARBURTON, D.; ATALA, A.; De FILIPPO, R. E. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells *Cell Prolif.*, 40, 936–948, 2007.

PORTER, B. D.; LIN, A. S. P.; PEISTER, A.; HUTMACHER, D.; GULDBERG, R. E. Noninvasive image analysis of 3D construct mineralization in a perfusion bioreactor. *Biomaterials*, v. 28, p. 2525–2533, 2007.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; BLANCHER, A. *et al.* Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, v. 129, p. 118–129, 2005.

PUPPI, D.; CHIELLINI, F.; PIRAS, A. M.; CHIELLINI, E. Polymeric Materials for Bone and Cartilage Repair. *Progress in Polymer Science*, 35, 403-440, 2010.

RÁMILA, R.; VALLET-REGÍ, M. Static and dynamic in vitro study of a sol-gel glass bioactivity. *Biomaterials* 22 , 2301-2306, 2001.

REFFITT, D.M.; OGSTON, N.; JUDAOHSINGH, R. et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*; 32: 127-135, 2003.

REICHERT, J. C.; SAIFZADEH, S.; WULLSCHLEGER, M. E.; EPARI, D. R.; SCHÜTZ, M. A.; DUDA, G. N.; SCHELL, H.; VAN GRIENSVEN, M.; REDL, H.; HUTMACHER, D. W. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*, v. 30, p. 2149–2163, 2009.

- RODRIGUEZ, A.M.; ELABD, C.; AMRI, Ez-Z.; AILHAUD G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, v. 87, p. 125–128, 2005.
- RODRIGUEZ, A.M.; PISANI, D.; DECHESNE, C. A.; TURC-CAREL, C.; KURZENNE, J-Y.; AILHAUD G.; DANI, C. *et al* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* v. 201, p. 1397–1405, 2005.
- SARAVANAPAVAN, P.; JONES, J. R.; PRYCE, R. S.; HENCH, L. L. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: a comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O). *J Biomed Mater Res A*; 66: 110- 119, 2003.
- SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells - Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells*, v. 25, p. 818–827, 2007.
- SCHERBERICH, A.; GALLI, R.; JAQUIERY, C.; FARHADI, J.; MARTIN, I. Three-Dimensional Perfusion Culture of Human Adipose Tissue-Derived Endothelial and Osteoblastic Progenitors Generates Osteogenic Constructs with Intrinsic Vascularization Capacity. *Stem Cells*, v. 25, p.1823–1829, 2007.
- SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Bioactive sol-gel foams for tissue repair *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 59, p. 340–348, 2002.
- SHI, Y. Y.; NACAMULI, R. P.; SALIM, A. *et al*. The osteogenic potential of adipose derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg*, v. 116, p. 1686–1696, 2005.
- SIKAVITSAS, V. I.; BANCROFT, G. N.; HOLTORF, H. L.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion

culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 100, p. 14683–14688, 2003.

SIKAVITSAS, V. I.; BANCROFT, G. N.; LEMOINE, J. J.; LIEBSCHNER, M. A. K.; DAUNER, M.; MIKOS, A. G. Flow Perfusion Enhances the Calcified Matrix Deposition of Marrow Stromal Cells in Biodegradable Nonwoven Fiber Mesh Scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 33, n. 1, p. 63–70, 2005.

SLAVKIM, H. C. Recombinant DNA technology and clinical dentistry. *Int J Prosthodont* 1989; 2: 80-96.

SMEJKAL, G. B.; KAUL, C.A. Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *J. Histochem. Cytochem.*, 49 (9), 1189-1190, 2001.

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

STEPHENS, J. S.; COOPER, J. A.; PHELAN, F. R. Jr; DUNKERS, J. P. Perfusion flow bioreactor for 3D *in situ* imaging: investigating cell/biomaterials interactions. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 4, p. 952-961, 2007.

TAKEZAWA, T. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behaviour. *Biomaterials*; v. 24, p. 2267-2275, 2003.

TALÉNS-VISCONTI, R.; BONORA, A.; JOVER, R.; MIRABET, V.; CARBONELL, F.; CASTELL, J. V.; GÓMES-LECHÓN, M. J. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells *World J Gastroenterol*, 12(36): 5834-5845, 2006.

TURGERMAN, G.; PITTMAN, D. D.; MÜLER, R.; KURKALLI, B. G.; ZHOU, S.; PELLED, A. *et al.* Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med*. 3 (3), 240-251, 2001.

TULLBERG-REINERT, H.; JUNDT, G. 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*, 112, 4: 271-276, 1999.

VACANTI, J.; VACANTI, C. The History and Scope of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering*, 3^a ed., Elsevier, Inc, Capítulo 1, p. 3-6, 2007.

VALERIO, P.; PEREIRA, M. M.; GOES, A. M.; LEITE, M. F. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, v. 25, p. 2941–2948, 2004.

VALERIO, P.; GUIMARÃES, M. H. R.; PEREIRA, M. M.; LEITE, M. F.; GOES, A. M. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 16, p. 851– 856, 2005.

VISTICA, D. T.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; MONKS, A.; BOYD, M. R. New Carbon Dioxide-Independent Basal Growth Medium for Culture of Diverse Tumor and Nontumor Cells of Human and Nonhuman Origin. *J Natl Cancer Inst* 82 (12): 1055-1061, 1990.

XYNOS, I. D., EDGAR, A. J.; BUTTERY, L. D. K.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Bioph Res Co.*, v. 276, p. 461–465, 2000a.

XYNOS, I. D., EDGAR, A. J.; BUTTERY, L. D. K.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass_ 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res*, v. 155, n. 2, p. 151–157, 2000b.

XYNOS, I. D., HUKKANEN, m. v. j.; J.; BUTTERY, L. D. K.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: Implications and applications for bone tissue engineering. *Calcified Tissue Int.*, v. 67, n. 4, p. 321–329, 2000c.

ZHAO, F.; GRAYSON, W. L.; MA, T.; IRSIGLER, A. Perfusion Affects the Tissue Developmental Patterns of Human Mesenchymal Stem Cells in 3D Scaffolds. *J. Cell. Physiol.* 219: 421–429, 2009.

ZONARI, A. A. C. Avaliação da adesão, proliferação e diferenciação endotelial de células-tronco humanas cultivadas em nanofibras de polihidroxibutirato. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2010, 107p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica e Imunologia).

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, 7, 211-228, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHIJAN, P.; De UGARTE, D. A.; HUANG, J.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279-4295, 2002.

WANG, Y. C.; UEMURA, T.; DONG, R.; KOJIMA, H.; TANAKA, J.; TATEISHI, T. Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. *Tissue Engineering*, v. 9, n. 6, p. 1205-1214, 2003.

WEBER, H. P.; FIORELLINI, J. P. The biology and morphology of the implant-tissue interface. *Alpha Omegan*; 85: 61-64, 1992.

WENDT, D.; MARSANO, A.; JAKOB, M.; HEBERER, M.; MARTIN, I. Oscillating Perfusion of Cell Suspensions Through Three-Dimensional Scaffolds Enhances Cell Seeding Efficiency and Uniformity. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 84, n. 2, 2003.

WESTERLUND, U.; MOE, M. V.; VARGHESE, M.; BERG-JOHSEN, J.; OHLSSON, M.; LANGMOEN, O. A.; SVENSSONA, M. Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Experimental Cell Research* 289, 378–383, 2003.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials, *Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, Chester, England, March 3–5, 4, Elsevier, New York, 1987.

WILSON, J.; CLARK, A. E.; HALL, M.; HENCH, L. L. Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants. *J Oral Implantol*; 19: 295-302, 1993.

YUE, S.; LEE, P. D.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, G.; JONES, J. R. Evaluation of 3-D bioactive glass scaffolds dissolution in a perfusion flow system with X-ray microtomography. *Acta Biomaterialia* 7, 2637–2643, 2011.

ANEXO I

Composição do meio Leibovitz's (Gibco)

O meio Leibovitz foi desenvolvido em 1963 por Albert Leibovitz e foi formulado para o uso em atmosfera sem CO₂.

Desenvolvido para o suporte do crescimento celular em ambientes não equilibrados pelo CO₂, as formulações foram desenvolvidas sem um sistema tampão de bicarbonato de sódio. O meio é tamponado pelo fosfato e aminoácidos de base livres (L-arginina principalmente, mas também L-histidina e L-cisteína). A produção de metabólitos ácidos é reduzida através da substituição de glicose por galactose e piruvato de sódio. Relatado para suportar o crescimento de células HEP-2, de rim de macaco e explantes primários tecidos humanos embrionários e adultos.

Os componentes do meio Leibovitz's Independente de CO₂ são:

COMPONENTES	Peso Molecular	Concentração (mg/L)
Aminoácidos		
Glicina	75	200
L-Alanina	89	225
L-Arginina	174	500
L-Asparagina	132	250
L-Cisteína	121	120
L-Glutamina	146	300
L-Histidina	155	250
L-Isoleucina	131	250
L-Leucina	131	125
L-Lisina	146	75
L-Metionina	149	75
L-Fenilalanina	165	125
L-Serina	105	200
L-Treonina	119	300
L-Triptofano	204	20
L-Tirosina	181	300
L-Valina	117	100
Vitaminas		

Cloreto de Colina	140	1
D-Calcio pantotenato	477	1
Ácido Fólico	441	1
Niacinamida	122	1
Cloridrato de Piridoxina	206	1
Riboflavina 5'-fosfato Na	478	0.1
Tiamina monofosfato	442	1
i-Inositol	180	2
Sais Inorgânicos		
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (anidro)	111	140
Cloreto de Magnésio (anidro)	95	93.7
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (anidro)	120	97.67
Cloreto de Potássio (KCl)	75	400
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	136	60
Cloreto de Sódio (NaCl)	58	8000
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄) anidro	142	190
Outros Componentes		
D+ Galactose	180	900
Vermelho de Fenol	398	10
Vermelho de Fenol	376.4	10
Piruvato de Sódio	110	550

Tabela IA: Componentes do meio Leibovitz's Independente de CO₂.

ANEXO II

Composição do meio DMEM (Gibco)

O meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) é amplamente utilizado como meio basal de suporte para o crescimento de diferentes células mamárias. As células cultivadas com sucesso no meio DMEM incluem fibroblastos primários, neuronais, células da glia, HUVECs, e células do músculo liso, assim como células da linhagem HeLa, 293, Cos-7 e PC-12.

Os componentes do meio DMEM são:

COMPONENTES	Peso Molecular	Concentração (mg/L)
Aminoácidos		
Glicina	75	30
L-Arginina	174	84
L-Cisteína	121	62,57
L-Glutamina	146	584
L-Histidina	155	42
L-Isoleucina	131	105
L-Leucina	131	105
L-Lisina	146	146
L-Metionina	149	30
L-Fenilalanina	165	66
L-Serina	105	42
L-Treonina	119	95
L-Triptofano	204	16
L-Tirosina	181	104,20
L-Valina	117	94
Vitaminas		
Cloreto de Colina	140	4
D-Calcio pantotenato	477	4
Ácido Fólico	441	4

Niacinamida	122	4
Cloridrato de Piridoxina	206	4
Riboflavina 5'-fosfato Na	478	0,4
Tiamina monofosfato	442	4
i-Inositol	180	7,2
Sais Inorgânicos		
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (anidro)	111	265
<u>Nitrato de Ferro III</u>	<u>404</u>	<u>0,10</u>
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (anidro)	120	200
Cloreto de Potássio (KCl)	75	400
Cloreto de Sódio (NaCl)	58	6400
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄) anidro	142	125
Outros Componentes		
<u>Glicose</u>	<u>180</u>	<u>1000</u>
Vermelho de Fenol	398	15
Vermelho de Fenol	376.4	15
Piruvato de Sódio	110	110

Tabela IIA: Componentes do meio DMEM. Nota-se que os componentes presentes apenas neste meio e não no meio LEI estão sublinhados. E os espaços deixados em branco são de componentes do meio LEI que não são encontrados no meio DMEM.