



Cultivo de células osteoprogenitoras em compósito 3-D hidroxiapatita-colágeno sob condições estática e dinâmica

Doris Moura Campos

► To cite this version:

Doris Moura Campos. Cultivo de células osteoprogenitoras em compósito 3-D hidroxiapatita-colágeno sob condições estática e dinâmica. Agricultural sciences. Université de Haute Alsace - Mulhouse; Institut Alberto Luiz Coimbra d'études doctorales et de recherche en ingénierie (Rio de Janeiro), 2012. Portuguese. NNT : 2012MULH6331 . tel-00725990

HAL Id: tel-00725990

<https://theses.hal.science/tel-00725990>

Submitted on 28 Aug 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CULTIVO DE CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS EM COMPÓSITO 3-D
HIDROXIAPATITA-COLÁGENO SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Doris Moura Campos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadoras: Glória Dulce de Almeida Soares

Karine Anselme

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2012

CULTIVO DE CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS EM COMPÓSITO 3-D
HIDROXIAPATITA-COLÁGENO SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Doris Moura Campos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

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

Dr^a. Karine Anselme, Ph. D.

Dr. Alex Balduino de Souza, D. Sc.

Prof. Jacques Werckman, Dr.Ing.

Prof. Marcos Farina de Souza, D.Sc.

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

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
FEVEREIRO DE 2012

Campos, Doris Moura

Cultivo de células osteoprogenitoras em compósito 3-D
hidroxiapatita-colágeno sob condições estática e dinâmica/
Doris Moura Campos. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

XVI, 132 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Glória Dulce de Almeida Soares

Karine Anselme

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 112-125.

1. Compósito hidroxiapatita-colágeno. 2. Biorreatores.
3. células osteoprogenitoras. I. Soares, Glória Dulce de
Almeida *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro,
COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.
III. Título.

Aos meus avós, Luiza e Ilia, por representarem tudo o
que eu precisava acreditar. À Elizabeth Zagallo.

“Antes que o navio fosse pensado e construído, houve o
sonho de uma terra a que se chegar. O sonho de cruzar os
mares precede a ciência de construir navios. A ciência
existe por causa do sonho.” (Rubem Alves)

AGRADECIMENTOS

1. A Deus, aos guias e a tudo em que acredito ser importante dentro desse Universo infinito, por concederem-me mais uma vitória na caminhada profissional e pessoal. Obrigado pela proteção e força interior que me deram.
2. Às minhas orientadoras Glória Soares e Karine Anselme, que por muitos momentos não foram apenas chefes, mas também amigas, protetoras e conselheiras. À Glória, por ter me orientado na vida desde tão jovem. Um pedaço dela e de seu trabalho carregarei comigo. À Karine, pour m'écouter pendant les moments difficiles et pour être un exemple de chercheur.
3. Aos membros da banca pela honra da presença, por avaliarem esse trabalho e o enriquecerem com suas sugestões. Vocês são meus exemplos em suas respectivas especialidades.
4. À minha pequenina família, que compreendeu o quanto eu precisava desenvolver esse trabalho tão longe de casa. Em especial, à minha avó Luiza Stojanoff, que é meu tudo e à Elizabeth Zagallo, que foi, infelizmente, a última gota de estímulo desse trabalho.
5. Aos incríveis amigos do incrível Laboratório de Biomateriais do PEMM, mesmo aqueles que já passaram durante esses últimos 8 anos de trabalho. Obrigada a todas as pessoas que não mediram esforços para que nossos momentos juntos sempre fossem de inspiração científica e pessoal. Aos amigos do IS2M, que me receberam e acolheram de maneira única e inesquecível. Aos pesquisadores, professores, engenheiros, técnicos, administrativos, doutorandos e estagiários que contribuíram com esse trabalho e com minha felicidade nos últimos anos.
6. Ao CNPQ, CAPES, CNRS e FAPERJ pelo apoio financeiro durante a execução desse trabalho.
7. A todos os amigos “não-científicos”, que foram minha luz em momentos de trevas. A todos, mesmo não lembrados, por todo apoio e carinho.

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

CULTIVO DE CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS EM COMPÓSITO 3-D HIDROXIAPATITA-COLÁGENO SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Doris Moura Campos

Fevereiro/2012

Orientadoras: Glória Dulce de Almeida Soares

Karine Anselme

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Os progressos na área da Bioengenharia tecidual vêm permitindo o desenvolvimento de biomateriais que mimetizam as propriedades encontradas nos tecidos humanos. Compósitos formados por hidroxiapatita (HA) e colágeno (Col) são classificados como bio-derivados e biomiméticos. Os objetivos desse trabalho foram: produzir um arcabouço 3-D e observar o comportamento de células osteoprogenitoras cultivadas em seu interior sob condições de cultura estática e dinâmica (utilizando duas vazões - 0,03ml/min e 0,3ml/min). Para a avaliação biológica, células estromais (Stro+1A) foram cultivadas e sua capacidade de colonização e comportamentos de adesão, proliferação e diferenciação foram observados. O arcabouço 3-D HA-Col foi produzido pela reorganização das fibras de colágeno simultânea ao processo de nucleação e crescimento dos cristais de HA. O material foi reticulado e esterilizado por radiação gamma. Células Stro+1A foram inoculadas (5×10^5 células/amostra) e cultivadas em 37°C e 5% CO₂ por até 21 dias. Os resultados da espectroscopia no Infravermelho e da difração de raios X sugerem a formação de uma HA carbonatada deficiente em cálcio. Na condição dinâmica de maior vazão, a viabilidade celular aumentou no decorrer dos 21 dias de cultura. Adicionalmente, pela microscopia eletrônica de varredura e de luz em cortes histológicos corados, as células apresentaram-se aderidas e com morfologia fibroblastóide, colonizando o interior do arcabouço compósito.

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

OSTEOPROGENITOR CELLS CULTURE ON 3-D HYDROXYAPATITE-
COLLAGEN COMPOSITE UNDER STATIC AND DYNAMIC CONDITIONS

Doris Moura Campos

February/2012

Advisors: Glória Dulce de Almeida Soares

Karine Anselme

Department: Metallurgical and Materials Engineering

The progress in Tissue Engineering area allows the development of biomaterials that mimic the properties of natural tissues. For biomedical applications in mineralized tissues, composites based on hydroxyapatite (HA) and collagen (Col) have presented good results when implanted *in vivo*. The aim of this work was to produce a 3-D matrix and to observe the cell behaviour when stromal cells are cultured in contact with HA-Col scaffold under static and dynamic conditions. For *in vitro* biological evaluation, osteoprogenitor human cells (Stro+1A cells) were grown and their colonization capacity and adhesion, proliferation and differentiation behaviour were quantified. Two perfusion flow rates (0,03ml/min and 0,3ml/min) were proposed for dynamic culture. The HA-Col composite was prepared by reorganization of Col fibrils simultaneously with HA crystal nucleation and precipitation from calcium and phosphate rich solutions. Afterwards, the composites were crosslinked and sterilized by gamma radiation. Stro+1A cells were inoculated (5×10^5 cells/sample) into the scaffolds and cultured over 21 days in a humid incubator at 37°C and 5% CO₂. Infrared spectroscopy and X-ray diffraction results suggested a calcium-deficient hydroxyapatite as mineral phase. About cell culture, the cell number increased under higher flow rate dynamic culture. By scanning electron microscopy and histological sections, we observed cells adhered and spread inside colonized scaffolds.

SUMÁRIO

I(a)- INTRODUCTION.....	17
I- INTRODUÇÃO.....	19
II(a)- BIBLIOGRAPHIE.....	22
II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
II. 1- BIOENGENHARIA TECIDUAL.....	24
II. 2- BIOMATERIAIS.....	26
II. 3- COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA-COLÁGENO.....	27
II. 4- RETICULAÇÃO.....	29
II. 5- MINERALIZAÇÃO BIOLÓGICA.....	31
II. 6- CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS.....	33
II. 7- CULTIVO DINÂMICO EM BIOREATORES.....	35
III(a)- OBJECTIVE GÉNÉRAL.....	39
III- OBJETIVO GERAL.....	40
III.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
IV(a)- MATÉRIAUX ET MÉTHODES.....	41
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
IV. 1- EXTRAÇÃO DO COLÁGENO BOVINO E PRODUÇÃO DO ARCABOUÇO COMPÓSITO HIDROXIAPATITA-COLÁGENO.....	43
IV. 2- RETICULAÇÃO.....	45
IV.3- CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS.....	46
IV.3.1- Difração de raios x (DRX) e espectroscopia no infra-vermelho com transformada de fourier (FT-IR).....	46
IV.3.2- Termogravimetria (TGA) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	48
IV.3.3- Microscopia eletrônica de varredura (MEV), transmissão (MET) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	49
IV.4- POROSIDADE.....	50
IV.4.1- Hexano.....	50
IV.4.2- Histologia e análise de imagens.....	50
IV.6- CITOTOXICIDADE.....	53
IV.6.1- Extrato do arcabouço após a síntese – XTT, Vermelho neutro e Cristal violeta.....	54

IV.6.2- Presença de GTA livre nos extratos do arcabouço após cultivo.....	54
IV.7- CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	55
IV.8- CULTURA DE CÉLULAS.....	58
IV.9- CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO COMPORTAMENTO CELULAR SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	59
IV.9.1- Viabilidade celular.....	59
IV.9.2- Colonização celular.....	60
IV.9.3- Diferenciação celular.....	61
IV.10- CONCENTRAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO EM MEIO DE CULTURA....	63
V(a). RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	64
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
V.1- EXTRAÇÃO DO COLÁGENO E FABRICAÇÃO DO COMPÓSITO.....	68
V.2-CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ARCABOUÇO COMPÓSITO HA-COL.....	69
V.2.1- Fase mineral na ausência do colágeno.....	69
V.2.2- Arcabouço compósito HA/Col.....	70
V.2.3- Estimativa das fases mineral e orgânica no arcabouço HA/Col.....	74
V.3- POROSIDADE.....	76
V.3.1- Hexano.....	76
V.3.2- Porosidade por análise de imagens.....	77
V.4- CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ARCABOUÇO HA/COL.....	78
V.4.1- Microscopia de fluorescência.....	78
V.4.2- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).....	79
V.5- CITOTOXICIDADE DO ARCABOUÇO COMPÓSITO HA/COL.....	83
V.5.1- Citotoxicidade do extrato do arcabouço pós-síntese.....	84
V.5.2- Liberação de GTA.....	84
V.6- AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	85
V.6.1- Adesão.....	86
V.6.2- Viabilidade celular.....	88

V.6.3- Análise morfológica - microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	94
V.6.4- Concentração de íons cálcio em solução.....	97
V.6.5- Colonização do arcabouço HA/Col reticulado pelas Stro+1A.....	99
V.6.6- Diferenciação celular.....	99
VII- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
VIII(a)- CONCLUSIONS.....	123
VIII- CONCLUSÕES.....	125
IX- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127
X- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	128
Anexo I – Convenção de co-tutela de tese.....	142

Lista de Figuras:

Figura IV.1: Diagrama da extração das fibrilas de colágeno através da dissociação das fibras pela solução de ácido acético 0,5M, 10% de pepsina à 37°C.....	43
Figura IV.2: Diagrama do processo de síntese do arcabouço compósito HA/Col.....	44
Figura IV.3: Diagrama do processo de reticulação, moldagem e esterilização do arcabouço compósito HA/Col.....	46
Figura IV.4: Diagrama da seção do arcabouço compósito usada para o cálculo da porosidade paralela à superfície.....	52
Figura IV.5: Diagrama da seção do arcabouço compósito usada para o cálculo da porosidade transversal à superfície.....	52
Figura IV.6: Tratamento de imagens pelo programa Image J® através de micrografias de luz branca de seções histológicas (15µm) coradas com Picrosirius.....	53
Figura IV.7: Sistema dinâmico e seus componentes. Em (A), esquema do sistema dinâmico com bioreator, garrafas de cultivo e suportes posicionados. Detalhe do bioreator utilizado (B), dos suportes que posicionam as amostras (C), do bioreator montado (D) e do sistema completo (E). Direitos autorais <i>Minucells</i> ®	56
Figura IV.8: Diagrama das amostras do arcabouço HA/Col no interior do biorreator <i>Minucells</i> ®	56
Figura IV.9: Diagrama do sistema dinâmico em baixa vazão. Em (1), reservatório de “entrada” de meio fresco de cultivo; (2) bomba peristáltica; (3) biorreator contendo 3 amostras; (4) tubo permeável à gases para passagem de meio e (5) reservatório de “saída” de meio de cultivo.....	57
Figura IV.10: Diagrama do sistema fechado dinâmico em alta vazão. Em (1), reservatório de “entrada” e “saída” de meio de cultivo; (2) bomba peristáltica; (3) biorreator contendo 3 amostras e (4) tubo permeável à gases para passagem de meio.....	57
Figura IV.11: Diagrama da preparação das amostras do arcabouço compósito para o cultivo celular em três condições de cultura. FA= fosfatase alcalina, OC= osteocalcina, PIP= Pró-colágeno I.....	59
Figura IV.12: Gráfico referente à linha base das células STRO+1A. A equação da reta foi utilizada para a conversão das absorbâncias lidas pelo método do MTT em número de células.....	60

Figura IV.13: Tratamento de imagens (10x) pelo programa Image J® através de micrografias de fluorescência de seções histológicas (15µm) com núcleos celulares marcados por DAPI.....	61
Figura V.1: Macrografia do arcabouço compósito HA/Col sintetizado antes da conformação em cilindros-molde.....	68
Figura V.2: Difratoograma do fosfato de cálcio produzido na ausência do colágeno. Em (A), amostra calcinada à 1000°C e (B) em condições de síntese (38°C).....	69
Figura V.3: Difratoograma do arcabouço compósito HA/Col sob condições de síntese pH=9 e 38°C.....	71
Figura V.4: Espectros de FT-IR da proteína colágeno extraída (A), do compósito HA/Col (B) e da hidroxiapatita calcinada à 1000°C (C) produzidos segundo as condições de síntese descritas.....	72
Figura V.5: FT-IR do compósito HA/Col antes (a) e após (b) o processo de reticulação pela solução de 0,125% de GTA.....	74
Figura V.6: Porosidade correspondente às seções histológicas seriadas paralelas à superfície de uma amostra do arcabouço compósito. Análise de imagem em seções de 15 µm coradas com Picrosirius e tratadas por Image J®	77
Figura V.7: Micrografia do arcabouço compósito HA/Col reticulado corado por Picrosirius. Fibras de colágeno em vermelho. Detalhes (*) nos poros presentes na estrutura 3-D.....	78
Figura V.8: Micrografia da superfície do arcabouço compósito HA/Col reticulado corada por Picrosirius e observada em microscopia de fluorescência.....	79
Figura V.9: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura compósito HA/Col reticulado (A). Detalhe para a deposição mineral das fibras (B). Magnificações: 250x; 10000x.....	80
Figura V.10: Espectro de EDS do arcabouço compósito HA/Col reticulado. O pico de ouro (Au) decorre do recobrimento do compósito com ouro.....	80
Figura V.11: Micrografias de MEV do arcabouço compósito HA/Col reticulado submetido às condições de cultivo durante 21 dias. Magnificação: 15x.....	81
Figura V.12: Micrografias de TEM do arcabouço compósito HA/Col reticulado. Em (a), alto padrão de dispersão dos nanocristais de HA na matriz orgânica de Col; em (b), formação de alguns aglomerados policristalinos (*) evidenciando a heterogeneidade do processo e em (c) detalhes da microporosidade (*)......	82

Figura V.13: Micrografias do arcabouço compósito HA/Col reticulado contrastado com uranila. Em (A), detalhe da fibrila de Col após mineralização e em (B) orientação dos nanocristais de HA imersos na matriz de Col.....	83
Figura V.14: Citotoxicidade do compósito HA/Col reticulado segundo três métodos de determinação: XTT, vermelho neutro e cristal violeta. Diferenças significantes entre os grupos de materiais testados (*, **, ***). $p < 0,05$	84
Figura V.15: Detalhe dos espectros de UV-visível das soluções de PBS expostas ao arcabouço até 21 dias. Sta= condição estática; Dyn= condição dinâmica de alta vazão.....	85
Figure V.16: Adesão das células Stro+1A no arcabouço compósito HA/Col reticulado. n=3. Diferenças significativas entre os tempos (*). $p < 0,05$	87
Figura V.17: Micrografias das células Stro+1A em processo de reconhecimento da superfície e adesão sobre o arcabouço compósito HA/Col reticulado. Magnificações: 500x, 1000x e 2000x.....	88
Figura V.18: Viabilidade celular no arcabouço compósito HA/Col reticulado em diferentes tempos e sob diferentes condições. Diferenças significativas entre os tempos e condições de cultivo (*, **, ***). n=6. $p < 0,05$	89
Figura V.19: Contagem dos núcleos celulares marcados por DAPI presentes por seção histológica do arcabouço compósito HA/Col submetido às diferentes condições de cultivo por até 21 dias. n= 4.....	92
Figura V.20: Número de células Stro+1A cultivadas no arcabouço compósito HA/Col reticulado em diferentes tempos, vazões e posições no interior do bioreator. n=6. $p < 0,05$	93
Figura V.21: Micrografias das células Stro+1A cultivadas no arcabouço compósito HA/Col reticulado após 1 e 3 dias de cultivo sob diferentes condições. Magnificação: 2000x.....	95
Figura V.22: Micrografias das células Stro+1A cultivadas no arcabouço compósito HA/Col reticulado após 7 e 14 dias de cultivo sob diferentes condições. Magnificação: 2000x.....	96
Figura V.23: Micrografias das células Stro+1A cultivadas no arcabouço compósito HA/Col reticulado após 21 dias de cultivo sob diferentes condições. Magnificação: 2000x.....	97
Figura V.24: Concentração de Ca^{+2} em meio de cultura com o arcabouço compósito HA/Col reticulado em ausência (a) e presença (b) de células Stro+1A com 7, 14 e 21	

dias de cultura e sob diferentes condições. Diferenças significativas entre os tempos e condições de cultivo (*,**). $p < 0,05$	98
Figura V.25: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 1 e 3 dias de cultivo sob diferentes condições.....	100
Figura V.26: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 7 e 14 dias de cultivo sob diferentes condições.....	101
Figura V.27: Micrografia do núcleo das células Stro+1A marcadas por DAPI cultivadas sob o arcabouço HA/Col em sistema dinâmico de baixa vazão após 7 dias. Detalhe para a cromatina altamente condensada no interior do núcleo (setas).....	102
Figura V.28: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 21 dias de cultivo sob diferentes condições.....	103
Figura V.29: Porosidade do arcabouço compósito HA/Col submetido às condições de cultivo: estático, dinâmica baixa e alta vazão. Em vermelho, porosidade do compósito após 24 horas imerso em meio de cultura.....	104
Figura V.30: Diagrama das seções observadas do arcabouço compósito HA/Col colonizado pelas células Stro+1A sob condição dinâmica.....	104
Figura V.31: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 21 dias de cultivo sob sistema dinâmico em baixa vazão. Em (A), detalhe da região central da amostra e, em (B), da região periférica.....	105
Figura V.32: Diagrama das forças atuantes na superfície do arcabouço compósito HA/Col submetido ao sistema dinâmico.....	107
Figura V.33: Diagrama das seções observadas na colonização periférica do arcabouço compósito HA/Col por células Stro+1A sob sistema dinâmico de alta vazão após 21 dias.....	108
Figura V.34: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 14 dias de cultivo sob sistema dinâmico em alta vazão. Em (A e D), detalhe da região central da amostra na superfície superior e inferior; em (B e E), detalhe das laterais da amostra; e em (C e F), detalhes da região periférica na superfície superior.....	109

Figura V.35: Concentração de fosfatase alcalina expressa por células Stro+1A cultivadas sob arcabouço compósito HA/Col sob diferentes condições e tempos de cultivo. Em (A), condição estática, e em (B e C), sistema dinâmico de baixa e alta vazão, respectivamente. Diferenças significativas entre os tempos de cultivo (*). $p < 0,05$	112
Figura V.36: Concentração de osteocalcina produzida por células Stro+1A cultivadas sob arcabouço compósito HA/Col sob diferentes condições e tempos de cultura. Em (A), cultivo estático, em (B e C), sistema dinâmico de baixa e alta vazão. Diferenças significativas entre os tempos de cultivo (*). $p < 0,05$	114
Figura V.37: Concentração de pró-colágeno do tipo I (PIP) produzida por células Stro+1A cultivadas sob arcabouço compósito HA/Col sob diferentes condições e tempos de cultura. Em (A), cultivo estático, em (B e C), sistema dinâmico de baixa e alta vazão, respectivamente. Diferenças significativas entre os tempos de cultivo (*). $p < 0,05$	116

Lista de Tabelas:

Tabela V.1: Análise termogravimétrica do arcabouço compósito HA/Col reticulado e submetido durante 21 dias às condições de cultivo estático.....	75
Tabela V.2: Porosidade de 3 amostras do arcabouço compósito HA/Col reticulado medida por deslocamento de líquido.....	77

I(a)- INTRODUCTION

L'organisme humain présente de nombreuses constantes de régénération tissulaires et c'est cette caractéristique essentielle qui maintient l'équilibre physiologique. Toutefois, l'existence de lésions importantes provoquée par un déséquilibre interne ou externe peut empêcher l'organisme de s'auto-régénérer. Dans ce cas, l'application des biomatériaux développés pour des applications biomédicales peuvent améliorer le processus de guérison.

Pour les applications en tissus durs, les biomatériaux doivent posséder des propriétés similaires aux matrices naturelles tant sur le plan biologique que physico-mécanique (Engel *et al.*, 2007). De plus, les propriétés d'ostéoconduction, d'ostéoinduction et de biodégradabilité sont primordiales dans la réussite de l'implantation. Dans les applications en bioingénierie osseuse, les implants métalliques et les greffes à base de polymères et céramiques sont très largement utilisés. Les combinaisons entre différents matériaux, tel que les composites, augmentent les possibilités d'applications.

Dans ce domaine, les composites à base de collagène (Col) et d'hydroxiapatite (HA) sont devenus tellement performant qu'ils peuvent être classifiés comme des matériaux biomimétiques (Cui *et al.*, 2007; Zhai *et al.*, 2005 ; Chang & Tanaka, 2002). Ce type de matériaux présente une composition chimique similaire à la matrice osseuse naturelle, lui permettant d'être dégradé par les cellules locales (Kikuchi *et al.*, 2001 ; 1999). Une fois que le tissu osseux possède un processus constant de remodelisation, le composite HA-Col fonctionne comme un support temporaire jusqu'au rétablissement total.

En effet, la structure tridimensionnelle lui confère des propriétés telles qu'il lui permettent d'être colonisé par les cellules et ainsi de participer au mécanisme d'adhésion, prolifération et différenciation cellulaire. Dans le composite, les cellules ostéoprogénitrices ont la capacité de produire une nouvelle matrice (Vernon *et al.*, 2005). Ce comportement peut être optimisé par la culture dynamique en bioréacteur (Rauh *et al.*, 2011 ; David *et al.*, 2011). Ce complexe tridimensionnelle semblable à un tissu naturel sera utilisé par l'ingénierie tissulaire.

Cette thèse propose la production d'une matrice tridimensionnelle poreuse à base d'hydroxyapatite et de Collagène (50:50wt%). Ce composite réticulé par le glutaraldéhyde sera caractérisé par des différentes techniques et servira de support pour la culture cellulaire. Des cellules estromales ostéoprogénitrices seront cultivées dans un environnement statique et dynamique et leurs capacité de colonisation ainsi que leurs comportements d'adhésion, de prolifération, de différenciation seront observés. Ce biomatériau colonisé par les cellules sera développé afin de remplacer la matrice osseuse pendant le traitement biomédical.

I- INTRODUÇÃO

O organismo humano apresenta constantes taxas de renovação e manutenção tecidual que levam à sua homeostasia. Entretanto, quando o reparo natural de áreas lesadas é insuficiente, os tecidos e órgãos necessitam da intervenção de biomoléculas ou biomateriais que acelerem o processo de retorno ao equilíbrio fisiológico. De maneira geral, as biomoléculas e os biomateriais devem apresentar propriedades e características que sejam compatíveis com o sítio de aplicação, sem gerar consequências danosas ao organismo.

Dentro da área multidisciplinar da bioengenharia tecidual, os materiais biomiméticos destacam-se por possuírem características semelhantes às da própria matriz extracelular na qual serão aplicados (Engel *et al.*, 2007). Para acelerar o reparo da lesão, integram-se facilmente ao tecido original adjacente, sendo substituídos ao longo do tempo e dispensando novas intervenções cirúrgicas.

O tecido ósseo, assim como os outros tecidos do organismo humano, apresenta um constante processo de renovação ou remodelação tecidual. Em taxas interrelacionadas, a deposição de matriz mineralizada, e sua posterior dissolução, ocorrem como resultado da atuação de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Porém, quando essas taxas entram em desequilíbrio (osteoporose, por exemplo) ou quando o organismo sofre um processo de injúria (como uma fratura ou um tumor), o organismo deve rapidamente responder aos estímulos externos aplicados. Para isso, os materiais selecionados para intervenções de reparo ou reestruturações ósseas devem se assemelhar a um “osso artificial” (Whal and Czernuszka, 2006; Vallet-Regí, 1997).

Os biomateriais utilizados no reparo de tecidos duros (ossos e dentes) apresentam propriedades mecânicas, biológicas e/ou estruturais semelhantes às encontradas nos tecidos saudáveis. Destacam-se as próteses metálicas (que atendem bem aos requisitos mecânicos) e os enxertos poliméricos, cerâmicos e de materiais compósitos. Estes últimos podem ser constituídos por moléculas de diferentes origens (natural/sintética; orgânica/mineral) (Costa *et al.*, 2005). A biocompatibilidade, biofuncionalidade e a taxa de biodegradação/ reposição do tecido natural são algumas características requeridas aos biomateriais utilizados (Zhang & Webster, 2009).

Atualmente, a produção de arcabouços 3-D vem ganhando um amplo espaço dentro da comunidade científica graças às novas condições de cultivo. A cultura estática, tradicionalmente utilizada desde o início do século XX, apresenta limitações em relação ao aporte de gases e nutrientes, restringindo o desenvolvimento de arcabouços de grandes dimensões (Zhang *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004). A introdução de câmaras - ou biorreatores - com transporte de massa constante aprimora a troca de oxigênio, nutrientes e excretas celulares (Rauh *et al.*, 2011; David *et al.*, 2011). As aplicações para esse novo cultivo vão desde a fabricação de biomateriais homogeneamente colonizados por células, até como modelos para a descrição de diferentes patologias (Zhang *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004).

Com respeito à produção de materiais biomiméticos para bioengenharia óssea, o uso de compósitos baseados em hidroxiapatita (HA) e colágeno tipo I (Col I) pode potencializar o reparo quando aplicados às lesões (Cui *et al.*, 2007 ; Zhai *et al.*, 2005 ; Chang and Tanaka, 2002a,b). A apatita biológica é o principal fosfato de cálcio encontrado na matriz óssea mineralizada e essa característica permite ao osso desempenhar sua função de sustentação do organismo. Colágeno tipo I é a proteína mais abundante da matriz orgânica óssea conferindo-lhe tenacidade. O compósito natural formado por essas duas moléculas pode ser sintetizado *in vitro* e utilizado como biomaterial biomimético (Kikuchi *et al.*, 1999; 2001).

O objetivo de se produzir esse compósito está relacionado, a médio prazo, em sua taxa de substituição por tecido ósseo neoformado. No decorrer desse processo, devem oferecer o suporte mecânico até o tecido regenerar-se e remodelar-se naturalmente. Podem ser implantados com células específicas no estágio desejado e com moléculas sinalizadoras a fim de maximizar o crescimento do tecido e, portanto, a velocidade do reparo. Adicionalmente, resistem às forças de cisalhamento inerentes ao cultivo dinâmico em perfusão, pois suas razões de degradação e reabsorção também podem ser controladas com processos físico-químicos, como a reticulação das fibrilas de colágeno durante o processo de produção (Wahl & Czenuska, 2006; Usha *et al.*, 2005; Charulatha and Rajaram, 2003).

A compreensão dos processos relacionados ao cultivo dinâmico de células em arcabouços 3-D contribui para a evolução das pesquisas na área de biomateriais para aplicações biomédicas. A fabricação de biomateriais complexos, com estrutura e propriedades controladas, colonizados por células em processo de diferenciação no interior de biorreatores pode nos levar a uma nova geração de biomateriais mais similares aos órgãos naturalmente formados. De uma maneira mais direta, esses “complexos engenheirados *in-vitro*” visam acelerar o processo de reparo tecidual e melhoram a vida dos pacientes e da população.

O arcabouço compósito HA/Col foi sintetizado, reticulado e caracterizado para servir de suporte aos processos celulares observados ao longo de 21 dias de cultivo. A capacidade de adesão, proliferação, diferenciação celular e de colonização do material por parte de células osteoprogenitoras estromais foram avaliados. Três diferentes condições de cultivo foram estabelecidas: estática, dinâmica em baixa vazão e dinâmica em alta vazão. O complexo formado pelo biomaterial 3-D proposto e células osteoprogenitoras contribui para o entendimento dos fenômenos relacionados aos processos de reparo após a aplicação e faz parte dos avanços em bioengenharia tecidual.

II(a)- BIBLIOGRAPHIE

Le vieillissement progressif de la population actuelle aura comme conséquence l'augmentation du taux de maladie chronique (tumeurs, arthrites, etc). Les progrès de la médecine régénérative conduisent à une amélioration des conditions de vie des malades. L'utilisation déjà importante de cellules souches comme thérapie pour le traitement des différentes pathologies permet d'envisager de nouvelles perspectives. De plus, depuis la découverte du potentiel d'auto-régénération des tissus dans l'organisme humain, les recherches s'orientent vers cette capacité naturelle (Vernon *et al.*, 2005).

Dans ce domaine, la bioingénierie tissulaire réunit ces connaissances avec le développement des supports temporaires tridimensionnelles qui serviront de substituts biomimétiques (Engel *et al.*, 2007 ; Whal and Czernuszka, 2006). Les différents matériaux, comme des molécules organiques naturelles, peuvent être fonctionnalisés afin de garantir la réussite du traitement (Zhang & Webster, 2009 ; Costa *et al.*, 2005).

Les « complexes structurés » sont sélectionnés pour présenter des propriétés similaires aux tissus substitués (Whal and Czernuszka, 2006 ; Vallet-Regí, 1997). Des cellules progénitrices cultivées à l'intérieur de ces structures ont la capacité de les coloniser et de produire une nouvelle matrice extracellulaire. Les complexes peuvent encore servir de source pour la libération contrôlée de biomolécules comme les antibiotiques (Whal and Czernuszka, 2006; Friess, 1998).

Récemment, les avancements dans le champ de la culture dynamique à l'intérieur des bioréacteurs permet la construction des biomatériaux de dimensions plus importantes (Zhang *et al.*, 2009 ; Martin *et al.*, 2004). Le transport de masse constant optimise l'échange des gaz, de substances nourrissantes ainsi que des déchets cellulaires (Rauh *et al.*, 2011; David *et al.*, 2011). Cependant, l'utilisation de bioréacteurs standardise la production de « complexes structurés », élève les potentiels cellulaires et diminue les coûts de conception (Kinney *et al.*, 2011; Rauh *et al.*, 2011; Yeatts *et al.*, 2011a, b).

Pour l'ingénierie des tissus osseux, les composites tridimensionnelles à base de hydroxyapatite (HA) et collagène (Col) montrent de bons résultats *in-vitro* et *in-vivo*

(Cui *et al.*, 2007 ; Zhai *et al.*, 2005). La capacité ostéoconductrice de l'HA et la baisse immunogénicité du Col potentialisent leurs applications dans les os et les dents (Kikuchi *et al.*, 1999, 2001). En effet, la surface de fibre de Col favorise l'adhésion cellulaire pendant que le procédé de minéralisation augmente les propriétés mécaniques (Chang *et al.*, 2003).

Afin de maintenir la structure du composite en culture dynamique, nous pouvons réaliser des liaisons chimiques entre les résidus des amino-acides des fibres de Col. Le composite réticulé par le glutaraldéhyde présente le meilleur résultat, malgré sa cytotoxicité connue (Charulatha and Rajaram, 2003 ; Usha *et al.*, 2005). Néanmoins, l'usage en faible concentration et la stabilité de ses liaisons encouragent son utilisation. Une fois réticulé, il résiste aux forces de cisaillement provoquées par le flux des systèmes dynamiques.

L'étude du comportement cellulaire sur les composites HA-Col sous les conditions statiques et dynamiques contribue au développement des nouvelles technologies en bioingéniereries tissulaires. La biodégradabilité contrôlée de la matrice minéralisées et la capacité de différenciation des cellules ostéoprogénitrices sont deux propriétés primordiales dans la réparation totale tissulaire et la restauration de l'équilibre de l'organisme.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. 1- BIOENGENHARIA TECIDUAL

As sociedades atuais apresentam um aumento progressivo da idade média populacional, elevando a demanda de equipamentos e materiais médico-hospitalares, medicamentos e o custeio do sistema público de saúde. Segundo os recentes dados da Organização das Nações Unidas (ONU), a média de idade para todos os países vai subir de 29 para 38 anos em 2050. No momento, apenas menos de 11% da população mundial de 6,9 bilhões de pessoas está acima dos 60 anos. Entretanto, em 2050, a parcela aumentará para 22% (de uma população de 9 bilhões) e nos países desenvolvidos para 33% (Carta Capital, Junho/2009).

Apesar da população permanecer saudável, em boa condição física e ativa por mais tempo, os riscos de vida e surgimento de doenças crônicas e degenerativas (infecções ósseas, fraturas, osteoartrites, osteoporose, artrite reumatóide) também vêm aumentando nas últimas décadas. Entre outras ações, é importante o desenvolvimento de novas intervenções médicas, processos cirúrgicos e materiais de alta tecnologia que possibilitem uma rápida recuperação do paciente à sua vida produtiva.

Com esse objetivo, nas duas últimas décadas vêm se observando o desenvolvimento de uma área que une conhecimentos de diferentes saberes em tecnologia de ponta para o estabelecimento de produtos que visam essa melhoria exigida pelos pacientes.

Paralelo ao desenvolvimento de novas tecnologias, a descoberta do potencial de autoregeneração dos tecidos do organismo humano norteou a produção de materiais que aproveitem e estimulem essa capacidade. A habilidade de arcabouços naturais ou sintéticos de estimularem a invasão de células a partir do tecido adjacente é um parâmetro chave para a engenharia tecidual (Zhao *et al.*, 2002). O tecido adjacente passou a ser visto como uma ferramenta importante para o sucesso da integração do material no sítio de aplicação.

A bioengenharia tecidual é uma área multidisciplinar que pode ser classificada como medicina regenerativa pois substitui tecidos e órgãos danificados por substitutos funcionais e estruturalmente equivalentes (Carvalho, 2009). Agregando o termo “biomimética”, esses materiais planejados apresentam sua constituição e/ou função semelhantes aos encontrados nos tecidos vivos (Whal and Czernuszka, 2006; Vallet-Regí & arcos, 2005; Vallet-Regí, 1997).

Dentre inúmeras propriedades, a bioengenharia tecidual faz uso de arcabouços tridimensionais (3-D) biocompatíveis, células autólogas e moléculas sinalizadoras que são implantados no paciente conjuntamente (Barbanti & Zavaglia, 2005; Hardouin *et al.*, 2000). Esse “complexo” de moléculas fornece elementos que irão favorecer: a diferenciação de células progenitoras implantadas e do tecido adjacente, a integração e substituição gradativa do material e, conseqüentemente, a retomada da saúde do indivíduo (Yeatts & Fisher, 2011).

Portanto, no interior dos biomateriais, células pluripotentes teciduais podem ser estimuladas bioquimicamente a proliferarem, diferenciarem e criarem uma nova matriz extracelular, resultando na substituição progressiva do material implantado (Vernon *et al.*, 2005). A proposta é de que o paciente não precise se submeter, a médio/longo prazo, a uma nova cirurgia para a substituição do implante desgastado por um novo. Como principais conseqüências, obteremos a melhoria na qualidade de vida do paciente e a redução dos gastos públicos com novas intervenções cirúrgicas.

Apesar do rápido avanço dessa área, os produtos utilizados nos pacientes ainda apresentam um custo muito elevado. Uma das explicações para esse alto valor agregado é o fato da bioengenharia tecidual ser usada individualmente, com tratamento específico para aquele contexto particular. Note que uma das etapas da produção do “complexo” a ser introduzido no paciente é a de captação, expansão e cultivo de suas células sobre o arcabouço. Apesar do alto custo, essa etapa é fundamental ao sucesso do implante pois diminui significativamente o risco de rejeição pelo organismo assistido.

II. 2- BIOMATERIAIS

Tipicamente, a engenharia de tecidos cria matrizes ou arcabouços 3-D acelularizados, com pré-inoculação de células *in vitro* ou posterior à implantação no organismo. Estudos *in vitro* indicam que as respostas celulares, quando em contato com os biomateriais artificiais, são fundamentais para se conhecer a dinâmica da interação entre o implante e o tecido vivo participante (Anselme & Bigerelle, 2006; Vernon *et al.*, 2005; Anselme, 2000).

A variedade de biomateriais utilizados como arcabouços 3-D ou membranas para o uso em bioengenharia de tecidos é ampla. Materiais poliméricos são muito utilizados pela sua fácil manipulação, potencial de uso e possibilidade de apresentarem características mecânicas semelhantes a alguns tecidos ou órgãos do organismo humano. Contudo, as aplicações ainda são limitadas e estudos em biodegradabilidade e seus produtos ainda devem ser desenvolvidos (Costa *et al.*, 2005). Materiais metálicos e alguns cerâmicos são vastamente utilizados principalmente em aplicações que envolvam o tecido ósseo (Dos Santos *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2004). Por apresentarem propriedades mecânicas semelhantes, esses materiais são utilizados em sítios expostos a intensa tensão mecânica ou em lesões de grande extensão, onde o enxerto autólogo (retirado do próprio paciente) não é mais recomendado.

De maneira geral, para serem utilizados em bioengenharia tecidual, os materiais devem apresentar características fundamentais como: biocompatibilidade e degradabilidade. Nas últimas décadas, os biomateriais vêm sendo aperfeiçoados de modo a tornar-se bioindutores e condutores. A nanotecnologia desenvolve materiais com características estruturais e de superfície que podem mimetizar o ambiente natural das células, promovendo certas funções direcionadas, como a adesão, mobilidade e diferenciação celular (Zhang & Webster, 2009; Engel *et al.*, 2007).

Os materiais utilizados devem permitir a adesão das células do paciente e manter-se como um arcabouço 3-D durante todo o processo de manipulação *in vitro*. Adicionalmente, devem ser bioativos e apresentar: poros, para a infiltração de vasos sanguíneos; pontos de ancoragem e sinalização celular, que facilitam a adesão, proliferação e diferenciação das células progenitoras da linhagem correspondente;

resistência mecânica, para sustentar o tecido neo-formado; e uma razão de degradação compatível com a velocidade de deposição da matriz e formação do novo tecido (Dawson & Oreffo, 2008; Wiesmann *et al.*, 2004; Rose & Oreffo, 2002).

A biocompatibilidade dos materiais segue uma relação particularmente estreita com o ambiente de contato e a adesão das células na superfície. Por apresentarem estruturas vivas, os estudos de determinadas interações celulares com os diversos biomateriais possuem alguns inconvenientes, como o envolvimento de muitos e simultâneos parâmetros, os quais alguns não podem ser completamente controlados (Anselme, 2000; Anselme & Biggerelle, 2006).

Dentre os biomateriais utilizados atualmente em bioengenharia do tecido ósseo, os compósitos formados por uma fase mineral depositada numa matriz tridimensional orgânica vêm se destacando (Dolatshahi-Pirouz *et al.*, 2011; Swetha *et al.*, 2010; Sotome *et al.*, 2004). Esses biomateriais apresentam propriedades desejadas, como a facilidade de manipulação, osteocondução e indução e biodegradabilidade (Wang, 2006). Cadeias poliméricas naturais, como proteínas, podem servir de suporte à mineralização e facilitar a integração com o tecido adjacente. Destacam-se os compósitos hidroxiapatita-colágeno, cujas aplicações *in vivo* demonstraram bons resultados, como a capacidade de permitir o processo de remodelação e nova formação de tecido ósseo (Kikuchi *et al.* 2004a, 2001; Itoh *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2001).

II. 3- COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA-COLÁGENO

Um grande avanço na produção de compósitos baseados em hidroxiapatita (HA) e colágeno (Col) tem sido relatado nos últimos 15 anos (Kikuchi *et al.*, 2004a, 2004b; 2001; 1999; Ficaí *et al.*, 2010a,b). A partir do conhecimento da nanoestrutura da matriz óssea, muitos pesquisadores têm assumido que uma combinação nanoestruturada entre HA e Col seria o melhor biomaterial a ser utilizado em intervenções ósseas (Zhang *et al.*, 2010; Chang & Tanaka, 2002a, b).

Kikuchi *et al.* (2004a,b; 2001;1999) produziram provavelmente os compósitos mais próximos à realidade estrutural da matriz óssea. Ao utilizarem soluções de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 com fibras de Col dissociadas, seus compósitos podem apresentar a

proporção em massa desejada. Os autores obtiveram nanocristais de HA com seu eixo c alinhado ao longo das fibras de Col através de sínteses controladas sob pH 8-9 e temperatura de 40°C.

Compósitos HA-Col podem ser classificados como materiais biomiméticos (Liu *et al.*, 2009; Pek *et al.*, 2008; Rhee *et al.*, 2001). As reações biomiméticas são baseadas na idéia que sistemas biológicos armazenam e processam informações estruturais ao nível molecular (Chang & Tanaka, 2002a,b). Sua nanoestrutura é semelhante a da matriz óssea naturalmente formada durante o processo embrionário, onde nanocristais de HA são embebidos numa matriz orgânica. A nucleação dos cristais de HA ocorre dentro e sobre as fibras de Col durante a síntese (Zhang *et al.*, 2010; Zhai *et al.*, 2005). Para atingir tal resultado, a síntese da HA deve ser concomitante à re-agregação das fibrilas de Col em ambiente com temperatura e pH controlados (Ficai *et al.*, 2010a,b; Sena *et al.*, 2009; Kannan *et al.*, 2001).

Os compósitos HA-Col têm demonstrado grande biocompatibilidade quando colocados em contato com células da linhagem óssea (*in vitro*) ou com as do próprio tecido ósseo (*in vivo*). Em trabalhos utilizando ensaios *in vivo*, o compósito HA-Col apresentou boa osteocondução e biointegrabilidade (sem formação de cápsula fibrosa) (Itoh *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2001). Observou-se osteoclastos em lacunas de Howship's ao redor dos compósitos aplicados, indicando o início do processo de absorção e remodelação em experimentos *in-vivo* após 8 semanas. (Kikuchi *et al.*, 2001).

Em experimentos utilizando o arcabouço compósito HA/Col, Zhang *et al.* (2010) apresentam como resultado uma total regeneração da lesão em tíbias de coelhos. Ao final do 1º mês, o grupo descreve a formação massiva de uma rede de capilares, ocupação por células sanguíneas, presença de infiltrado inflamatório; no 2º mês, a maior parte do defeito estava ocupado por nova matriz óssea; colorações evidenciaram a alta atividade de secreção de colágeno por parte das células locais; observou-se ainda a degradação do material, separado por seus resíduos; ao final do 4º mês, a substituição do biomaterial por um novo osso trabecular foi completa.

Colágeno compreende uma família de moléculas de matriz extracelular responsáveis pela integridade e propriedades mecânicas de tecidos conjuntivos moles e rígidos, incluindo córnea, pele, tendão, cartilagem e osso. Apesar de menos bioativa que a natural, a HA sintética apresenta a habilidade de ligar-se diretamente ao tecido ósseo adjacente do sítio implantado, sem a formação de cápsula fibrosa (Kalita *et al.* 2006; Rouahi *et al.*, 2006; Campbell, 2003). Para uso clínico, a HA sintética apresenta boa compatibilidade e osteointegratividade (Uemura *et al.*, 2003).

A matriz 3-D orgânica baseada em fibras de Col ancora as células mediadas pela adesão inicial entre as integrinas da membrana celular e as regiões RGD (Arginina – Glicina - Ácido Aspártico) das fibras. Quando total ou parcialmente mineralizadas, as fibras apresentam maior resistência mecânica, otimizando as características do biomaterial e ainda mantendo sua plasticidade e propriedades dúcteis. Entretanto a estrutura das fibrilas de Col mineralizadas a nível nanométrico ainda não está totalmente clara e é objetivo de intensa pesquisa (Gelinsky *et al.*, 2008; Landis & Silver, 2002).

II. 4- RETICULAÇÃO

A regeneração do tecido ósseo é uma reconstrução extremamente complexa, com uma taxa de renovação tecidual marcadamente inferior às dos tecidos epitelial e sanguíneo. Portanto, podemos presumir que o processo de remodelação da matriz óssea corresponda a uma etapa de longa duração, exigindo que o material implantado tenha uma adequada resistência à degradação naturalmente realizada.

Propriedades mecânicas e resistência à degradação são peças-chave em aplicações biomédicas no tecido ósseo (Liu, 2008; Oreffo, & Triffitt, 1999). Essas características devem ser avaliadas durante as fases de seleção e produção dos materiais. Adicionalmente, devem ser consideradas as diferentes condições encontradas no ambiente *in vivo*, com constante requerimento mecânico, presença de fluidos (líquido intersticial) e secreções celulares (biodegradação).

Arcabouços 3-D baseados em Col podem ser quimicamente modificados devido a grande quantidade de grupos reativos (aminas (NH₂), ácido carboxílico (COOH) e hidroxilas (OH)) na superfície das fibras (Charulatha & Rajaram, 2003; Bigi *et al.*,

2001). Essas reações permitem a otimização das propriedades estruturais, mecânicas e físico-químicas, o que possibilitariam novas aplicações no campo dos biomateriais. Além disso, esses materiais são geralmente estabilizados por ligações cruzadas para reduzir sua imunogenicidade (Jiang *et al.*, 2006).

Compósitos HA-Col não tratados quimicamente degradam rapidamente *in vivo*, resultando no decréscimo da resistência mecânica (Kikuchi, 2004b). Friess (1998) observou que filmes de colágeno que não sofreram ligações cruzadas químicas adicionais são degradados em 2-7 semanas. A degradação do material pode ocorrer pelo processo celular de fagocitose (onde células englobam partículas sólidas) ou pela digestão das fibrilas de colágeno e dos cristais de HA pela queda do pH, resultante da secreção de enzimas.

Glutaraldeído (GTA) é o reagente aldeídico mais extensivamente utilizado para formar rapidamente ligações cruzadas via base de Schiff. Desde os últimos 25 anos, pacientes vêm recebendo válvulas cardíacas fixadas por GTA com bons resultados; sem terapia anticoagulante, as válvulas apresentam biocompatibilidade e são não-trombogênicas (Jayakrishnan & Jameela, 1996). Apesar do uso de GTA ser clinicamente aceitável, alguns resultados relativos à sua toxicidade ainda são observados. Eles estariam relacionados à degradação química, envolvendo quebra da estrutura de tripla-hélice do Col e liberação de resíduos ou grupos funcionais não ligados oriundos do processo de reticulação (Bigi *et al.*, 2001).

As ligações cruzadas são formadas entre os grupos ϵ -amino das cadeias laterais dos aminoácidos lisina e hidroxilisina presentes nas fibras de colágeno. Também ocorrem ligações do tipo aldol entre os aldeídos adjacentes. Após a formação dessas ligações, uma grande variedade de reações subseqüentes está envolvida no processo de total reticulação do material (Chang & Tanaka, 2002a,b; Friess & Lee, 1996).

Comparado com formaldeído e outros aldeídos fixadores, o processo de reticulação utilizando GTA em colágeno e albumina apresenta uma maior estabilidade (Jayakrishnan & Jameela, 1996). Devido sua natureza polimérica, GTA forma ligações

cruzadas de grande comprimento, por exemplo, entre resíduos de aminoácidos distantes, conferindo-lhe aplicações importantes em biomateriais (Charulatha & Rajaram, 2003).

Charulatha & Rajaram (2003) compararam diversos agentes de ligações cruzadas em membranas de Col obtendo o máximo de pontos de ligações cruzadas quando utilizado glutaraldeído (GTA). O aumento da resistência à tração e à degradação por ação enzimática também foram observadas. Segundo Charulatha & Rajaram (2003), o processo de reticulação “mascara” os sítios de atuação da enzima collagenase.

Entretanto, altas concentrações de GTA levam a uma elevada velocidade de reação na superfície, podendo resultar em uma barreira química artificial na superfície das fibras. Esse excesso de GTA em solução e a rápida reticulação levam ao acúmulo de água adsorvida entre as unidades fibrilares do Col, diminuindo a resistência mecânica do material quando aplicado (Kikuchi *et al.*, 2004b; Ruijgrok *et al.*, 1994; Cheung *et al.*, 1985). Apesar de aumentar sua resistência à degradação, essa rápida reação pode resultar em heterogeneidade no interior do material e finalizar com a rápida degradação no interior do organismo (Rodrigues *et al.*, 2006). Baixas concentrações de GTA favorecem as ligações cruzadas intramoleculares (Cheung *et al.*, 1985).

II. 5- MINERALIZAÇÃO BIOLÓGICA

A matriz óssea é formada por duas fases: a mineral (ou inorgânica) e a orgânica. Na fase mineral estão presentes grande quantidade do fosfato de cálcio denominado apatita biológica, traços de íons magnésio, carbonato, hidroxila, cloro, flúor e citrato (Cui *et al.*, 2007); a fase orgânica está representada por fibras de Col, proteo e glicosaminoglicanas e moléculas sinalizadoras (como hormônios, fatores de crescimento e citocinas). As fibras de Col proporcionam ductilidade aos ossos enquanto os cristais de HA, resistência à compressão. Participando das atividades teciduais estão as principais células ósseas: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

A substituição tecidual óssea ocorre por intermédio de moléculas de comunicação entre células, hormônios sinalizadores e das próprias células do tecido. Osteoblastos e osteoclastos trabalham de maneira dinâmica e integrada na deposição e

degradação da matriz, respectivamente. Os osteoblastos produzem cadeias de Col - que serão posteriormente mineralizadas – enquanto os osteoclastos controlam o pH local e produzem enzimas que irão dissolver a fase mineral depositada e degradar as proteínas da matriz (Kikuchi *et al.*, 1999).

A construção detalhada da nanoestrutura do osso ainda não foi bem evidenciada. Apesar da matriz estar supersaturada por cálcio e fosfato depositados, isso não provoca a mineralização de Col ou de outras substâncias orgânicas sob condições saudáveis no processo de remodelação. Dessa maneira, é assumido que algumas condições químicas, por exemplo, altas concentrações dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , temperatura (40°C) e o pH (8-9) na região da calcificação, são necessárias para a mudança do ambiente que culminará no processo de mineralização das fibrilas de Col (Kikuchi *et al.*, 2004a).

Os modelos atuais vêm indicando que sítios hidrofóbicos e hidrofílicos são potenciais locais de mediação para a formação mineral do tecido. Adicionalmente, as regiões flexíveis da molécula de Col podem atuar de maneira importante em relação às regiões “gap” e localização de cálcio e fosfato (Cui *et al.*, 2007). Provenzano & Vanderby (2006) sugerem que, durante a fibrillogênese, proteoglicanas guiam e estabilizam a formação e amadurecimento das fibrilas de Col formando ligações cruzadas. Estudos mostram que decorina, limucan, e fibromodulina atuam regulando a organização na formação e mineralização das fibras de Col (Zhang *et al.*, 2010; Baht *et al.*, 2008; Landis & Silver, 2002).

Investigações anteriores indicaram que a nucleação dos nanocristais de HA ocorre com a interação de sítios negativamente carregados, como os grupos carboxila (Kalita *et al.*, 2006). Este está presente em grande quantidade nas moléculas de Col e, em pH neutro, apresentam-se sob a forma de COO^- , o que favorece a quelação de íons cálcio (Cui *et al.*, 2007). É presumido que a atração eletrostática forma COOCa^+ ou $(\text{COO})_2\text{Ca}$ e O-Ca^+ na indução da nucleação da apatita. Apesar das cargas positivas de alguns amino-grupos poderem formar ligações iônicas com grupos carboxila, isso pode acelerar a interação de íons fosfato com R-Ca^+ para formar HA (Cui *et al.*, 2010).

A partir das concentrações adequadas, ocorre o produto iônico entre íons cálcio e fosfato que, posteriormente, sofrem um processo de transição e interconversão. Como

consequência, formam-se vários arranjos cristalinos alternativos (de graus variáveis de complexidade), com orientação preferencial ao de alongação das fibras de Col. Uma vez iniciada a formação dos cristais de HA, eles tenderão a crescer e a catalisar a posterior cristalização de fosfatos de cálcio, mesmo nos locais que as concentrações de íons cálcio e fosfato sejam semelhantes às do nível plasmático (Comarck, 1991).

Diferentes fatores parecem atuar, sinergicamente ou de forma permutável, para iniciar a deposição mineral. Ainda não está muito claro se a fase sólida primeiramente formada é amorfa ou cristalina. Landis & Silver (2002) sugerem que a formação mineral é mediada por uma combinação de efeitos biológicos, físico-químicos e biomecânicos no tecido.

II. 6- CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS

O osso é um órgão composto por diferentes tecidos com capacidade de sustentação do organismo. Adicionalmente, funciona como reserva de íons cálcio e essa capacidade é devido à sua matriz mineralizada. A matriz 3-D de colágeno, secretada por células ósseas denominadas osteoblastos, sofre um processo de maturação e mineralização, torna-se rígida.

De maneira a renovar e manter o equilíbrio fisiológico, permitindo o crescimento e reparação dos ossos, um processo constante de remodelação óssea provoca a degradação e deposição contínua da matriz. Esse processo de rejuvenescimento ósseo, mantém a integridade do esqueleto removendo a matriz óssea antiga com alta densidade mineral e alta prevalência de microestruturas (Kassem, 2008).

Nesse processo, células da linhagem óssea são recrutadas por células mesenquimais (também chamadas de células da mesenquimais ou estromais), diferenciando-se em células denominadas osteoblastos. Osteoblastos possuem como função, entre outras, produzir colágeno do tipo I, que irá compor a matriz orgânica ainda não mineralizada (matriz osteóide). De maneira contrária, células hematopoiéticas precursoras de osteoclastos, unem-se formando células multinucleadas (osteoclastos) com capacidade de digestão da matriz. Estas células aderem-se às superfícies sinalizadas, dissolvendo a fase mineral e digerindo a matriz orgânica. Esse processo é

controlado por diversos fatores de sinalização, mantendo-se um equilíbrio saudável entre a deposição e a degradação da matriz (Kartsogiannis & Ng, 2004). Essas regiões de deposição/reabsorção apresentam unidades ósseas multicelulares (conhecidas como “*bone multicellular units*” ou “*BMU*”) e mediam o processo de rejuvenescimento do osso (Kassem, 2008).

Embebidos nessa matriz, encontramos células ósseas denominadas osteócitos. Iniciado o processo de maturação, os osteócitos produzem prolongamentos sob a forma de canalículos, se interconectando e se comunicando com osteoblastos e células osteoprogenitoras. Esses canalículos são mantidos mesmo após o processo de mineralização total. Durante os processos de produção, maturação e mineralização, não só o ambiente externo às células modifica-se como sua própria estrutura interna e atividades. Uma cascata de diferenciação culmina na transformação de células indiferenciadas, ou pré-osteoblastos, em osteoblastos e posteriormente em osteócitos (Long, 2001; Aubin, 1998).

A renovação constante da matriz óssea é influenciada pelos estímulos mecânicos. *In vivo*, o estresse mecânico é realizado através do fluxo de líquido intersticial que culmina na diferenciação de osteoblastos em osteócitos e na mineralização da matriz. Osteoblastos e células mesenquimais vêm demonstrando sua sensibilidade quando submetidas ao esforço mecânico (forças de cisalhamento) em experimentos *in vitro* (Yeatts & Fisher, 2011).

Como o osso é um órgão ativo, um intenso processo de renovação celular é desenvolvido no interior dos ossos longos, dentro da medula vermelha (presente no interior do osso trabecular). A medula vermelha é a origem das populações sanguíneas da série branca e vermelha (processo denominado hematopoese). Entretanto, inúmeras populações celulares vêm sendo identificadas e é reconhecida a presença de compartimentos de células não-hematopoiéticas (conhecidas como células da medula estromal) (Kassem, 2008; Away *et al.*, 2002). Dentro desses compartimentos, as células apresentam o potencial de diferenciação em linhagem osteoblástica (Gronthos *et al.*, 2003; Bianco *et al.*, 2001; Oyajobi *et al.*, 1999). A posição desses compartimentos ainda não foi bem elucidada, mas sugere-se que eles estejam localizados nos espaços perivasculares da medula óssea (Tare *et al.*, 2008).

Células osteoprogenitoras da medula estromal podem ser selecionadas e cultivadas, apesar da baixa incidência (~0,0005% do total de células estromais) (Oyajobi, 1999). Existe uma heterogeneidade conhecida dentro dessa população e essa característica culmina na formação de colônias com diferentes capacidades de proliferação e diferenciação (Xiao *et al.*, 2010). Oyajobi *et al.* (1999) afirmam que as células osteoprogenitoras presentes nesses compartimentos apresentam diferentes estágios de diferenciação. De acordo com os autores, a fase de seleção das células osteoprogenitoras oriundas da medula óssea deve levar em consideração a marcação positiva ao anticorpo STRO-1, que reconhece todos os precursores estromais, incluindo todos os osteoprogenitores (Oyajobi *et al.*, 1999).

A manipulação de células primárias da medula óssea pode trazer alguns problemas, como a restrição da fonte do material (paciente, por exemplo), variações entre os pacientes (no caso de mais de um doador), limite do potencial de crescimento e alta heterogeneidade da amostra coletada. O uso de linhagens imortalizadas assegura os resultados e reduzem os equívocos na interpretação dos resultados.

II. 7- CULTIVO DINÂMICO EM BIOREATORES

A aprovação do uso dos “complexos” (arcabouço 3-D + células progenitoras + fatores de crescimento osteogênicos) criados pela bioengenharia tecidual parece ser consenso na comunidade científica, além de trazer esperança aos pacientes por ser uma técnica revolucionária. Entretanto, os produtos dessa área têm suas limitações. O desenvolvimento artificial de sistemas mais complexos, como órgãos, depende da manipulação e interação de diferentes tipos e matrizes celulares. O organismo humano apresenta uma complexa comunicação e sinalização entre os diferentes sistemas, órgãos e tecidos. Mimetizar tantas variáveis é um papel difícil mesmo para uma área que agrega muitos conhecimentos diferentes.

A cultura de células data do início do século XX. A cultura de células tradicionalmente utilizada nos dias atuais promoveu o desenvolvimento de inúmeras terapias, curando doenças e salvando vidas. Entretanto, o cultivo de células em

ambiente estático apresenta alguns inconvenientes, que se agravam quando estruturas 3-D são utilizadas como suporte para o crescimento celular. São eles: heterogeneidade nas concentrações de oxigênio e nutrientes - com consequente aporte inferior no interior do arcabouço; acúmulo de excretas; restrição nas dimensões dos arcabouços (Rauh *et al.*, 2011; David *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2009).

Estruturas 3-D apresentam dimensões macrométricas. Os arcabouços ou membranas utilizados na bioengenharia tecidual deveriam ser extensos e espessos, para permitir o total preenchimento da lesão uma vez aplicados. Para a otimização do material usado e aceleração do reparo, esses materiais são pré-colonizados por células do paciente. Neste caso, o cultivo das células no interior das matrizes 3-D deve ser realizado dentro de câmaras de fluxo contínuo denominadas “biorreatores” (Kinney *et al.*, 2011; Rauh *et al.*, 2011; Yeatts *et al.*, 2011). O desenvolvimento de novos biomateriais vem sendo acompanhado pelo incremento desses equipamentos que facilitam, monitoram e controlam processos biológicos ou bioquímicos.

Biorreatores vêm sendo utilizados desde as duas últimas décadas pelas indústrias de fermentação, dejetos, tratamento de água, processamento alimentar e produção de fármacos (David *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009). A produção de biomoléculas por células não-aderentes no interior de grandes biorreatores já vem sendo desenvolvida com sucesso na produção da insulina humana, por exemplo. Os novos conhecimentos em modelagem e simulação permitiram os cálculos e padrões em entrada e saída de fluidos, controlando o suprimento de nutrientes, gases, pH e osmolaridade, forças às quais as células são submetidas, entre outros.

Os biorreatores utilizados atualmente em bioengenharia tecidual são divididos de acordo com o movimento do fluxo: movimento rotatório no interior de uma câmara (“*spinner flasks*” e “*rotating walls*”) ou passagem do fluxo em perfusão. Os sistemas rotatórios encontrados nos primeiros biorreatores apresentam limitações, criando um gradiente homogêneo na superfície das amostras e sem penetração de oxigênio e nutrientes em seu interior; sistemas em perfusão vêm demonstrando bons resultados, com colonização de materiais 3-D pelas células e aumento da diferenciação osteoblástica (Yeatts & Fisher, 2011b).

O cálculo da vazão utilizada no interior dos biorreatores possibilita conhecer os valores das taxas de cisalhamento e, conseqüentemente, as forças e estímulos aos quais as células estão expostas, além do alto suprimento de glicose requerido. Também demonstrou-se que células mesenquimais, neurais e embrionárias retêm a capacidade de diferenciarem-se em suas respectivas linhagens quando submetidas a sistemas dinâmicos em biorreatores (Kinney *et al.*, 2011).

Para a bioengenharia no tecido ósseo, o uso de biorreatores objetiva colonizar de forma uniforme e homogênea o interior do arcabouço (não apenas na superfície) (David *et al.*, 2011), além de provocar estímulos nas células expostas às mudanças de pressão hidrostática, tensões diretas na superfície celular e formação de campos elétricos. Diversos autores (Kinney *et al.*, 2011; Yeatts *et al.*, 2011), descrevem as conseqüências das tensões de cisalhamento causadas pelas correntes de convecção do fluxo no fenótipo, metabolismo e capacidades proliferativa e de diferenciação em osteoblastos humanos.

Células da linhagem osteoblástica são influenciadas por estímulos mecânicos e essa propriedade incentiva o desenvolvimento de “complexos bioengenhierados” no interior de biorreatores (Yeatts & Fisher, 2011; McCoy & O’Brien, 2010). Jaasma *et al.* (2008) observaram que os estímulos mecânicos em osteoblastos aumentou 800-1200% a produção de prostaglandina E2 em comparação com o cultivo estático.

Uma propriedade determinante para o sucesso da colonização do arcabouço 3-D e saúde celular é a concentração celular inoculada. A adesão e reconhecimento célula-célula são fatores determinantes para a continuidade da população celular cultivada na matriz. Uma vez que os arcabouços 3-D apresentam grandes dimensões, um elevado número de células deve ser utilizado.

Adicionalmente, deve-se pensar na extensa área de superfície e no volume do biomaterial. A porosidade, natureza do material de origem, geometria do arcabouço, tamanho, anisotropia, grau de interconectividade dos poros, posição no interior do biorreatores e viscosidade do meio também devem ser considerados para o sucesso do biomaterial (Kinney *et al.*, 2011).

De maneira geral, a utilização de biorreatores é relativamente recente no campo da bioengenharia tecidual. A determinação da vazão para cada tipo de câmara de biorreator, arcabouço 3-D utilizado e tipo celular adequado é recomendável para o planejamento e desenvolvimento científico.

III(a)- OBJECTIF GÉNÉRAL

Comme objectif général, cette thèse a été développée pour étudier le comportement des cellules ostéoprogénitrices cultivées dans un système tridimensionnel (3-D). Une matrice 3-D composée de collagène et d'hydroxyapatite a été proposée pour des applications en Ingénierie Tissulaire. Trois conditions de culture ont été établies: statique, dynamique basse vitesse et haute vitesse. Les comportements d'adhésion, de prolifération et de différenciation cellulaire ont été étudiés et, ses résultats, analysés statistiquement. Les éventuelles différences chimique-structurales du matériau ont été aussi observées.

III- OBJETIVO GERAL

Como objetivo geral, estudou-se o comportamento celular e a influência de diferentes condições de cultivo em células osteoprogenitoras cultivadas em um arcabouço compósito 3-D reticulado composto por hidroxiapatita-colágeno.

III.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos desse trabalho, podemos citar:

- Produzir, reticular e caracterizar físico-quimicamente o arcabouço compósito 3-D baseado em colágeno e hidroxiapatita;
- Estudar o comportamento inicial de adesão das células osteoprogenitoras estromais em cultura tridimensional (em contato com o arcabouço);
- Avaliar o comportamento de proliferação, colonização e diferenciação das células osteoprogenitoras sobre os arcabouços em ambiente estático;
- Avaliar o comportamento de proliferação, colonização e diferenciação das células osteoprogenitoras sobre o arcabouço sob duas diferentes vazões em cultura dinâmica;
- Observar modificações estruturais e físico-químicas no arcabouço tridimensional compósito submetido às diferentes condições de cultivo.

IV(a)- MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Le collagène utilisé pendant cette étude a été extrait du tendon d'Achilles bovine. Le tendon a été lavé, coupé en petits morceaux (3mm^3) et traité avec une solution d'acide acétique 0,5M + 10% de pepsine pendant 24 heures à 30°C . Après la totale élimination des telopeptides, la solution de fibres de collagène dissociées a été centrifugée (90000G) et les fibres ont été précipitées en contact avec une solution de NaCl 10%. La solution a été dialysée en eau distillée et en acide phosphorique 36,52mM et conservée à 4°C jusqu'à son utilisation (Figure IV.1).

Pour la synthèse de la matrice 3-D composée par des fibres de collagène minéralisées par l'hydroxyapatite (50/50 wt%; Ca/P=1,67), une solution de nitrate de calcium et la solution de collagène conservée en acide phosphorique ont été ajoutées dans un bécher sous les conditions de synthèse d'agitation de 240 rpm, pH=9.0 à 38°C . Ensuite au processus de minéralisation, les fibres minéralisées ont été maintenues pendant 3 heures sous les conditions de synthèse pour stabiliser les cristaux formés (Figure IV.2). Le produit a été réticulé avec une solution de glutaraldehyde (GTA) à 0,125%, lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée et lyophilisé pendant 24 heures. La matrice 3-D a été stérilisée par radiation gamma (15kGy) (Figure IV.3).

La matrice 3-D composée par collagène et hydroxyapatite a été caractérisée par: Diffraction de rayons-X, Spectroscopie d'Infrarouge, Microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission. La porosité a été étudiée par: le déplacement de liquide et l'analyse d'images sur les coupes de $15\mu\text{m}$ (histologie). La cytotoxicité a été observée à travers de trois méthodes: (1) *kit* Cytotox, Xenometrix (tests: XTT, crystal violette et rouge neutre) (normes ISO 10993-12 e 10993-5); (2) analyse de la présence de GTA dans les solutions en contact avec la matrice réticulée; (3) analyse de la viabilité cellulaire utilisant les extraits de la matrice réticulée (norme EM 30 993-5). Les libérations et/ou adsorptions d'ions calcium et phosphate ont été quantifié par des kits *Diasys*.

Des cellules ostéoprogénitrices stromales ont été cultivées sur la matrice 3-D pendant 24 heures, 3, 7, 14 et 21 jours. Leur comportements d'adhésion, de prolifération et de différenciation ont été observés sous les différentes conditions proposées. Avant la culture cellulaire, les échantillons ont été incubés pendant 24 heures dans de milieu de culture complet (Iscove's avec L-glutamine + 10% de serum de veau + 100U/ml penicilline G, 100µg/ml streptomycine sulfate + 10^{-8} M de dexametasone). Un total de 5×10^5 cellules par échantillon a été inoculé. Dans toutes les conditions, les cellules ont été maintenues pendant 24 heures dans la condition statique pour promouvoir la total adhésion. Les conditions de culture peuvent être divisées comme:

- (1) Statique: les cellules sur les échantillons ont été cultivées pendant toute la durée dans des plaques de 24 puits. Le milieu cellulaire complet a été changé chaque 2 jours. Pour les analyses, les échantillons ont été déplacées dans une autre plaque pour éviter des faux positifs.
- (2) Dynamique basse vitesse: après la total adhésion cellulaire, les échantillons ont été fixés dans des bioréacteurs. Un flux de 0,03ml/min a été établie, entre les bouteilles d' "entrée" et "sortie" (Figure IV.9). Un volume de 50ml passait par l'intérieur du bioréacteur par jour. Pour les analyses qui ont utilisées le milieu, les solutions de "sortie" a été réservées.
- (3) Dynamique haute vitesse: après la total adhésion cellulaire, les échantillons ont été fixes dans des bioréacteurs. Un flux de 0,3ml/min a été établie. Néanmoins, em visant le volume total par jour, um flux fermé (avec une bouteille unique) a été placé (Figure IV.10). Pour les analyses qui ont utilisées le milieu, la solution a été réservée.

Pour étudier la viabilité cellulaire, il a été utilisé le méthode du MTT. Pour la colonisation de la matrice 3-D, les noyaux ont été observés par DAPI (Microscopie de fluorescence). La morphologie cellulaire a été observée par MEB. La différenciation cellulaire a été quantifiée par des dosages de phosphatase alcaline, osteocalcine et pro-collagène du type I.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV. 1- EXTRAÇÃO DO COLÁGENO BOVINO E PRODUÇÃO DO ARCABOUÇO COMPÓSITO HIDROXIAPATITA-COLÁGENO

O tendão bovino foi recebido ainda fresco e lavado, cortado em pedaços de aproximadamente 3mm³ e triturado em multiprocessador. O triturado foi dissociado em solução de ácido acético 0,5M (Vetec, Brasil) e, para a retirada dos telopeptídeos, utilizou-se 10% (p/p) de pepsina (Sigma-Aldrich, UK) à 30°C por 24 horas. A retirada dos telopeptídeos diminui a imunogenicidade das fibras em contato com os tecidos naturais do organismo. Após a total dissociação das fibras, a solução centrifugada a 90000G.

Para isolar as fibras de colágeno em relação às outras proteínas do tendão bovino, foi realizada uma precipitação salina utilizando uma solução de cloreto de sódio (NaCl – Vetec, Brasil) a 10% (p/v). A solução foi centrifugada a 3000rpm e o precipitado novamente dissolvido em solução de ácido acético 0,5M. A fim de remover totalmente os cristais de NaCl, a solução sofreu um processo de diálise em água deionizada (H₂O_d) por 2 dias. Em seguida, houve a substituição da água por solução de ácido fosfórico 59,32mM (Merck, Brasil), permanecendo em diálise por mais 2 dias. A Figura IV.1 esquematiza as diversas etapas envolvidas na extração do colágeno.

Extração do colágeno bovino

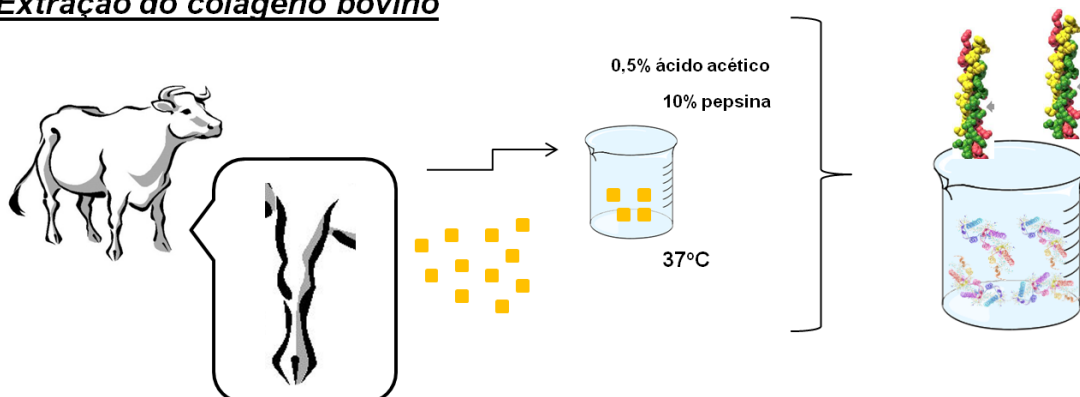


Figura IV.1: Diagrama da extração das fibrilas de colágeno através da dissociação das fibras pela solução de ácido acético 0,5M, 10% de pepsina à 37°C.

A maioria dos colágenos fibrilares são solúveis a baixos pHs. Quando o pH é ajustado para próximo ao neutro e a temperatura próxima a fisiológica, a formação de fibrilas ocorre espontaneamente, resultando em fibrilas de maiores diâmetros ligadas entre si (Roschger *et al.*, 2008). A partir dessa propriedade, as fibrilas de Col em solução ácida foram conservadas à 4°C até seu uso na produção do arcabouço .

Para a produção do arcabouço compósito hidroxiapatita-colágeno (HA/Col) (50:50wt%), duas soluções foram adicionadas com o auxílio de bombas peristálticas (0,9ml/min) em um bécher contendo, previamente, 25ml de água ultrapura, segundo esquema da Figura IV.2. A solução contendo as fibrilas de Col resultante da diálise em ácido fosfórico foi mantida em temperatura ambiente, enquanto era preparada a segunda solução de nitrato de cálcio (37.2mM) (Merck, Brasil).

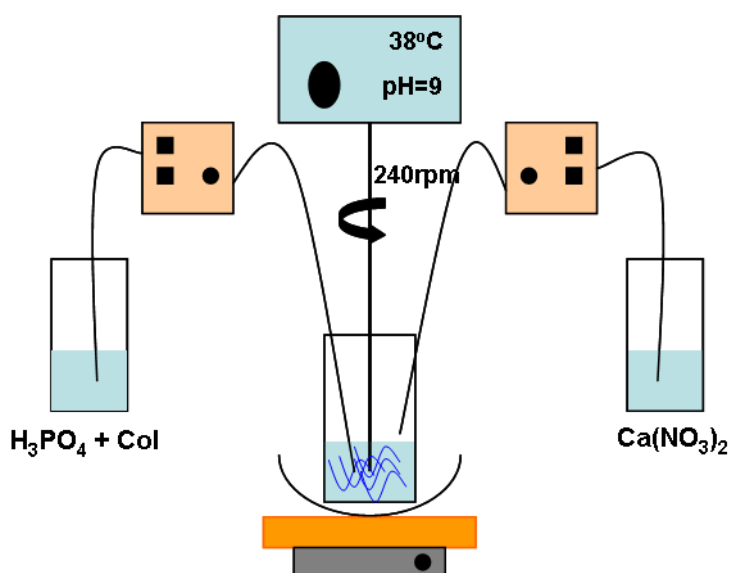


Figura IV.2: Diagrama do processo de síntese do arcabouço compósito HA/Col.

Durante toda a síntese, a temperatura e o pH foram ajustados para 38°C e 9, respectivamente. De acordo com Kikuchi *et al.* (2004a,b) e Liu *et al.* (2009), estes seriam a temperatura e pH ótimos para o máximo de nucleação e crescimento de cristais de HA nas fibrilas de Col em processo de associação. Segundo Kikuchi *et al.* (2001), o pH=8-9 é próximo ao ponto isoelétrico do Col, agregando e/ou precipitando as fibrilas de Col. O pH foi ajustado e mantido através do gotejamento de NH_4OH concentrada (hidróxido de amônio P.A., Merck, Brasil).

A solução de síntese foi agitada (240rpm) através de uma haste presa a um agitador mecânico a fim de promover o máximo de interação entre as fibrilas de Col em processo de reorganização e os íons cálcio e fosfato (Figura IV.2). Durante todo o tempo de envelhecimento (3 horas), as condições de síntese foram mantidas. Ao final do processo, o material produzido permaneceu 24 horas em temperatura ambiente sem agitação. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e o material compósito foi lavado com H₂O deionizada (pH=7,4) para a retirada do excesso de hidróxido de amônio utilizado durante a síntese.

IV. 2- RETICULAÇÃO

Devido à rápida perda estrutural do material em ambiente de cultivo celular (ambiente aquoso à 37°C), houve a necessidade de se promover ligações cruzadas entre as fibras de Col que compõem o material. Neste trabalho, utilizou-se a concentração de 0,125% (v/v) e o processo de reticulação química através do agente reticulador glutaraldeído (GTA) (TedPella, USA). Apesar de seu uso ser questionado pela comunidade científica, sua capacidade de aumentar a resistência à degradação motiva sua utilização em concentrações e processamentos que não gerem produtos citotóxicos para o organismo.

Após a fabricação do material compósito, este foi reticulado através da adição de uma solução de GTA de concentração final 0,125% (v/v) a um bécher contendo água destilada pH=7,4 por 30 minutos sob agitação de 240rpm.

Posterior ao processo de reticulação, as amostras foram extensivamente lavadas (3x) com H₂O desionizada (pH=7,4). Estas foram moldadas em moldes de PVC (8mm de diâmetro e 6mm de altura) e liofilizadas por 24 horas. Todas as amostras foram esterilizadas por radiação gama (25kGy). Os diferentes processos envolvidos na produção do arcabouço estão exibidos na Figura IV.3.

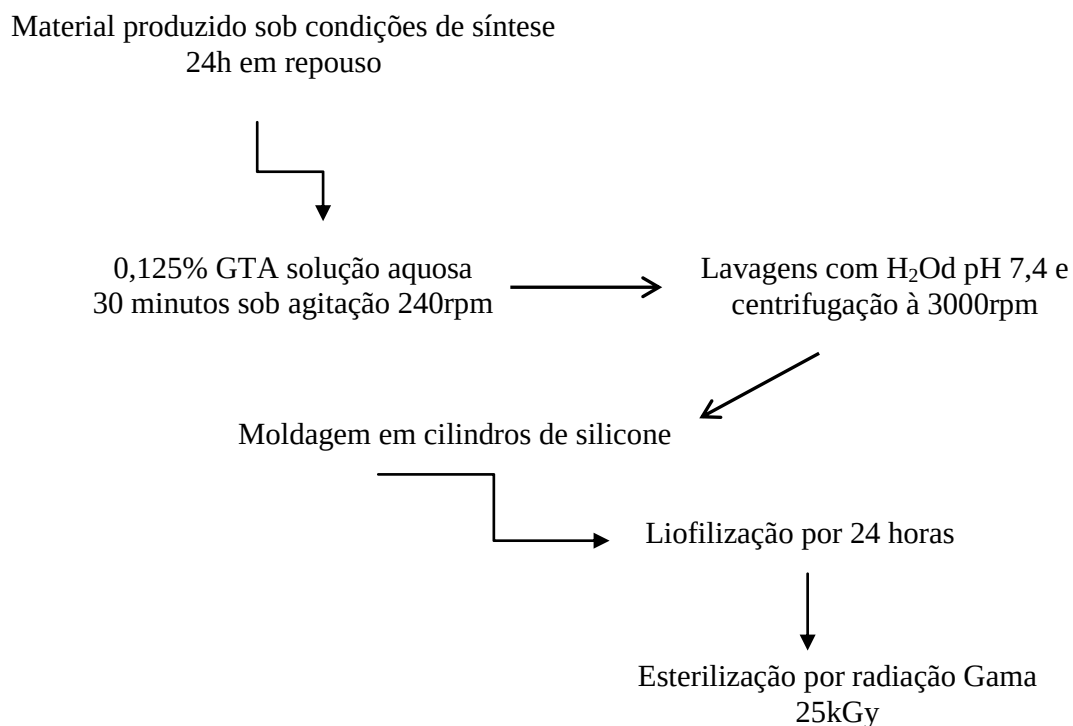


Figura IV.3: Diagrama do processo de reticulação, moldagem e esterilização do arcabouço compósito HA/Col.

Para o cultivo celular, as amostras cilíndricas liofilizadas foram cortadas na metade da sua altura (3mm).

IV.3- CARACTERIZAÇÃO DOS ARCABOUÇOS

Amostras do compósito produzido, reticulado e incubado sob as diferentes condições de cultivo foram caracterizadas por diversas técnicas a fim de obter o máximo de informações sobre as propriedades estruturais e físico-químicas, e suas modificações. Amostras com células cultivadas também foram observadas e seu comportamento estudado. As técnicas serão relatadas a seguir.

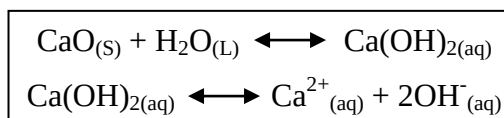
IV.3.1- Difração de raios x (DRX) e Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FT-IR):

A fim de caracterizar o fosfato de cálcio produzido, o processo de síntese foi realizado sem a presença de fibrilas de Col sob as mesmas condições de reação

utilizadas na produção do arcabouço. O pó resultante foi tratado em forno a 1000°C por 15 horas, caracterizado por DRX (Bruker, D8Focus, USA) e examinada a presença de óxido de cálcio - tóxico às células - seguindo a norma francesa NF S 94-066.

Para a verificação da presença de óxido de cálcio, as amostras calcinadas no forno foram solubilizadas com H₂O deionizada contendo uma pequena quantidade de fenoftaleína (indicador ácido-base). A partir da reação apresentada abaixo (Equação IV.1), os íons (OH⁻) provenientes da reação do óxido de cálcio com a água, e sua posterior dissociação, são detectados pela coloração rosa.

Equação IV.1: Reação do óxido de cálcio com a água.



O arcabouço compósito HA/Col também foi observado por DRX. Comparou-se os picos obtidos no difratograma do fosfato de cálcio calcinado com os picos obtidos durante a síntese do arcabouço HA/Col (em presença de fibrilas de Col).

Para a análise em DRX, o difratômetro foi operado com radiação CuK α ($\lambda=1.54$). As condições utilizadas foram: 33kV, 50mA, incremento de 0.02, entre 5 e 60 graus por 5 segundos. Os difratogramas resultantes foram comparados com as fichas-padrão n° 09-0432 e 09-0169 na database do ICDD (*International Center for Diffraction Data, formerly JCPDS - Joint Committee of Powder Diffraction Standards*).

Para obter os modos vibracionais dos grupamentos químicos presentes no compósito HA/Col, as amostras liofilizadas foram misturadas à brometo de potássio (KBr) (10% a 5% p/p) e prensadas sob a forma de pastilhas. Amostras do Col bovino extraído (liofilizado) e do fosfato de cálcio produzido sob condições de síntese sem a presença de fibrilas de Col também foram estudados e considerados como controles. Os espectros de FT-IR foram obtidos em espectrofotômetro (FT-IR, Spectrum100, Perkin Elmer, EUA) por refletância total atenuada. Os modos vibracionais dos grupamentos químicos foram identificados. Todos os espectros foram coletados entre 4000 to 400cm⁻¹, com resolução de 4.00cm⁻¹ e número total de varreduras de 100.

IV.3.2- Termogravimetria (TGA):

A utilização das técnicas de análise térmica do arcabouço compósito HA/Col permitiu avaliar a resistência à temperatura do material formado por fibras de Col mineralizadas e reticuladas com GTA. As amostras processadas foram cultivadas em diferentes tempos sob condição estática. Esperava-se obter informações sobre a perda da resistência à degradação térmica através de uma possível quebra das ligações cruzadas e liberação de GTA durante os 21 dias de cultivo. Adicionalmente, pode-se estimar a relação entre a fase orgânica (Col), inorgânica (HA) e água adsorvida

(a) TGA:

As variações de massa em função da temperatura e tempo foram analisadas por análise termogravimétrica (TGA 851^e, Mettler Toledo, US). O objetivo foi observar o comportamento do arcabouço compósito HA/Col sob as condições de cultura (ambiente úmido à 37°C) após os 21 dias, uma vez que, através da derivada da curva obtida, pode-se estimar as temperaturas de início e fim do processo de perda.

As análises de TGA foram realizadas em ar, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e uma amplitude de 30 a 1200°C.

IV.3.3- Microscopia eletrônica de varredura (MEV), transmissão (MET) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS):

O MEV foi utilizado com o intuito de se conhecer a microestrutura do arcabouço compósito HA/Col, avaliar a capacidade de mineralização das fibras, a microporosidade da superfície e o comportamento e morfologia celular. Um detector para espectroscopia de energia dispersiva (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico foi utilizado para verificar o perfil químico do arcabouço compósito HA/Col.

As amostras foram fixadas com solução Karnovsky composta por GTA 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,2 e 0,1M por 24 horas.

Sucessivas lavagens com tampão foram realizadas a fim de retirar totalmente os reagentes utilizados.

O processo de desidratação deu-se em bateria de álcool etílico (Sigma-Aldrich, UK) com concentrações crescentes de 50, 70, 85, 90, 100%. Para MEV, após a total substituição da água por álcool, as amostras foram secas através do uso da solução alcoólica 100% + etanol/hexametildisilazano (HMDS – Fluka/Sigma-Aldrich, UK) (1:1, v/v) durante 30 minutos, seguida de mais 30 minutos em solução pura de HMDS. As amostras permaneceram em contato com o ar durante 48 horas para total remoção do líquido. Para visualização ao microscópio (Quanta 400 – FEI, USA; JEOL modelo JSM6460LV, USA), as amostras foram cobertas por uma camada de ouro e observadas em 15kV.

Para a avaliação do processo de mineralização das fibrilas de Col em nível nanométrico, foi utilizado o MET. Ao final do processo de desidratação (etanol 100%), as amostras foram impregnadas em resina Spurr™ (TedPella, USA) (através de trocas sucessivas e crescentes de resina em solução alcoólica) e embutidas em resina à 70°C. Cortes ultra-finos (60-80nm) (ultramicrotomo RMC, Power TomeX) foram corados com citrato de chumbo (TedPella, USA) por 15 minutos e acetato de uranila (TedPella, USA) por 30 minutos e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (FEI, Tecnai G20, USA).

Através do processamento de imagens, as dimensões das fibras de Col e dos cristais de HA foram medidas. Adicionalmente, foram observadas a orientação e disposição dos cristais embebidos na matriz orgânica.

IV.4- POROSIDADE

A porosidade do compósito foi analisada por 2 diferentes métodos. Uma porosidade geral foi calculada utilizando o solvente orgânico Hexano (Hexane 99%, Spectrosol, SDS, France). O outro método utilizou os cortes histológicos corados com picrossírius e o tratamento de imagem (Image J®) para a obtenção dos resultados.

IV.4.1- Hexano:

O método utiliza o deslocamento do líquido de um volume conhecido pela amostra analisada. O hexano possui a capacidade de penetrar na matriz sem deformá-la. A partir da equação abaixo, pode-se determinar a porosidade das amostras:

Equação IV.2: Cálculo da porosidade por deslocamento de líquido

$$\varepsilon(\%) = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100$$

onde:

V_1 = Volume inicial de hexano conhecido;

V_2 = Volume total de hexano + material impregnado por 5 minutos;

V_3 = Volume residual de hexano após a retirada do material;

Para o cálculo da porosidade, um n=4 de amostras foi realizado em um volume inicial de 4 mililitros.

IV.4.2- Histologia e análise de imagens:

As amostras correspondentes a cada tempo de cultivo e condição foram fixadas durante 24 horas em solução de formaldeído tamponada à 10% (Sigma-Aldrich, UK). Após a total fixação, as amostras passaram por soluções crescentes de álcool etílico (80, 90, 100%) e de xileno (Sigma-Aldrich, UK) por 1 hora cada. As amostras foram impregnadas em parafina (Fisher Scientific, UK), embutidas em blocos e cortadas em cortes finos de 15µm. Os cortes foram posicionados em lâminas de vidro previamente tratadas em solução aquosa 20% de poli-l-lisina (Sigma-Aldrich, UK) durante 20 minutos.

No momento da utilização das lâminas com os cortes, estas foram postas dentro da estufa à 60°C durante 2 horas a fim de derreter o excesso de parafina. Banhos sucessivos de xileno (3x 10 minutos), de etanol 100% (3x 10 minutos) e de água destiladas (2x 10 minutos) foram realizados. Uma vez re-hidratados, os cortes foram corados através da coloração de Picrisirius descrita a seguir.

a. *Picrosirius: observação de fibras colágenas*

Os arcabouços não cortados e as lâminas com cortes foram incubados durante 1 horas em solução de Bowin (EMS Euromedex, França) em temperatura ambiente. As amostras foram incubadas por mais 1 hora e meia em solução de Sirius Red (0.1% em ácido Pícrico) (EMS Euromedex, França) e lavadas rapidamente com solução de ácido hidrocloreídrico 0.01M (Sigma-Aldrich, UK). As lâminas foram desidratadas (3x de xileno e 3x de etanol 100%, 10 minutos cada) e montadas com Entellan[®] (EMS Euromedex, França). Fibras de Col foram observadas na superfície do arcabouço e nos cortes (15µm) através do uso do microscópio de luz branca e de fluorescência, respectivamente (Olympus BX 51, USA). Como resultado pode-se verificar: fibras colágenas em vermelho vivo (observado em luz branca ou fluorescência).

Dois tipos de porosidades foram analisados: (1) porosidade paralela à superfície superior do arcabouço obtida a cada 15µm de profundidade; (2) porosidade transversal das amostras sob as diferenças condições de cultivo.

(1) Porosidade paralela à superfície:

Para a análise da porosidade, duas amostras do arcabouço foram embutidas em blocos de parafina e cortadas. Os cortes de 15µm foram coletados de maneira seriada, totalizando 10 cortes de cada amostra (ou 150 µm). Os cortes foram corados e fotografados aleatoriamente, resultando em 20 imagens por corte. Um total de 400 imagens foi capturado e tratado no programa Image J[®] (Figura IV.4). A porosidade foi determinada pela razão da área de superfície não corada em cada corte.

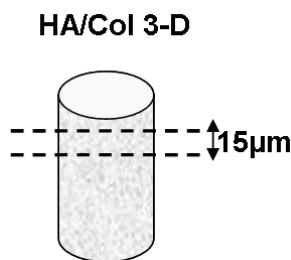


Figura IV.4: Diagrama da seção do arcabouço composto usada para o cálculo da porosidade paralela à superfície.

(2) Porosidade transversal:

Para a análise da porosidade transversal (Figura IV.5), 4 amostras submetidas às diferentes condições de cultura e tempo foram processadas e cortadas. De cada amostra, 50 imagens foram capturadas. Utilizou-se o mesmo tratamento de imagens (Figura IV.6); a porosidade ao longo do cultivo foi determinada. Adicionalmente, as dimensões dos poros também foram verificadas.

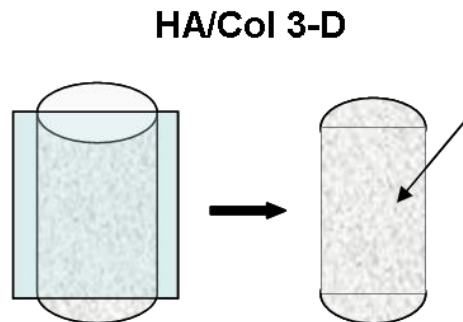


Figura IV.5: Diagrama da seção do arcabouço composto usada para o cálculo da porosidade transversal à superfície.

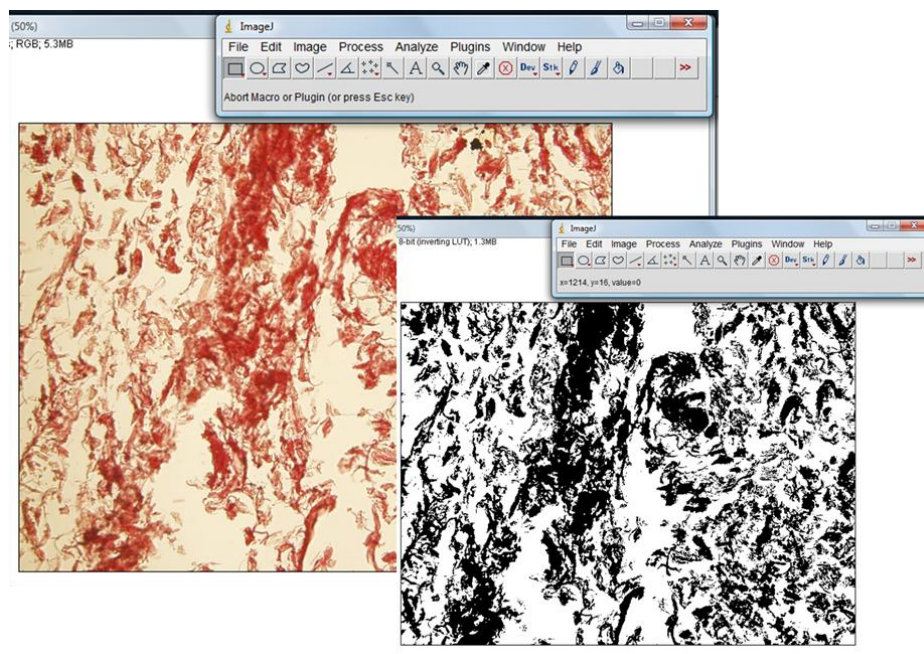


Figura IV.6: Tratamento de imagens pelo programa Image J® através de micrografias de luz branca de seções histológicas (15µm) coradas com Picrosirius.

IV.5- CITOTOXICIDADE

A presença de citotoxicidade proveniente do processo de reticulação – ou mesmo do processo de síntese – foi investigada. Dois métodos foram realizados com objetivos diferentes e seus resultados foram interpretados conjuntamente.

No primeiro, utilizou-se um *kit* (Cytotox, Xenometrix, Germany) com três diferentes testes: XTT, relacionado à atividade metabólica; Vermelho neutro, relacionado à integridade da membrana lisossomal; e Cristal violeta, relacionado à densidade celular por coloração do DNA. De acordo com a ISO 10993-5, um único teste não é capaz de detectar a citotoxicidade dos biomateriais. O segundo método para investigar a presença de GTA livre foi a leitura das soluções de saída de PBS do cultivo do arcabouço após os 21 dias sem células sob as diferentes condições por Espectroscopia no UV-Vísivel. Utilizou-se a solução de PBS para facilitar a leitura.

IV.5.1- Extrato do arcabouço após a síntese – XTT, Vermelho neutro e Cristal violeta:

Os arcabouços HA/Col (n=5) foram imersos em meio de cultura DMEM (100 mg/ml) (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich, UK) livre de soro fetal bovino (SBF) à 37°C por 24 horas e os extratos foram coletados para o ensaio de citotoxicidade segundo as ISO 10993-12 e 10993-5. Uma solução a 1% de fenol foi usada como controle positivo de citotoxicidade e titânio em pó (100mg/ml) como controle negativo. Após a coleta dos extratos, osteoblastos denominados MC3T3-E1 (subclone 14 - CRL 2594 – ATCC) foram incubados em placas de 96 poços (1 x 10⁴ cel/poço) e cultivados durante 24 horas em meio DMEM contendo NaHCO₃ (1.2 g/L), ampicilina (0.025 g/L), estreptomicina (0.1 g/L) e suplementado com 10% de SBF à 37 °C em estufa úmida à 5% CO₂/95% ar.

Após 24 horas de exposição celular aos extratos, a citotoxicidade foi avaliada com um *kit* Cytotox. Os testes utilizados foram: 2,3-bis[2-metiloxo-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboxanilida (XTT), Vermelho neutro (NR) e Cristal

violeta *Dye Elution* (CVDE). Os resultados de absorbância foram obtidos através da leitura da placa em espectrofotômetro em UV-visível (PowerWave MS2, BioTek Instruments, USA).

IV.5.2- Presença de GTA livre nos extratos do arcabouço após cultivo:

O segundo método consistiu na medida da liberação de GTA na solução tampão de PBS durante o processo de cultivo. Uma vez que as amostras do arcabouço entraram em contato com o ambiente aquoso, a liberação de GTA poderia causar desvios no metabolismo e morte celular.

A solução de GTA à 0,125% (v/v) foi lida e serviu como controle positivo para a presença de GTA em solução aquosa. Uma solução de PBS foi utilizada como controle negativo. Os espectros foram obtidos em UV-Vísível, entre os comprimentos de onda 350 e 200nm. A presença de GTA livre pode ser observada em 235 e 280nm.

IV.6- CONDIÇÕES DE CULTIVO

Com a intenção de observar as diferenças estruturais e químicas no arcabouço compósito HA/Col e o comportamento celular quando este serve de suporte para a cultura de células, amostras do arcabouço compósito foram submetidas a três diferentes condições de cultura em diferentes tempos – 24 horas, 3, 7, 14 e 21 dias. Para todas as condições, o arcabouço tri-dimensional reticulado foi re-hidratado durante 24 horas em placas de cultivo de 24 poços com 2 mililitros (ml) de meio de cultura completo. A placa foi mantida à 37°C em estufa úmida à 5% CO₂/95% ar. As condições de cultivo são apresentadas a seguir:

(a) Cultivo Estático: As amostras foram mantidas nas placas de cultura de 24 poços durante todo o processo (2ml por poço). A cada três dias o meio de cultura era renovado. Para as análises realizadas no meio de cultivo em presença do arcabouço (ou do arcabouço + células) o meio de cultura recuperado era devidamente classificado e congelado para posterior análise. Para as análises realizadas no próprio compósito +

células, estes eram trocados de placa para evitar que células presentes no fundo do poço pudessem contribuir com o resultado.

(b) Cultivo Dinâmico: As amostras re-hidratadas foram cultivadas dentro de biorreatores *Minucells*[®] (*Minucells and Minitissue the home of the Minusheets*, Alemanha) (Figura IV.7). Com um total de três amostras por biorreator, estas eram posicionadas entre “mini-suportes”, dando-lhes estabilidade (Figura IV.8). Para análises realizadas em meio de cultura, este era coletado, classificado e congelado. Para as análises do arcabouço (ou do arcabouço + células), as amostras eram simplesmente retiradas do biorreator e utilizadas em seus respectivos procedimentos.

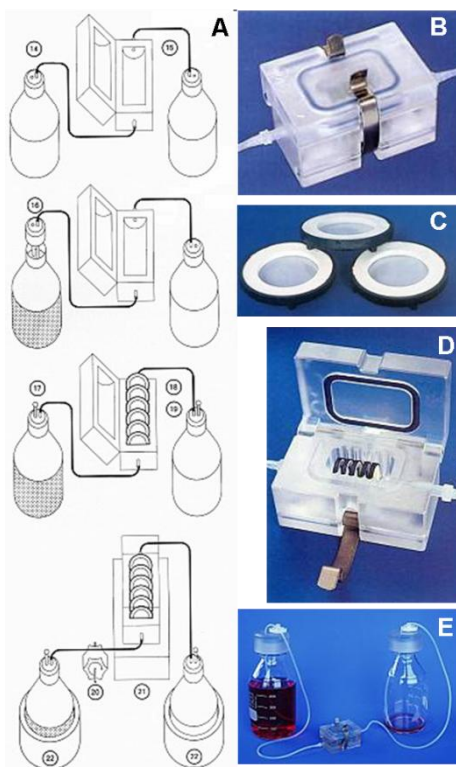


Figura IV.7: Sistema dinâmico e seus componentes. Em (A), esquema do sistema dinâmico com bioreator, garrafas de cultivo e suportes posicionados. Detalhe do bioreator utilizado (B), dos suportes que posicionam as amostras (C), do bioreator montado (D) e do sistema completo (E). Direitos autorais *Minucells*[®].

HA/Col 3-D

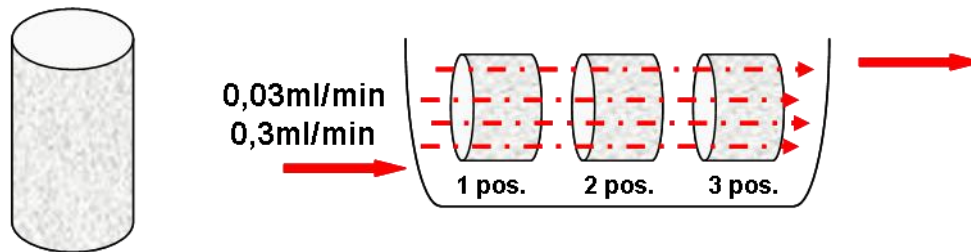


Figura IV.8: Diagrama das amostras do arcabouço HA/Col no interior do biorreator *Minucells*®.

Duas velocidades foram selecionadas para o estudo dinâmico:

- Cultivo dinâmico em baixa vazão: De acordo com o sistema dinâmico apresentado pela empresa *Minucells*®, duas garrafas de cultura (250ml de capacidade) denominadas “*entrada*” e “*saída*” foram posicionadas entre a bomba peristáltica e o biorreator (Figura IV.9). Um fluxo constante de meio de cultivo completo sob a vazão de 0,03ml/min foi calibrado. A cada 24 horas, aproximadamente 50ml de meio de cultivo passava dentro do biorreator, nutrindo e oxigenando as células. A cada 4 dias a garrafa *entrada* era reabastecida com meio completo novo.

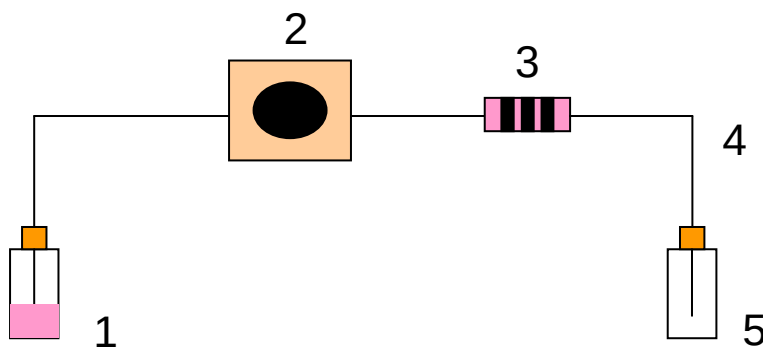


Figura IV.9: Diagrama do sistema dinâmico em baixa vazão. Em (1), reservatório de “*entrada*” de meio fresco de cultivo; (2) bomba peristáltica; (3) biorreator contendo 3 amostras; (4) tubo permeável a gases para passagem de meio e (5) reservatório de “*saída*” de meio de cultivo.

- Cultivo dinâmico em alta vazão: O volume diário correspondente a esse cultivo é extremamente custoso e, portanto, foi escolhido o circuito fechado de

alimentação. Um fluxo constante de meio de cultivo completo sob a vazão de 0,3ml/min foi calibrado. Uma garrafa de cultura (250ml de capacidade) foi denominada “*entrada e saída*” e seu volume total trocado por meio completo novo a cada 7 dias (Figura IV.10).

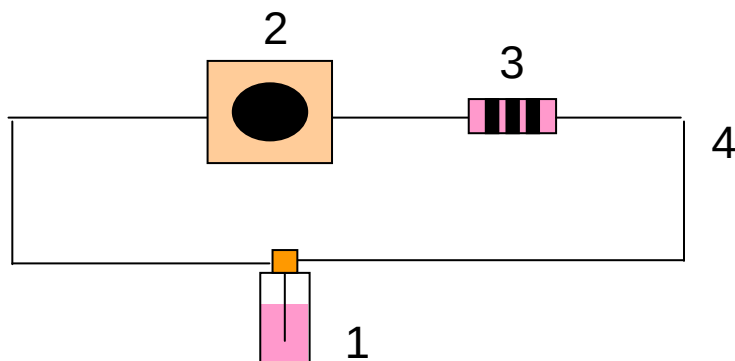


Figura IV.10: Diagrama do sistema fechado dinâmico em alta vazão. Em (1), reservatório de “entrada” e “saída” de meio de cultivo; (2) bomba peristáltica; (3) biorreator contendo 3 amostras e (4) tubo permeável à gases para passagem de meio.

IV.7- CULTURA DE CÉLULAS

Células osteoprogenitoras estromais foram utilizadas ao longo desse trabalho. As células foram concebidas pelo grupo de pesquisa do professor Pierre Marie em Paris (França) (Oyajobi *et al.*, 1999). Tratam-se de células estromais humanas imortalizadas com baixa capacidade de diferenciação quando cultivadas em meio de cultura não-diferenciador (ausência de dexametasona, vitamina-D ou ácido ascórbico). As células apresentam morfologia poligonal – com evidências de seus filopódios, alta capacidade de proliferação e marcação positiva para o anticorpo STRO-1, sendo denominadas STRO⁺1. As células concebidas fazem parte da colônia “A”, à qual possui a menor produção de fosfatase alcalina dentre as diferentes colônias oriundas dessa mesma população celular, sendo então denominada Stro+1A.

O meio de cultivo Iscove’s com L-glutamina (Sigma-Aldrich, UK) foi utilizado com adição 10% de soro fetal bovino, 100U/ml penicilina G (Sigma-Aldrich, UK), 100µg/ml streptomycin sulfatada (Sigma-Aldrich, UK), e 10⁻⁸M de dexametasona (Sigma-Aldrich, UK). Todas as células utilizadas nessa tese foram mantidas nos tempos de cultivo em estufa úmida à 37°C à 5% CO₂/95% ar.

Em todos os experimentos, células Stro+1A foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² até atingirem 60-70% de sua confluência. Uma vez semi-confluentes, as células eram tripsinizadas (tripsina-etilenodiamina tetra-ácido acético (EDTA), Sigma-Aldrich, UK), centrifugadas, contadas e semeadas nos arcabouços 3-D (5x10⁵cels/amostra). De acordo com o volume de experimentos, novas garrafas de cultura eram refeitas, as células eram expandidas, e/ou soluções celulares eram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido.

Para o cultivo das células Stro+1A nos arcabouços compósitos HA/Col sob as diferentes condições, as células foram inoculadas sob as amostras e mantidas em placas de 24 poços (estática) durante 24 horas. A escolha de incubá-las por 24 horas antes de introduzi-las nos bioreatores foi uma forma encontrada de garantir o número populacional inicialmente pensado. Portanto, para todas as condições, o tempo “zero” inicia-se após as 24 horas de cultivo para a adesão total das células (Figura IV.9).

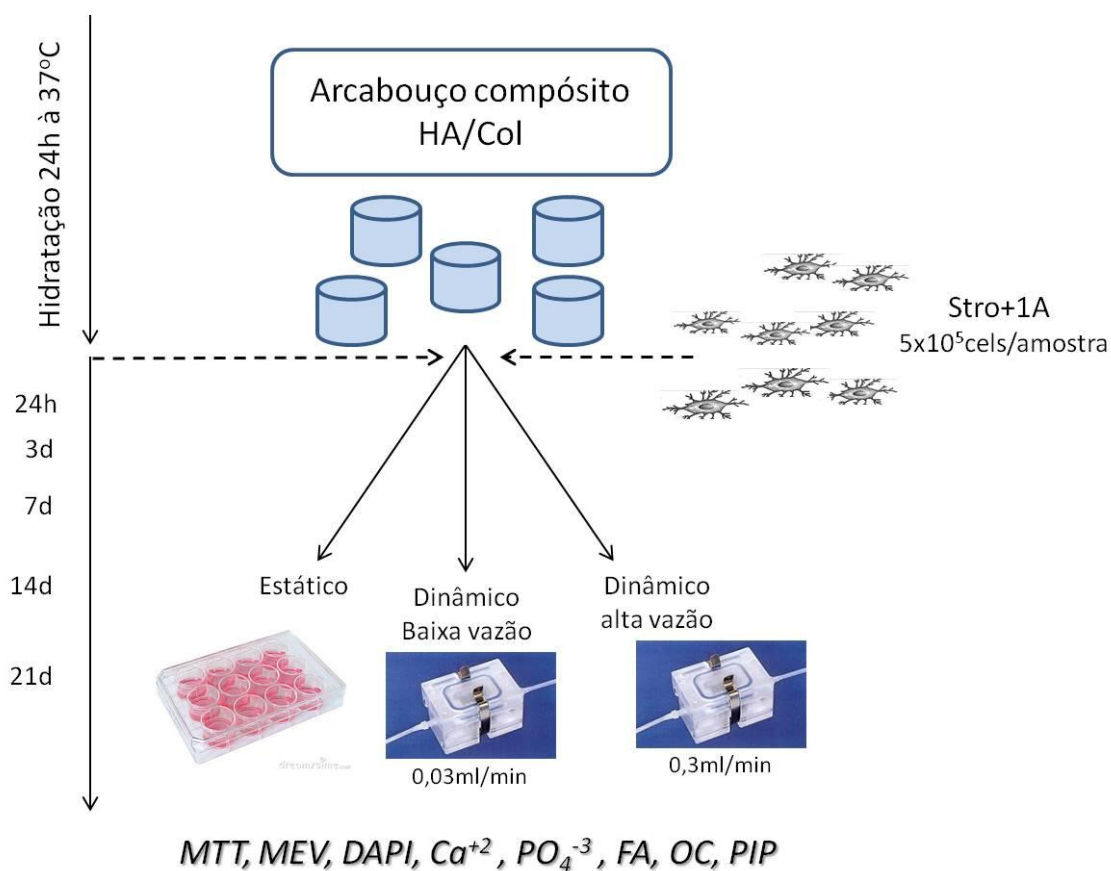


Figura IV.11: Diagrama da preparação das amostras do arcabouço compósito para o cultivo celular em três condições de cultura. FA= fosfatase alcalina, OC= Osteocalcina; PIP= Pró-colágeno I.

IV.8- CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO COMPORTAMENTO CELULAR SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO:

IV.8.1- Viabilidade celular:

A viabilidade das células STRO⁺1A foi determinada pelo método do MTT (3-{4,5-dimetiltiazol-2-yl}-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromide, Sigma-Aldrich, UK). As amostras correspondentes ao tempo e condição de cultura (arcabouços + células) (n=6) foram incubadas durante 3 horas em 500µl de solução de MTT (5mg/ml, diluída 10x) à 37°C em estufa úmida. Após a completa conversão do MTT pelas mitocôndrias celulares, este foi removido e substituído por 500µl de isopropanol ácido (300 HCl (1N) / 100ml de isopropanol). Após 10 minutos, a solução de isopropanol foi lida à 570nm em leitor de ELISA (ELX, 800UV, Biotec Instruments, INC). Para cada amostra, 3 mensurações foram realizadas.

A fim de obter, a partir da absorbância, o número de células em cada amostra, uma curva base foi feita (Figura IV.10). Para isso, plaqueou-se 5 concentrações crescentes de células Stro+1A em duas placas de cultura tradicionais. Após 24 horas de incubação em estufa úmida, uma placa recebeu uma solução de MTT e foi incubada durante 3 horas. As absorbâncias foram obtidas através da leitura da solução de isopropanol à 570nm em leitor de ELISA. Na outra placa, as células de cada poço foram tripsinizadas e contadas manualmente em câmara de Neubauer. Realizou-se o gráfico “absorbância x número de células” e a equação da reta foi utilizada durante todo esse estudo para a conversão das absorbâncias em número de células.

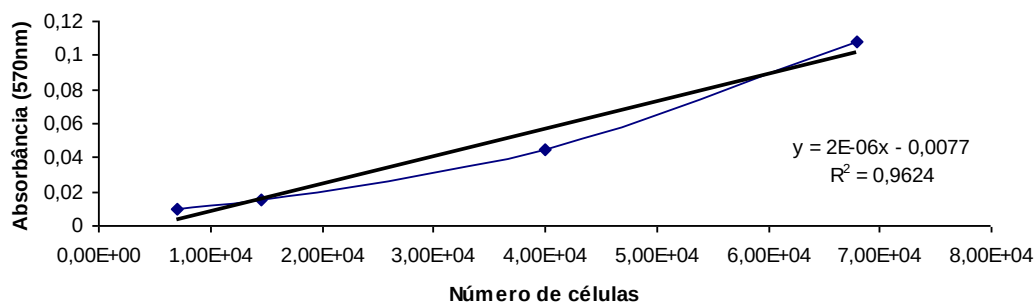


Figura IV.12: Gráfico referente à linha base das células Stro+1A. A equação da reta foi utilizada para a conversão das absorbâncias lidas pelo método do MTT em número de células.

IV.8.2- Colonização celular:

- **DAPI: observação dos núcleos celulares**

Para a observação dos núcleos celulares utilizou-se cortes histológicos das amostras. As lâminas histológicas foram lavados em PBS e permeabilizados durante 15 minutos com solução 0,2% em PBS de Triton-100X (Sigma-Aldrich, UK) em temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com solução de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, UK) durante 15 minutos. Uma vez marcados, os cortes foram fotografados aleatoriamente (50 imagens) e os núcleos celulares observados e contados (Olympus BX 51, USA).

As imagens foram tratadas de maneira que a penetração das células e a colonização das amostras pudessem ser mensuradas (n=4) (Figura IV.11).

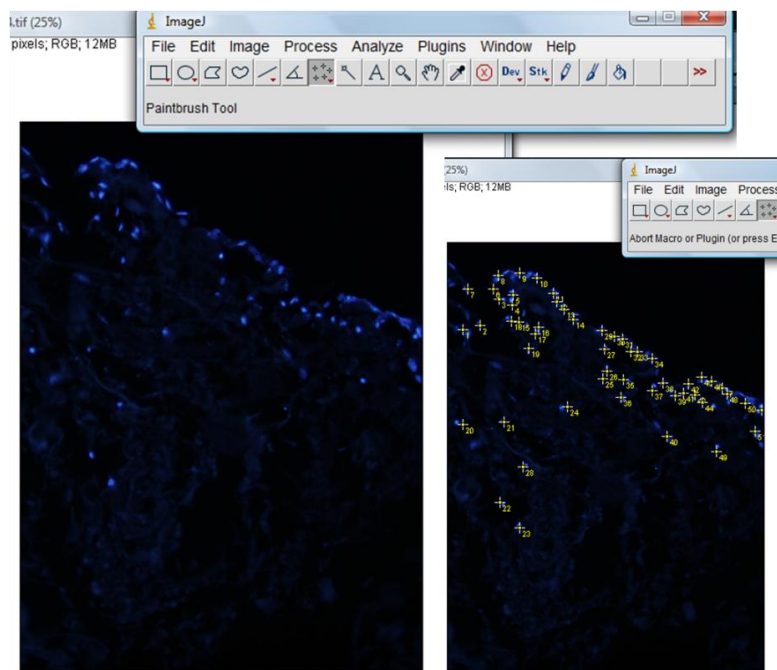


Figura IV.13: Tratamento de imagens pelo programa Image J® através de micrografias de fluorescência de seções histológicas (15µm) com núcleos celulares marcados por DAPI.

IV.8.3- Diferenciação celular:

(a) Fosfatase alcalina (FA):

A atividade de FA foi medida usando p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, UK) como substrato em solução tampão alcalina (20mM p-nitrofenilfosfato + 100mM dietanolamino 98% + 10mM MgCl₂, pH 9.5) em temperatura ambiente. As amostras (arcabouço + células) foram retiradas do cultivo, rinsadas em PBS, permeabilizadas com solução aquosa 0.5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, UK) e incubadas com solução de substrato durante 30 minutos a 37°C. Para finalizar a reação, foi adicionado um mesmo volume de solução de EDTA (0.1M EDTA em 1M NaOH).

A densidade ótica foi lida em placa de 96 poços pelo leitor de ELISA (ELX, 800UV, Biotec Instruments, INC) no comprimento de onda à 405nm. Os resultados foram calculados para a obtenção da concentração de ALP por célula. Para cada experimento, um n=6 foi realizado, com 3 leituras em cada.

(b) Osteocalcina (OC):

A concentração de osteocalcina secretada pelas células em processo de diferenciação osteoblástica foi mensurada através do uso do *kit* comercial *Gla-type osteocalcin EIA* (TANAKA Bio INC., Japão). A placa de 96 poços presente no *kit* apresenta duas reações imuno-enzimáticas. Um primeiro anticorpo está imobilizado na superfície dos poços e apresenta alta especificidade ao antígeno “osteocalcina” solúvel no meio de cultivo. Após a ligação entre as duas moléculas, um segundo anticorpo ligado à peroxidase é utilizado para amplificar o sinal. A transformação do substrato por uma reação colorimétrica pode ser lida pelo leitor de ELISA à 450nm. A intensidade da solução é proporcional à concentração de osteocalcina presente nas amostras.

O fabricante sugere a realização de uma curva padrão para a conversão das absorbâncias em concentração (ng/ml). Os resultados foram calibrados e calculados para a obtenção da concentração de osteocalcina por célula (ng/ml/cel). Para cada experimento, um n=3 foi realizado, com 2 leituras em cada.

(c) Pró-colágeno I (PIP):

Para a determinação da concentração de PIP secretado pelas células Stro+1A cultivadas no arcabouço sob diferentes tempos e condições de cultura, foi utilizado o *kit* comercial *Procollagen Type I C-peptide (PIP) EIA* (TANAKA Bio INC., Japão). O *kit* é composto por uma placa de 96 poços previamente tratada. A placa apresenta na superfície de seus poços um ligante específico para a molécula em questão. O princípio do método imuno-enzimático é de ligar o anticorpo imobilizado no fundo do poço com o antígeno (pró-colágeno) em solução. Uma vez ligado, uma reação colorimétrica permite a leitura da placa pelo leitor de ELISA. Uma curva padrão é recomendada pelo fabricante a fim de converter os resultados de absorbância em concentração do antígeno (ng/ml).

As amostras de meio de cultivo foram incubadas na placa durante 3 horas à 37°C. Após a incubação, a placa foi lavada 4x com solução tampão PBS e novamente incubada com uma solução de substrato por 15 minutos. A reação foi finalizada por uma

solução *stop* (concedida pelo fabricante) e a placa lida à 450nm em leitor de ELISA. A concentração total de cada amostra levou em consideração: (1) a quantidade de amostras em questão (3, no caso de bioreatores); (2) o número de células em cada dia e condição estudada. O resultado final foi dado em concentração de PIP por célula (ng/ml/cel). Para cada experimento, um n=3 foi realizado, com 2 leituras em cada.

IV.9- CONCENTRAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO EM MEIO DE CULTURA

Os resultados para a concentração de íons cálcio foram obtidos pelo emprego de um *kit* comercial (*Diasys*; CE, Alemanha) empregado em diagnósticos na rede médico-hospitalar na detecção dos íons em amostras de soro, plasma ou urina. O *kit* apresenta uma determinação quantitativa através de sistemas de leitura fotométricos em leitores de placa em ultravioleta (UV).

Para a obtenção das concentrações de íons cálcio nas diferentes amostras de meio estudadas, utilizou-se o método colorimétrico do Arsenato III. O princípio do *kit* é a formação de uma solução azul proveniente do complexo entre os íons cálcio e o arsenato III, em pH neutro. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de íons cálcio na solução estudada.

As amostras de meio de cultivo foram incubadas com o reativo durante 5 minutos e lidas em leitor de ELISA à 650nm (ELX, 800UV, Biotec Instruments, INC). As absorbâncias foram calculadas em relação ao *standart* (cedido pelo *kit*) e a concentração final foi calculada em mmol/L.

V(a). RÉSULTATS ET DISCUSSION

Un composite hydroxyapatite et collagène (HA/Col) a été synthétisé avec succès. Pendant la réaction, les fibres de collagènes s'agglomèrent en structures macroscopiques, sans présence de poudre libre en solution.

A travers les résultats de diffraction de rayons X (Figure V.3) et de spectroscopie infrarouge (Figure V.4), il est possible d'affirmer la présence dans la matrice collagène d'une phase minérale peu cristalline constituée par de l'hydroxyapatite carbonatée du type-B déficiente en calcium ($2\Theta = 31,96^\circ$, $32,19^\circ$ e $33,09^\circ$) (JCPDS n° 09-0169) (Kikuchi *et al.* 2004, 2001). Ces mêmes analyses montrent la préservation de la structure polymère du collagène après la réaction de synthèse (3320cm^{-1} (amide A; N-H) ; 1650cm^{-1} (amide I; C=O) ; 1540cm^{-1} (amide II; N-H) e 1230cm^{-1} (amide III; C-N)) (Liu *et al.*, 2009 ; Santos *et al.*, 2008).

Le composite est formé par une matrice poreuse (~60%) (Figure V.6), avec des pores (~280 μm) (Figure V.7) distribués de façon hétérogène dans l'ensemble de la structure. La stœchiométrie réelle du composite HA/Col obtenue est similaire à la stœchiométrie théorique (Tableau V.1). Le dépôt minéral se produit à la surface des fibrilles de Col en créant des poly-cristaux d'HA (Bohner, 2000; Elliot, 1994). La distribution des cristaux nanométriques (40nm x 5nm) est homogène et sans orientation apparente (Figure V.12).

Le processus de réticulation a créé des liaisons stables (Charulatha & Rajaram, 2003; Jayakrishnan e Jameela, 1996) mais sans provoquer de cytotoxicité (Figure V.14). La résistance à la dégradation du composite HA/Col après réticulation dans les conditions de cultures est plus importante. La libération de glutaraldéhyde n'a pas été observée durant 21 jours (Figure V.15).

Malgré le processus de minéralisation, les fibres de Col sont encore accessibles et permettent l'adhésion cellulaire (Figure V.16). Les cellules ostéoprogénitrices stromales adhèrent en majorité à partir de 6 heures de contact avec le matériau (Figure V.17).

La viabilité cellulaire est fortement influencée par les systèmes de culture au cours des 21 jours (Figure V.18). En condition statique, les cellules présentent une faible viabilité. Dans les systèmes dynamiques, les comportements cellulaires diffèrent à partir du 7^{ième} jour. Une forte chute de la viabilité et de la quantité de cellules est observée en basse vitesse après 7 jours alors qu'en haute vitesse, une augmentation de la quantité de cellules est observée (Figure V.19).

Dans les 7 premiers jours, les cellules soumises aux systèmes dynamiques sont plus actives qu'en conditions statiques (Figure V.18). Les limitations de l'apport en oxygène et en nutriments sont des facteurs déterminants pour la culture (Jaasma *et al.*, 2008). La diffusion des molécules forme un gradient sur maximum 100-200µm (Bjerre *et al.*, 2008).

Les sections histologiques révèlent la formation des couches cellulaires stratifiées durant les 21 jours de cultures (Figure V.28a) en condition statique. De manière générale, les cellules en condition statique de culture forment des couches à la surface des matériaux (Wang *et al.* 2007). Des structures illustrant la formation, d'une nouvelle matrice extracellulaire ont été observées à partir de 7 jours sur des micrographies de MEB (Figure V.22 d et f) en condition statique et dynamique en haute vitesse.

Durant les 3 premiers jours, la position à l'intérieur du bioréacteur est importante pour le système dynamique à basse vitesse. Des différences significatives en quantité de cellules ont été observées (Figure V.20) entre les échantillons dans la première position (plus proche de l'entrée du milieu) par rapport aux deux autres. Ces différences n'ont pas été remarquées pour le système dynamique à haute vitesse.

A partir de la deuxième semaine, les comportements cellulaires dans les systèmes dynamiques diffèrent fortement. Pour le système à basse vitesse, la chute de la viabilité peut être expliquée par le processus de mort cellulaire programmé (apoptose) (Figure V.27). Ce résultat est corroboré par la disparition des noyaux cellulaires et par les micrographies électroniques (Figure V.26 et V.28). Dans ce système à basse vitesse, le passage du flux en système ouvert pourrait résulter en un lavage des molécules de signalisations paracrines et d'une dispersion des cellules à la surface limitant ainsi la capacité de survie des cellules (Bjerre *et al.* 2008).

Les résultats du système dynamique en haute vitesse, qui est lui un système fermé, montrent une excellente capacité du composite à supporter les processus cellulaires. Les cellules sont capables d'adhérer, de proliférer et de coloniser la matrice tridimensionnelle (Figure V.26 et V.28). L'importante quantité de cellules, les forces de frictions, un meilleur transport de masse ainsi que la concentration des molécules de signalisations intercellulaires dans le système fermé peuvent expliquer ce succès (McCoy & O'Brien, 2010 ; Bjerre *et al.* 2008).

La migration cellulaire peut avoir été influencée par des changements dans la porosité des échantillons. Selon Liu *et al.* (2009), l'hydratation des matrices 3-D dans le milieu de culture peut conduire à l'expansion (50-100%) du volume, résultant en des pores plus larges. La Figure V.29 montre qu'il y a eu des variations subtiles dans la porosité des échantillons. Toutefois, la porosité ne semble pas être un déterminant de la migration dans notre système.

Différents facteurs (des forces cisaillement, le transport de masse et d'oxygène, etc) semblent agir ensemble dans la migration cellulaire et la colonisation de la matrice 3-D. Des coupes histologiques de différents points de l'échantillon ont été observées (Figure V.30). En général, dans tous les échantillons soumis à des systèmes dynamiques, un grand nombre de noyaux marqués par le DAPI est retrouvé dans les régions périphériques (Figure V.31).

Jaasma *et al.* (2008) affirment que la culture dans des bioréacteurs de perfusion montre d'importantes différences suivant la vitesse de passage du milieu de culture. Dans leurs résultats, des différences entre les régions centrales et périphériques ont été observées. Dans notre expérience, la région centrale de l'échantillon soumis au système de culture à basse vitesse (Figure V.31a) présente une faible quantité de noyaux marqués, tandis que la région périphérique montre une quantité plus importante de cellules (Figure V.31b). Ce profil a été également retrouvé dans nos échantillons, cultivés à haute vitesse.

La stimulation par le passage d'un flux constant augmente significativement les concentrations des marqueurs de différenciation cellulaires (Figure V.35 ; V.36 et V.37). Nos résultats pour les deux flux sont nettement plus élevés que ceux trouvés pour

la condition statique. Malgré la forte dilution à laquelle les échantillons de milieu ont été soumis dans ces systèmes, le changement de l'environnement, avec un transport de masse constant, peut avoir causé l'expression et la sécrétion accrues des protéines dans le milieu de culture (Jaasma *et al.* 2008 ; Bjerre *et al.* 2008).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1- EXTRAÇÃO DO COLÁGENO E SINTESE DO COMPÓSITO

O processo de extração do colágeno a partir do tendão de Achilles bovino deu-se de maneira simples e eficaz. Uma vez colocados em solução ácida com a presença de pepsina, o colágeno dissociou-se em solução. Após a precipitação salina, foi possível observar a reagregação das fibras de colágeno, desfeita após a diálise em água destilada e solução de ácido fosfórico (59mM). A solução obtida transparente e viscosa apresenta uma concentração final de 12mg/ml e foi armazenada à 4°C.

Durante a síntese do arcabouço compósito hidroxiapatita-colágeno (HA/Col), as fibras de colágeno reagregam-se rapidamente, formando estruturas macroscópicas à medida que as soluções são adicionadas. Não foi observada a presença de pó livre durante todo o processo. O material produzido é altamente moldável, de fácil manipulação e processamento (Figura V.1). Foram mensuradas as concentrações de glutaraldeído após a reticulação e lavagens, até a completa eliminação de seus resíduos. Não foram observadas modificações físico-químicas e morfológicas (macroscópicas e químicas, através do FT-IR) do arcabouço produzido após a esterilização por radiação gama (Campos *et al.*, 2007).

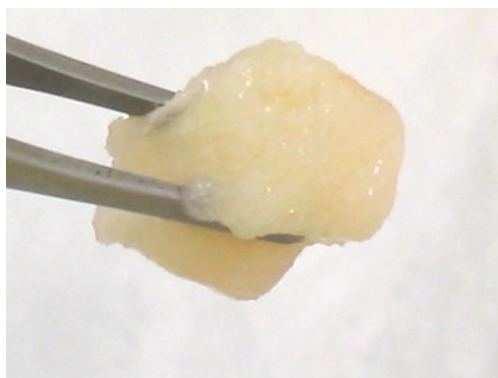


Figura V.1: Macrografia do arcabouço compósito HA/Col sintetizado antes da conformação em cilindros-molde.

V.2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ARCABOUÇO COMPÓSITO HA-COL

V.2.1- Fase mineral na ausência do colágeno:

A caracterização da fase mineral formada sob as condições de síntese – pH=9 e 38°C – foi realizada em pós sintetizados na ausência de colágeno da mesma maneira que o arcabouço compósito. O pó, lavado e liofilizado, foi caracterizado em temperatura ambiente e após calcinação a 1000°C. Os difratogramas estão apresentados na figura V.2.

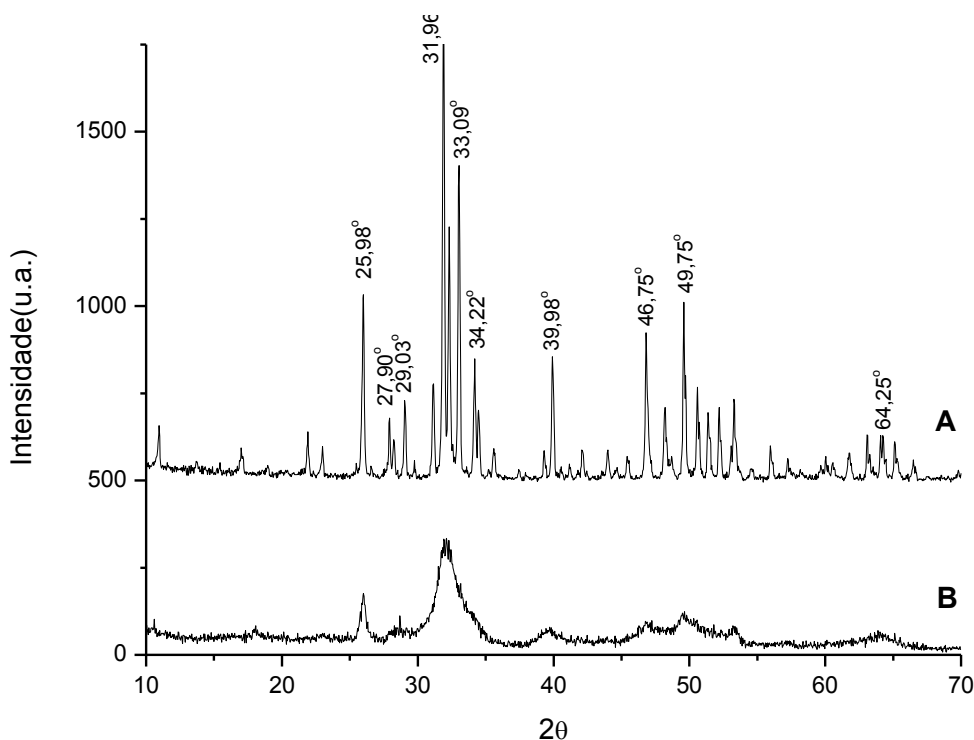


Figura V.2: Difratograma do fosfato de cálcio produzido na ausência do colágeno. Em (A), amostra calcinada à 1000°C e (B) em condições de síntese (38°C).

O padrão de difração da fase sintetizada a 38°C é compatível com a HA pouco cristalina (Kikuchi *et al.* 2004a,b, 2001; LeGeros, 1994) (Figura V.2b) . Com o processo de calcinação, aumenta-se a cristalinidade sendo possível então identificar duas fases: HA e fosfato tricálcico do tipo β (β -TCP). A presença de β -TCP (com os três principais picos em 27,76°, 31,02°, 34,37°) sugere que a fase formada após a síntese é uma HA

cálcio-deficiente, que se transformou parcialmente com o tratamento térmico. β -TCP apresenta uma razão Ca/P de 1,5 (em contraste com a da HA de 1,67) e possui menor termoestabilidade. Sua presença pode ser explicada pela decomposição térmica não-estequiométrica da HA com razões Ca/P menores que 1,67 e seguidas de possíveis incorporações de íons carbonato com a formação de uma apatita básica chamada BCaP (Sukhodub *et al.*, 2004).

Observa-se picos intensos da HA em 31,96°, 32,19° e 33,09° entre outros picos menores. Os difratogramas estão de acordo com a ficha do *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS) de nºs 09-0432 e 09-0169 para o β -TCP e HA, respectivamente.

V.2.2- Arcabouço compósito HA/Col:

O difratograma do arcabouço compósito HA/Col está apresentado na Figura V.3 onde são observados picos de HA pouco cristalina. A formação e crescimento dos cristais foram fortemente influenciados pelo excesso da fase orgânica presente na solução de síntese. De acordo com Liu *et al.* (2009), quando o precipitado nanocristalino se forma na presença de fibrilas de Col, a orientação destas fibrilas e a estrutura da matriz como um todo podem exercer uma influência no crescimento orientado dos nanocristalitos da HA.

O mecanismo de formação da fase mineral consistiu em liberar íons cálcio e fosfato através de seus precursores (nitrato de cálcio e ácido ortofosfórico, descritos anteriormente) para total dispersão e homogeneização no sistema aquoso, seguido de uma nucleação dos cristais de HA nas moléculas do Col. É conhecido que a razão de formação do mineral é altamente dependente de fatores como pH e concentrações de íons cálcio, fosfato e outros íons fisiológicos (Chang *et al.*, 2003). A formação das fases minerais em estruturas compostas por uma fase orgânica muitas vezes apresenta variações em seus padrões já conhecidos (Ficai *et al.*, 2010a,b; Wopenka *et al.*, 2005).

Os parâmetros da célula de HA – $a=b=9,4564\text{Å}$ e $c=6,8836\text{Å}$ - mostra a formação de cristais com características semelhantes as dos ossos jovens ($a=b=9,4411\text{Å}$ e $c=6,8845\text{Å}$) (Meneghini *et al.*, 2003). Segundo Sena *et al.* (2009) e Sogo *et al.* (2004),

o Col inibe o crescimento e o tamanho do cristalito de HA, principalmente na direção (002). Em contrapartida, segundo Zhang *et al.* (2010), materiais utilizados atualmente para regeneração óssea apresentam fases cristalinas diferentes das do osso natural.

Entre as fases minerais verificadas não foi encontrada a fase de óxido de cálcio como um dos constituintes desse material. Segundo a norma francesa NF S 94-066 (1998), o óxido de cálcio é citotóxico, sendo sua ausência um requisito importante para os materiais que entrarão em contato com células.

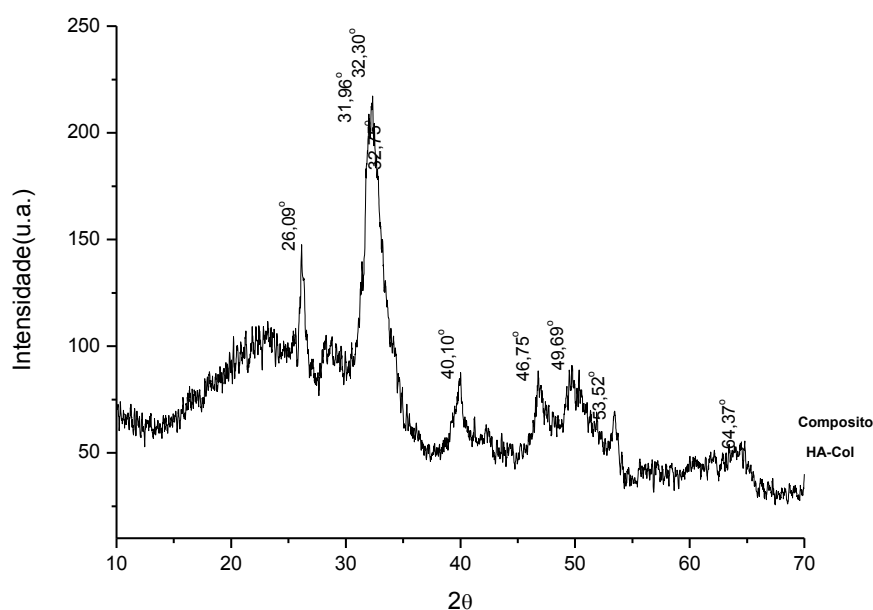


Figura V.3: Difratograma do arcabouço composto HA/Col sob condições de síntese pH=9 e 38°C.

A preservação e mineralização das fibras de Col no arcabouço compósito foram verificadas através de FT-IR, Figura V.4. Alíquotas da solução de extração do Col e do pó sintetizado (na ausência de Col) sob as condições de síntese foram liofilizados e analisados, juntamente com uma amostra do arcabouço compósito. Os espectros correspondentes à proteína Col (A) e à HA calcinada à 1000°C (C) estão apresentados na Figura V.4 e são apresentados como referências.

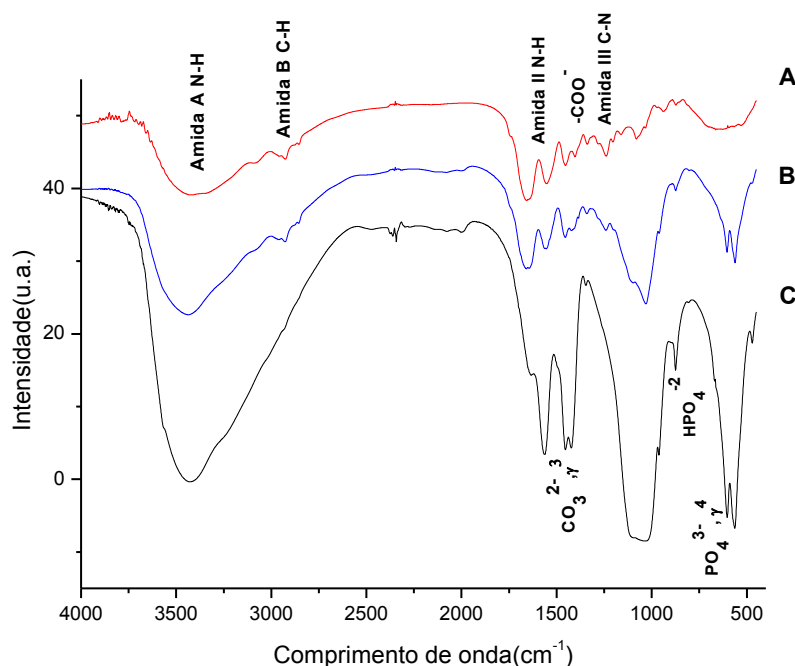


Figura V.4: Espectros de FT-IR da proteína colágeno extraída (A), do compósito HA/Col (B) e da hidroxiapatita calcinada à 1000°C (C) produzidos segundo as condições de síntese descritas.

Os espectros da molécula de Col e do arcabouço compósito (figura V.4 a,b, respectivamente) apresentam as bandas: 3320cm^{-1} (amida A; N-H), 1650cm^{-1} (amida I; C=O), 1540cm^{-1} (amida II; N-H) e 1230cm^{-1} (amida III; C-N), variando a intensidade das mesmas. A presença das amidas indica que a composição das cadeias polipeptídicas presentes nas fibras de Col foi preservada mesmo após o processo de síntese (Liu *et al.*, 2009). A presença da amida I (correspondente ao grupo carbonila) é um marcador de peptídeos com estrutura terciária (Santos *et al.*, 2008), corroborada pela presença da amida II, indicativa de conformação de tripla-hélice (Chang *et al.*, 2003). Adicionalmente, a vibração dos anéis pirrolidínicos da hidroxiprolina na banda 1450cm^{-1} corrobora a manutenção do componente orgânico (Zhai *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2003).

Os grupos químicos presentes na superfície das fibras de colágeno participam na nucleação dos nanocristais de HA. Segundo Santos *et al.* (2008) e Chang *et al.* (2003), em pH acima de 7, a superfície das moléculas de Col estão altamente carregadas. Adicionalmente, o acúmulo de íons Ca^{+2} na superfície das fibras de colágeno em pH=9

provoca a nucleação e formação estável dos nanocristais (Kikuchi *et al.*, 2001). A banda 1330cm^{-1} presente dos espectros A e B da Figura V.4, corresponde ao estiramento assimétrico dos grupos carboxila dissociados ($-\text{COO}^-$) e participam do processo de mineralização por autorganização dos nanocristais de HA na superfície de Col durante a síntese do compósito (Chang & Tanaka, 2002a).

Os espectros de FT-IR da HA sintetizada e do arcabouço compósito HA/Col (Figura V.4C e B) evidenciam as bandas na região $500\text{-}1200\text{cm}^{-1}$ característica dos grupos PO_4^{3-} como: 560cm^{-1} e 604cm^{-1} (PO_4^{3-} , ν_4), 961cm^{-1} (PO_4^{3-} , ν_1), 1030cm^{-1} (PO_4^{3-} , ν_3), além das bandas 873cm^{-1} (HPO_4^{2-}) e 1420cm^{-1} (Zhai *et al.*, 2005; Scharnweber *et al.*, 2004). Nota-se a presença da banda 1450cm^{-1} , que está relacionada à substituição do tipo B dos grupos PO_4^{3-} pelos grupos CO_3^{2-} (ν_4) (Santos *et al.*, 2008; Slósarczyk *et al.*, 2005). Essa substituição também é observada na apatita biológica encontrada na matriz óssea (Wopenka *et al.*, 2005).

Após o processo de reticulação do material produzido (Figura V.5 b) nota-se pequenas diferenças em relação ao espectro apresentado na Figura V.4 a que foi repetido na Figura V.5 b. As bandas: 3310 cm^{-1} (estiramentos N-H, típico da amida A), 3063 cm^{-1} (C-H da amida B), $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (C=O da amida I), $1500\text{-}1550\text{cm}^{-1}$ (deformações N-H da amida II) e $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (N-H da amida III) são mantidas após a reticulação. Apenas observou-se um moderado aumento nas bandas das amidas II e III.

Essas mudanças também foram observadas por Chang e Tanaka (2002a), cujo compósito HA/Col é igualmente reticulado por GTA. Não houve diferenças nos grupamentos referentes à HA. Em seus estudos, o grupo mostra que o processo de reticulação não afeta apenas as fibrilas/fibras de Col, mas também a interação entre os diferentes grupos de sua superfície com a HA.

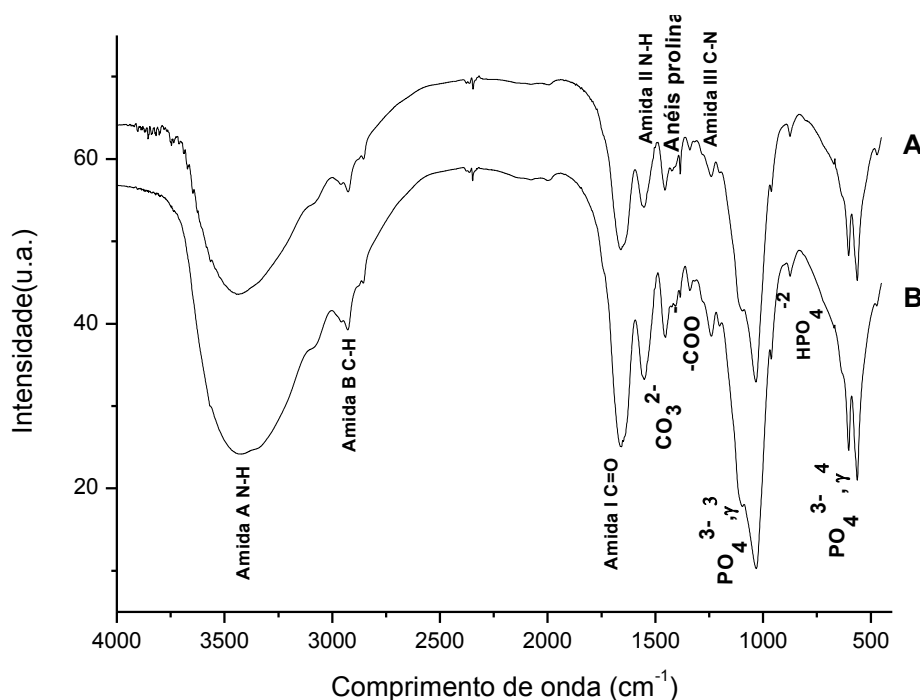


Figura V.5: FT-IR do compósito HA/Col antes (a) e após (b) o processo de reticulação pela solução de 0,125% de GTA.

V.2.3- Estimativa das fases mineral e orgânica no arcabouço HA/Col:

A análise termogravimétrica do arcabouço compósito HA/Col permitiu estimar a proporção entre a fase orgânica, composta por Col e a fase mineral (HA), assim como a água adsorvida. A estequiometria calculada para a realização da síntese previu uma proporção entre HA:Col de 50:50. Entretanto, aproximadamente 40% da composição da matriz do arcabouço correspondem à água adsorvida e fase orgânica composta por colágeno e 60% correspondem à fase mineral.

De acordo com a Tabela V.1, uma primeira perda de massa ocorre na faixa de temperatura de 40-170°C, correspondendo ao processo endotérmico de liberação da água adsorvida na superfície das amostras. A segunda faixa de perda de massa está relacionada aos processos exotérmicos no intervalo de 170-650°C. Nela ocorre a degradação e pirólise da tripla-hélice do colágeno combinadas com os nanocristais de HA na matriz do compósito (Gelinsky *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2003). Em temperaturas mais altas, em uma terceira faixa, ocorreria a degradação final térmica dos resíduos orgânicos ainda presentes.

Ao analisarmos os resultados para os 21 dias sob condições de cultivo estático, a perda de massa até a temperatura de 670°C é de aproximadamente 40%, mantendo a proporção do material sintetizado. Continua-se a observar 3 faixas de perda de massa (Tabela V.1). A primeira, correspondente à liberação de água adsorvida (entre 40 e 170°C), semelhante ao pico endotérmico apresentado para o osso natural; uma segunda, entre 190 e 400°C, e uma terceira entre 400 e 670°C, correspondentes à microdegradação seguida de uma macrodegradação das estruturas em hélice das moléculas de Col. Chang *et al.* (2003) afirmam que, até 800°C, ocorre a liberação de dióxido de carbono presente na HA carbonatada (observada por FT-IR). O dióxido de carbono é dissolvido na solução aquosa durante a síntese e reage com os íons hidroxila e/ou fosfato da HA.

Tabela V.1: Análise termogravimétrica do arcabouço compósito HA/Col reticulado e submetido durante 21 dias às condições de cultivo estático.

TGA HA/Col	Controle	7 dias	14 dias	21 dias
1 transição	4,69% massa 42.12 à 166.87	4,19% massa 42.09 à 181.26	6.67% massa 47.48 à 192.27	9,16% massa 47.03 à 178.71
2 transição	36,09% massa 163.19 à 647.68	23.39% massa 179.41 à 403.85	17.67% massa 187.70 à 403.10	23.45% massa 177.81 à 396.45
3 transição		9.61% massa 403.85 à 629.97	6,70% massa 403.10 à 661.45	11.04% massa 396.45 à 632.53
perda total (%)	40.78	37.19	31.04	43.65

O processo de reticulação do material aumenta sua temperatura de degradação. As duas etapas observadas podem ser explicadas pela degradação de duas formas estruturais. Uma primeira, onde as fibras de colágeno estariam menos compactadas e outra com uma organização estrutural mais importante, além das fortes ligações de hidrogênio da própria tripla-hélice da proteína.

A estabilidade reconhecida das ligações cruzadas realizadas pelo GTA resultou na manutenção da estrutura, mesmo com o processo de rehidratação e entumescimento da matriz 3-D. Segundo Friess & Lee (1996), as moléculas de GTA não reagem apenas com aminoácidos na formação de ligações cruzadas, mas formam uma rede complexa,

com ligações entre derivados de piridina e outros produtos de polimerização. Segundo, Wu *et al.* (2004), os próprios cristais de HA conectam as fibras de Col formando uma matriz melhor organizada.

V.3- POROSIDADE

A porosidade dos arcabouços 3-D utilizados em Bioengenharia do tecido ósseo possui uma importância considerável pois influencia vários processos relacionados às propriedades físico-químicas (como a área de superfície, liberação de íons pela matriz, propriedades mecânicas, entre outras) e aos processos biológicos (colonização celular, difusão de gases e nutrientes, formação de novos vasos sanguíneos, etc.).

A porosidade de biomateriais pode ser controlada através de inúmeros processos, como a adição de moléculas durante a síntese ou no processo de liofilização (Yunoki *et al.*, 2005). Nesse trabalho, a porosidade do material não foi controlada e é resultante do processo de moldagem e liofilização. Adicionalmente, o tratamento com GTA pode ter influenciado na compactação da estrutura, uma vez que provocou a agregação das fibras.

Dois métodos foram utilizados para a caracterização da porosidade do arcabouço HA/Col produzido: o método por deslocamento de líquido e a análise de imagens de cortes histológicos. Em ambos, encontrou-se uma porosidade média de 60-70% do volume da matriz. A porosidade mostrou-se muito heterogênea, com uma distribuição de tamanho de poros entre nano à microporos. Durante a formação do material, as fibras agregaram-se à medida que são adicionadas à solução de síntese em movimento. Formaram-se grupos macroscópicos de fibras mineralizadas que, após o preenchimento manual do molde e liofilização, mantêm macroporos na estrutura. Em análise microscópica, a substituição da água adsorvida entre as fibras de menores diâmetros por ar durante a liofilização, resultou em poros menores.

V.3.1- Hexano:

A porosidade obtida para as três amostras analisadas foi semelhante (Tabela V.2). Uma porosidade homogênea de $62 \pm 5\%$ foi encontrada entre as amostras. O

compósito HA/Col absorveu rapidamente o líquido, sem entumescimento aparente da sua macroforma.

Tabela V.2: Porosidade de 3 amostras do arcabouço compósito HA/Col reticulado medida por deslocamento de líquido.

	Porosidade (%)
amostra 1	68%
amostra 2	60%
amostra 3	59%

V.3.2- Porosidade por análise de imagens:

O resultado para a porosidade através da análise de imagens dos cortes histológicos apresenta-se semelhante ao encontrado pelo deslocamento de hexano (Tabela V.2). De acordo com o gráfico da Figura V.6, podemos afirmar que a porosidade paralela à superfície é de ~68% (nas duas amostras analisadas: 69 (± 5) e 67 (± 3)%). Essa porosidade é uniforme ao longo das seções paralelas à superfície em uma profundidade de 150 μ m.

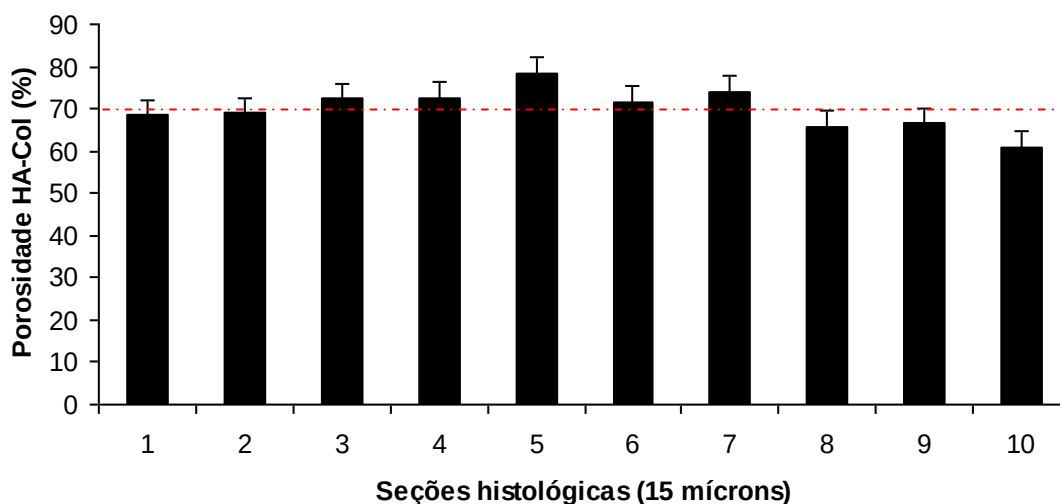


Figura V.6: Porosidade correspondente às seções histológicas seriadas paralelas à superfície de uma amostra do arcabouço compósito. Análise de imagem em seções de 15 μ m coradas com Picrosirius e tratadas por Image J[®].

V.4- CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ARCABOUÇO HA/COL

A caracterização morfológica do arcabouço compósito 3-D HA-Col foi realizada através de microscopia óptica de fluorescência e através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). As micrografias e análises relacionadas estão descritas a seguir.

V.4.1- Microscopia óptica e de fluorescência:

O arcabouço compósito reticulado HA/Col foi corado com Picrosirius e observado. Através micrografia da Figura V.7, pode-se observar a distribuição das dimensões dos poros (áreas marcadas com *). Observa-se uma grande heterogeneidade dos poros com dimensão média de $280\mu\text{m} \pm 80$. Adicionalmente, não há um controle estrito da agregação das fibras durante a síntese, resultando em estruturas fibrosas de diferentes dimensões. Essas estruturas são também resultantes do processo de reticulação e liofilização (Liu *et al.*, 2009; Chang & Tanaka, 2002a, b).

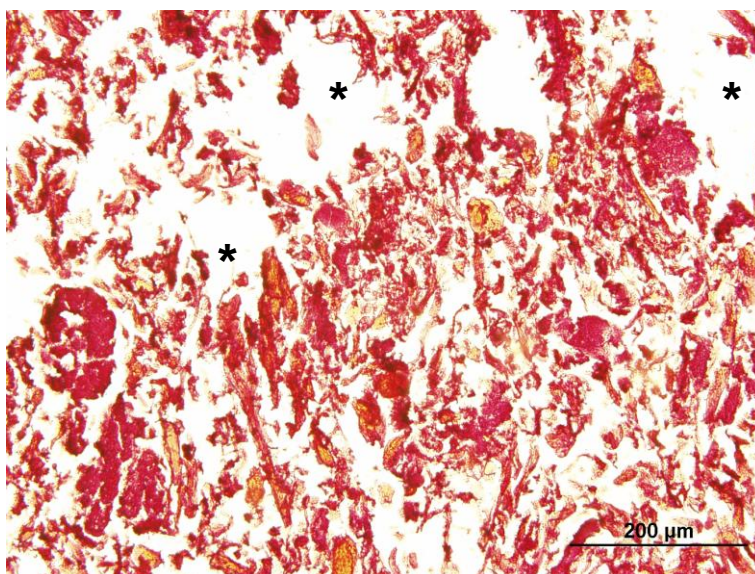


Figura V.7: Micrografia do arcabouço compósito HA/Col reticulado corado por Picrosirius. Fibras de colágeno em vermelho. Detalhes (*) nos poros presentes na estrutura 3-D.

A Figura V.8 corresponde à superfície do material observada ao microscópio de fluorescência. Nesta micrografia, a estrutura 3-D aparece fibrosa, com intensa marcação

do corante nas fibras de Col. Apesar da deposição mineral - também observada no difratograma e no espectro do compósito HA/Col (Figuras V.3 e 4) - as fibras de colágeno mantêm-se acessíveis às células, podendo desempenhar livremente a função de ancoragem celular na superfície orgânica do compósito produzido.

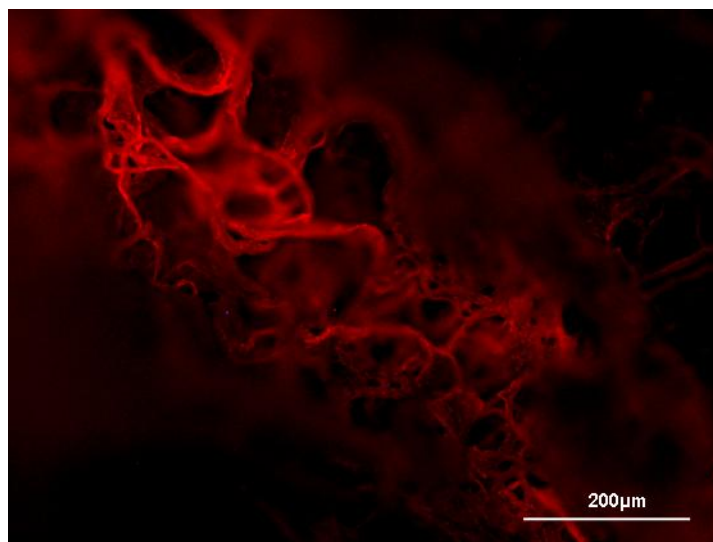


Figura V.8: Micrografia da superfície do arcabouço compósito HA/Col reticulado corada por Picosirius e observada em microscopia de fluorescência.

Segundo Anselme & Bigerelle (2006), a química de superfície, assim como a topografia, influenciam a adesão e proliferação celular. O reconhecimento, adesão e espraçamento da célula serão iniciados a partir dos primeiros contatos célula/material e, a qualidade desse primeiro contato, terá influência para a capacidade proliferativa e de diferenciação dessas células em contato com o material (Anselme, 2000; Hutmacher, 2000). Deste modo, a preservação das propriedades de superfície das moléculas de Col otimizariam a colonização da matriz 3-D e subsequentes eventos celulares.

V.4.2- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET):

As microestruturas de MEV do arcabouço compósito HA/Col são apresentadas na Figura V.9. A superfície do material apresenta-se fibrosa, com alta concentração de fibras mineralizadas de diâmetros variados (Figura 9 a). Em maiores magnificações (Figura V.9 b), podemos observar fibras altamente mineralizadas e organizadas randomicamente.

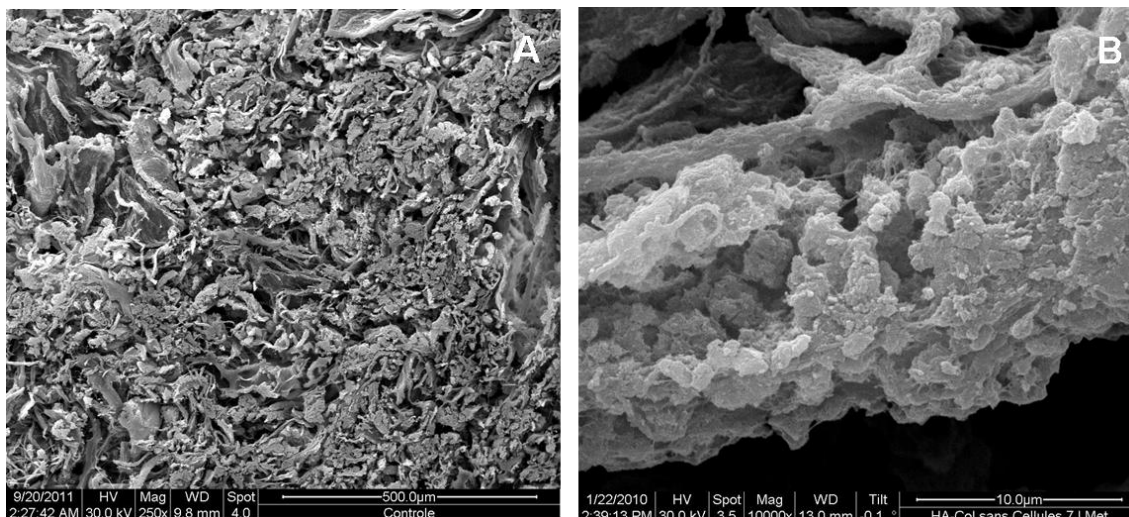


Figura V.9: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura compósito HA/Col reticulado (A). Detalhe para a deposição mineral das fibras (B). Magnificações: 250x; 10000x.

As micrografias eletrônicas foram úteis na avaliação dos processos de reagregação e mineralização fibrilar. Adicionalmente, a análise por EDS (Figura V.10) sinalizou a presença de carbono e nitrogênio (presentes nas moléculas de colágeno) e cálcio e fósforo (oriundos do processo de mineralização)

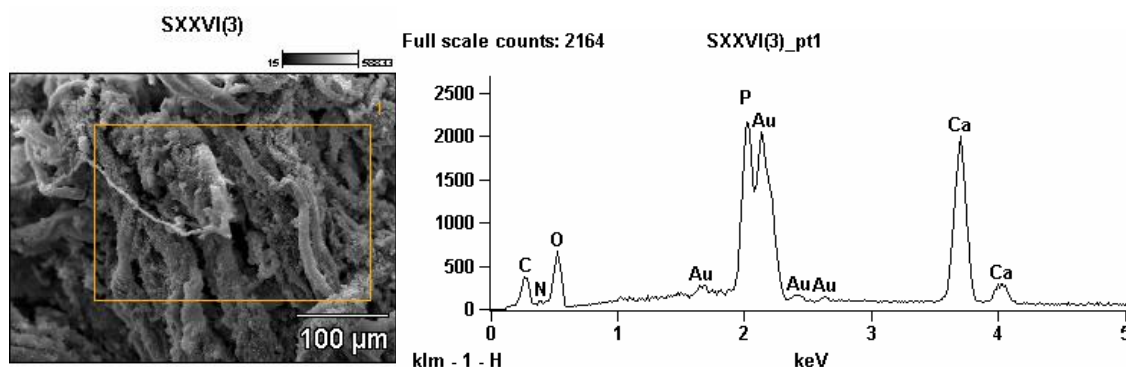


Figura V.10: Espectro de EDS do arcabouço compósito HA/Col reticulado. O pico de ouro (Au) decorre do recobrimento do compósito com ouro.

A estabilidade do arcabouço compósito HA/Col reticulado sob as condições de cultivo (estufa úmida à 37°C) foi observada por MEV em baixas magnificações. De acordo com as micrografias da Figura V.11, não houve perda da estrutura macroscópica do material mesmo após 21 dias de cultivo. Em contrapartida, a ausência do processo de

reticulação provoca a perda da estrutura 3-D do material produzido após 72 horas à 37°C e atmosfera úmida (imagem não mostrada).

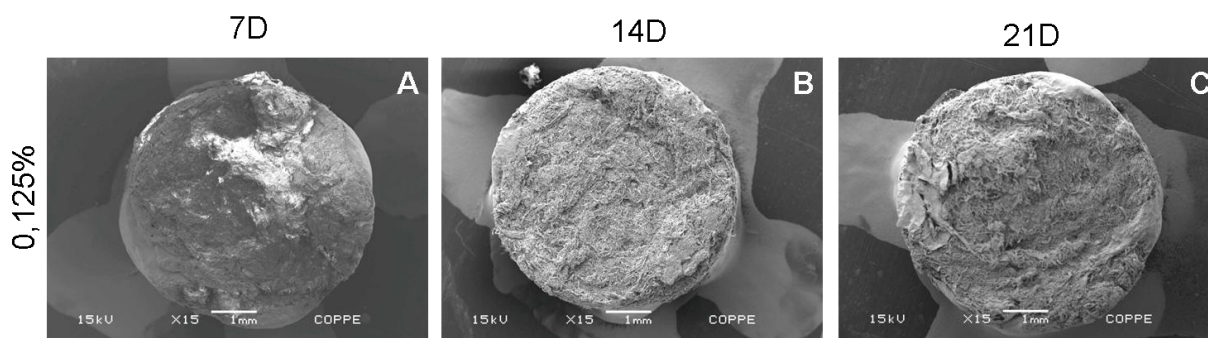


Figura V.11: Micrografias de MEV da superfície do arcabouço compósito HA/Col reticulado submetido às condições de cultivo durante 21 dias. Magnificação: 15x.

As micrografias de MET mostram que o processo de mineralização foi bem sucedido (Figura V.12), com a formação de estruturas policristalinas de HA (estruturas com alta densidade eletrônica) embebidos na matriz de Col (Figura V.12 a,c). Entretanto, em V.12b, observamos ainda a heterogeneidade do processo, com formação de agregados (“clusters”) de cristais de HA (*). A rápida e forte agregação das fibrilas com a brusca mudança de pH (da solução ácida de armazenamento para a solução aquosa e pH=9 da síntese) pode ter favorecido o aprisionamento de nanocristais em algumas regiões. A Figura V.12c revela a formação de microporos de diâmetro médio de 300µm (*).

Os cristais formados são alongados e apresentam dimensões nanométricas de 45nm ±9 de comprimento e 5nm ±1 de largura e morfologia de placas policristalinas sobrepostas e fracamente orientadas por fibras de Col (Figura V.12 a). Elliot (1994) e Bohner (2000) afirmam que a precipitação em soluções aquosas, onde a temperatura não excede 100°C, pode resultar cristais de tamanhos nanométricos ou até milimétricos, dependendo das condições de síntese. Zhai *et al.* (2005) controlaram as dimensões dos cristalitos de HA e o diâmetro das fibras de Col através das proporções dessas soluções no momento de síntese. O material final apresenta cristalitos na superfície das fibrilas de Col e foi altamente influenciado por essas concentrações e condições de síntese.

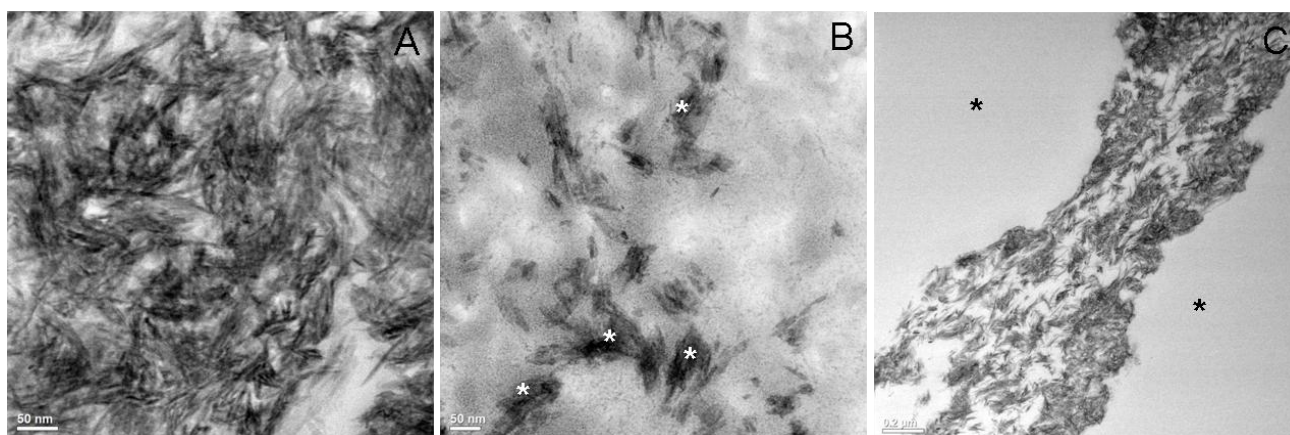


Figura V.12: Micrografias de TEM do arcabouço compósito HA/Col reticulado. Em (a), alto padrão de dispersão dos nanocristais de HA na matriz orgânica de Col; em (b), formação de alguns aglomerados policristalinos (*) evidenciando a heterogeneidade do processo e em (c) detalhes da microporosidade (*).

Apesar de não apresentarem orientação definida, os nanocristais podem apresentar algum nível de organização, aglomeram-se ao redor de grupos de fibrilas de Col. A periodicidade das bandas de Col não é aparente. Entretanto, as fibrilas agregam-se durante a síntese, formando estruturas de microméticas (Figura V.13a). Na Figura V.13b, observa-se uma eventual orientação de alguns cristais. Resultados dos grupos de Cui *et al.* (2007) e Liu *et al.* (2009) mostram a grande influência dos grupos químicos da superfície das fibrilas de Col na orientação dos nanocristais de HA.

Cui *et al.* (2007) e Baht *et al.* (2008) afirmam que polipeptídeos como Col podem guiar diretamente o arranjo de íons cálcio durante os estágios iniciais do processo de mineralização de Col. Provavelmente, a superfície de um conjunto de fibras serviu como template para orientar o crescimento dos cristais marcados (Figura V.13b). Os resultados sugerem que fibrilas curtas de Col, orientam a nanoestrutura e se aglomeram randomicamente durante o processo de reticulação por GTA (Kikuchi *et al.*, 2004b).

Adicionalmente, a ausência de algumas moléculas, como a decorina e a sialoproteína óssea, conhecidamente importantes durante o processo natural de nucleação dos cristais sob e entre as fibrilas de Col (regiões *gap*) pode resultar em

arranjos diferentes dos encontrados na matriz óssea (Zhang *et al.*, 2010; Baht *et al.*, 2008).

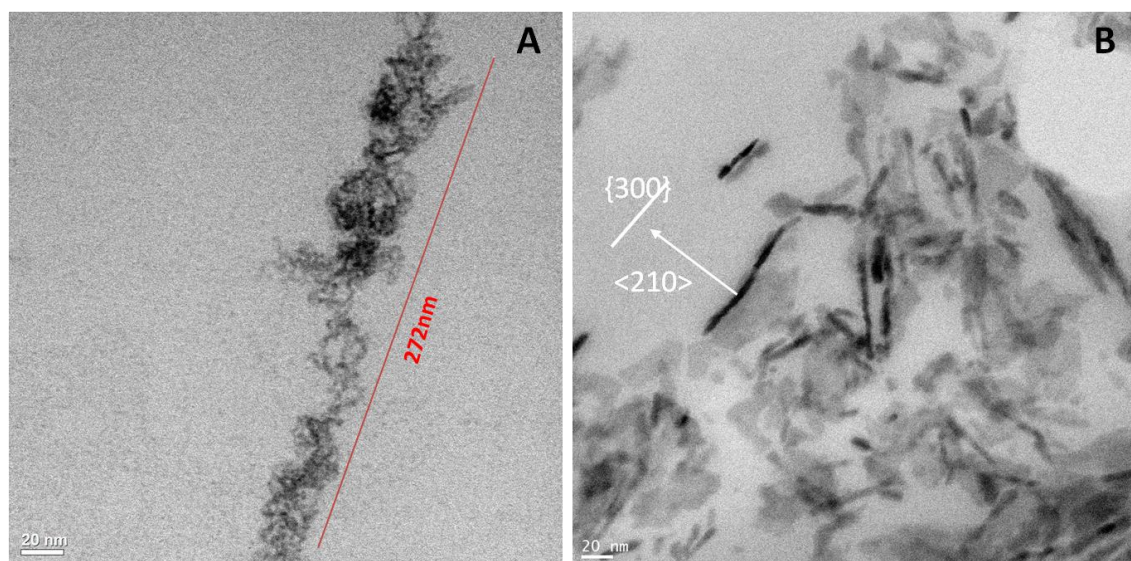


Figura V.13: Micrografias de MET do arcabouço compósito HA/Col reticulado contrastado com uranila. Em (A), detalhe da fibrila de Col após mineralização e em (B) orientação dos nanocristais de HA imersos na matriz de Col.

Os processos de mineralização variam entre os compósitos HA/Col produzidos atualmente por diferentes grupos (Ficai *et al.*, 2010a,b; Cui *et al.* 2008). A utilização do tendão bovino como fonte de Col pode influenciar no processo de mineralização, uma vez que tecidos não mineralizados apresentam configuração estrutural das moléculas de Col diferentes da dos tecidos mineralizados ou que irão sofrer mineralização iminente. Adicionalmente, a síntese proposta apresenta fibrilas de Col dissociadas em ambiente ácido, sem as ligações cruzadas naturais que ocorrem entre as fibrilas na matriz osteóide recém-formada.

V.5- CITOTOXICIDADE DO ARCABOUÇO COMPÓSITO HA/COL

A citotoxicidade do arcabouço compósito HA/Col foi avaliada por dois diferentes métodos. No primeiro, o material reticulado foi avaliado anteriormente à cultura celular através de três testes. No segundo, as amostras do material foram imersas e mantidas até 21 dias em solução tampão fosfato salina (PBS) em todas as condições

de cultivo propostas para a verificação liberação do agente reticulador GTA. Os resultados são apresentados a seguir.

V.5.1- Citotoxicidade do extrato do arcabouço pós-síntese:

A citotoxicidade foi mensurada utilizando três testes diferentes (Figura V.14). Seus resultados mostram a ausência de citotoxicidade do arcabouço compósito HA/Col reticulado.

No teste de XTT, a viabilidade celular foi significativamente mais elevada nas células cultivadas em contato com o material que nos controles negativo (superfície de titânio) e positivo (fenol) (*). No teste de vermelho neutro, apesar da integridade membranas das células cultivadas no arcabouço ser menor que no controle de titânio, este resultado é significativamente maior que o controle positivo (fenol) (**). De maneira similar, o teste de cristal violeta apresenta menor número de células no arcabouço HA/Col que no titânio (***) e sem diferença significativa quando comparado às amostras de fenol.

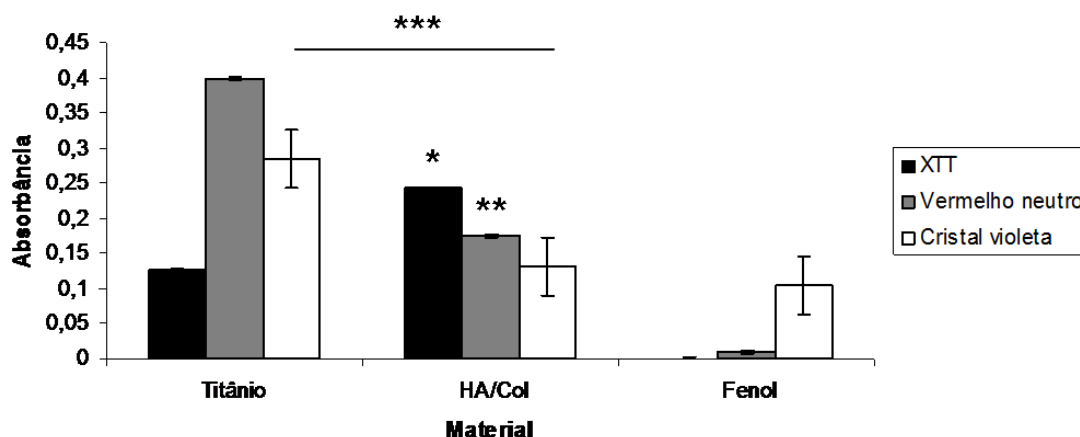


Figura V.14: Citotoxicidade do compósito HA/Col reticulado segundo três métodos de determinação: XTT, vermelho neutro e cristal violeta. Diferenças significantes entre os grupos de materiais testados (*, **, ***). $p < 0.05$.

V.5.2- Liberacao de GTA:

A utilização de um agente reticulador é essencial à manutenção da macroestrutura do material sugerido neste trabalho. Entretanto, com a rehidratação e entumescimento da matriz 3-D durante o cultivo celular (estático ou dinâmico), uma eventual quebra das ligações cruzadas poderia levar a uma liberação de GTA e toxicidade local (Jiang *et al.* 2006). Na Figura V.15, são apresentados os espectros das soluções de PBS em detalhe, onde amostras do arcabouço compósito reticulado foram mantidas durante 21 dias.

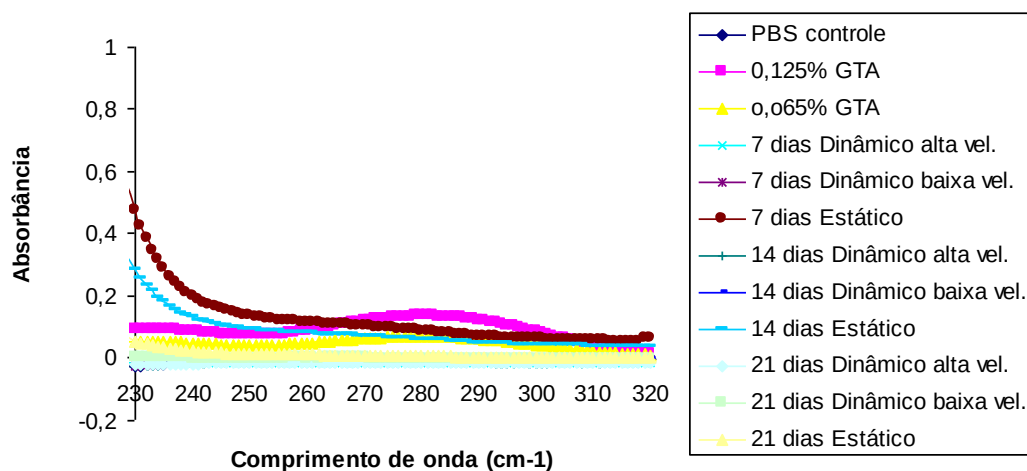


Figura V.15: Detalhe dos espectros de UV-visível das soluções de PBS expostas ao arcabouço até 21 dias. Sta= condição estática; Dyn= condição dinâmica em alta vazão.

Os valores de absorbância das amostras de PBS analisadas mostram que não houve liberação de GTA em solução até o 21^o dia, mesmo quando submetidas ao cultivo dinâmico. Os valores considerados em 235 e 280nm apresentam-se abaixo daqueles alcançados na amostra controle de GTA (0,125%). As ligações entre GTA e as fibrilas de Col mostram-se altamente estáveis (Charulatha & Rajaram, 2003; Jayakrishnan e Jameela, 1996).

Conclui-se que o arcabouço compósito HA/Col não é citotóxico, sem a liberação de resíduos de GTA durante 21 dias de cultivo sob as diferentes condições e podendo ser utilizado como suporte para o cultivo de células.

V.6- AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Células osteoprogenitoras estromais (Stro+1A) foram cultivadas em contato com o arcabouço compósito HA/Col reticulado durante 21 dias sob 3 diferentes condições de cultura: estática, dinâmica em baixa vazão (0,03ml/min) e dinâmica em alta vazão (0,3ml/min).

Os comportamentos celulares em relação à: adesão, capacidade de colonização do material 3-D, proliferação e diferenciação foram analisados. A fim de compreender os fenômenos descritos a seguir, ensaios e análises sobre a influência das condições de cultivo sobre o próprio material também foram realizados. Durante todo o cultivo sob diferentes condições, o arcabouço demonstrou alta estabilidade estrutural, como previsto pelos resultados já apresentados.

V.6.1- Adesão:

O teste de adesão realizado teve por objetivo comprovar que, após o período de pré-incubação (24 horas em cultivo estático), a maior parte das células estava aderida, sem riscos de serem retiradas pelo meio de cultivo em movimento (sob condição dinâmica).

Na Figura V.16, podemos observar que a maior parte das células semeadas estão aderidas a partir de 6 horas. Segundo Anselme (2000), as primeiras interações eletrostáticas ocorrem rapidamente, iniciando o processo de adesão já nas primeiras horas de contato com a superfície. Essas primeiras interações serão determinantes para os processos posteriores de proliferação e diferenciação (Bjerre *et al.*, 2008). Kim *et al.* (2011), afirmam que uma inoculação celular otimizada em ambientes 3-D pode aumentar a resposta celular e promover a regeneração tecidual.

Entre 3 e 6 horas (*), provavelmente ocorre o reconhecimento e início das interações entre proteínas da membrana (integrinas) e regiões RGD da superfície das

fibras de colágeno da matriz compósita (Thein-Han & Xu, 2011).

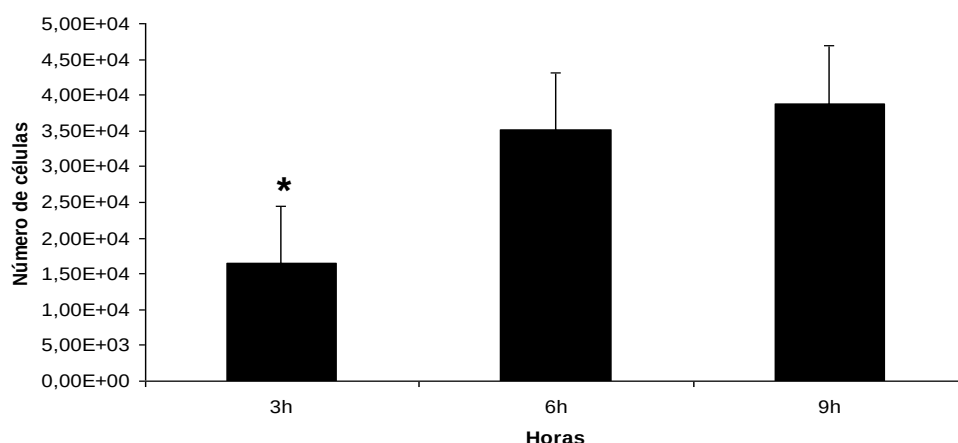


Figure V.16: Adesão das células Stro+1A no arcabouço compósito HA/Col reticulado. n=3. Diferenças significativas entre os tempos (*). n=6. $p < 0.05$.

Entretanto, o processo de inoculação utilizado, com adição de meio de cultivo imediatamente após o contato celular com a superfície do material, pode ter provocado a perda de inúmeras células para o fundo do poço da placa de cultura. O processo de inoculação pode ser otimizado através de diferentes métodos de inoculação, como por exemplo, a adição do meio de cultivo após 2-4 horas da inoculação ou a centrifugação do material + células após a inoculação (Partap *et al.* 2010; Wiedmann-Al-Ahmad *et al.*, 2002).

A morfologia celular durante o processo de adesão pode ser observada na Figura V.17. Nos tempos iniciais (3h), as células estão aderidas e levemente alongadas. O processo de reconhecimento da superfície se desenvolve ao longo das 9 horas apresentadas.

Pode-se observar que, ao longo do tempo (6 e 9h), a superfície do compósito apresenta-se progressivamente recoberta pelas células (Figura V.17). Estas são aparentemente mais numerosas. Morfologicamente, as células Stro+1A tornam-se mais poligonais e desenvolvem interações com a superfície fibrosa, apresentando maior número de processos celulares como filopódios.

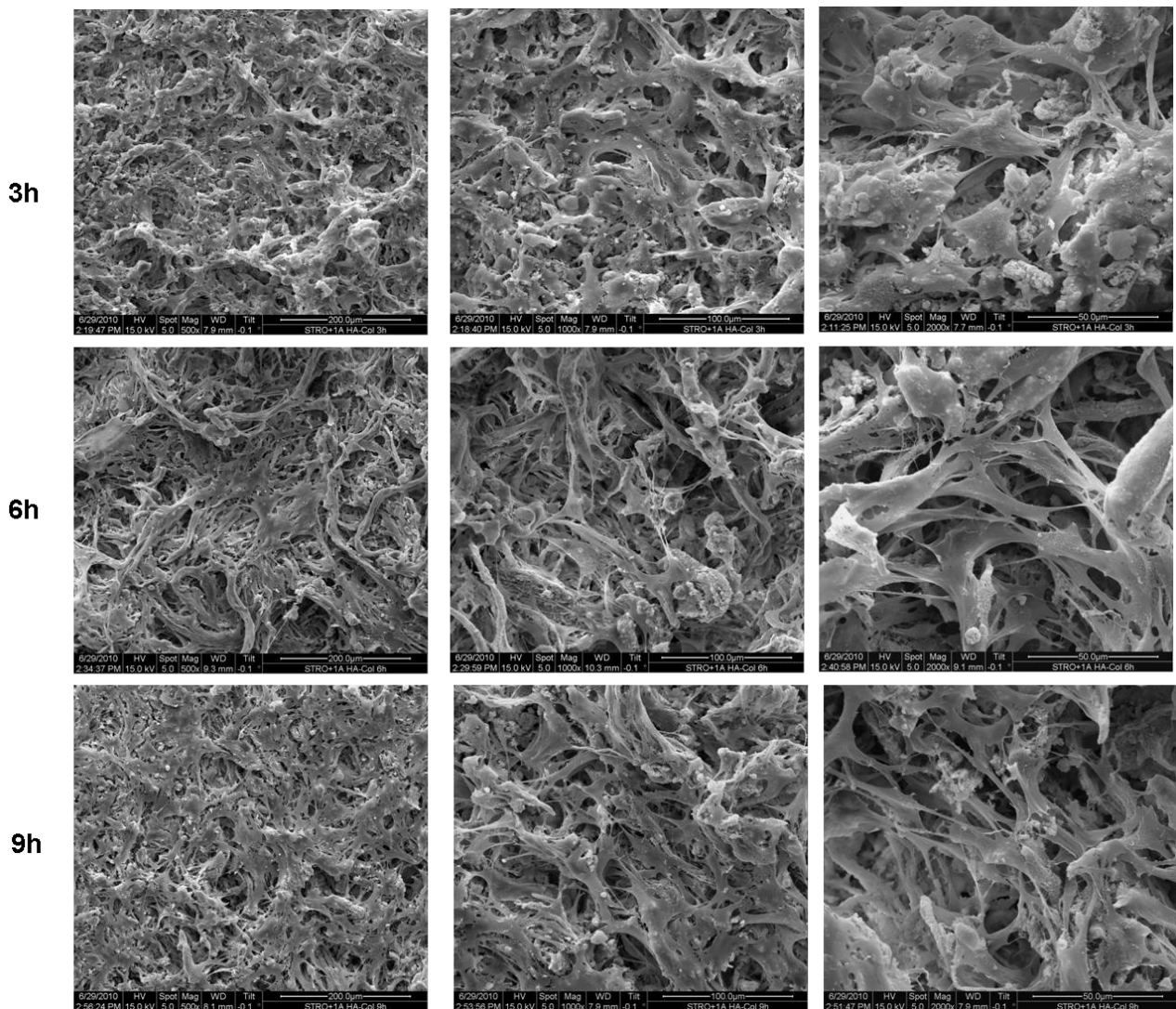


Figura V.17: Micrografias das células Stro+1A em processo de reconhecimento da superfície e adesão sobre o arcabouço composto HA/Col reticulado. Magnificações: 500x, 1000x e 2000x.

V.6.2- Viabilidade celular:

A viabilidade celular foi determinada através método colorimétrico do MTT. Os resultados da atividade mitocondrial podem nos dar indícios sobre o metabolismo celular e, conseqüentemente, sobre o comportamento destas em contato com o composto HA/Col. Os resultados da viabilidade celular no decorrer de 21 dias diferem em relação às condições de cultivo (Figura V.18).

Em condição estática, observamos o aumento não-significativo da viabilidade até o sétimo dia, equilibrando-se entre o sétimo e décimo-quarto dia com uma diminuição significativa na última semana (***). Essa diminuição no metabolismo pode ser explicada por uma queda na velocidade de proliferação. Geralmente, na condição estática, as células tendem a formar uma camada estratificada na superfície do material (Wang *et al.* 2007). Contatos entre as membranas são gerados, iniciando diversas vias de sinalização no interior das células. Processos de morte celular de células tronco mesenquimais em condição estática foram observados por Zhang *et al.* (2009) após 2 semanas de cultivo estático.

Em experimentos do grupo de Bjerre *et al.* (2008) foi verificado que a proliferação celular após 7 dias em condição dinâmica atinge o mesmo resultado que a condição estática após 2 dias de cultivo. Entretanto, ao final do cultivo, o número de células em condição dinâmica foi significativamente maior que em condição estática. Esse resultado pode ser corroborado pela rápida confluência atingida na superfície das amostras.

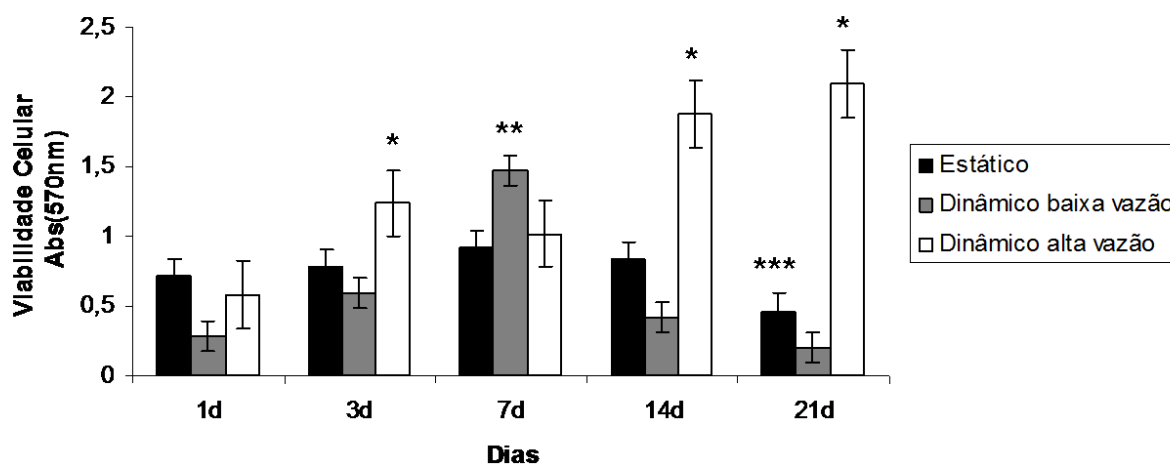


Figura V.18: Viabilidade celular no arcabouço compósito HA/Col reticulado em diferentes tempos e sob diferentes condições. Diferenças significativas entre os tempos e condições de cultivo (*, **, ***). n=6. $p < 0.05$.

Em condição dinâmica em baixa vazão, existe o aumento significativo da viabilidade celular até o sétimo dia em relação ao cultivo estático (**), com expressiva queda a partir do oitavo até o vigésimo-primeiro dia. A forte queda observada da

atividade mitocondrial pode estar relacionada: (1) à diminuição do metabolismo e da proliferação celular; (2) aos processos de morte celular programada (apoptose).

Um efeito negativo na proliferação pode estar relacionado ao fato das células, em cultivo dinâmico, estarem mais dispersas na superfície em relação ao cultivo estático (Bjerre *et al.* 2008). A diferenciação celular da linhagem osteoblástica necessita de alta confluência e de contatos tipo célula-célula (Wiedmann-Al-Ahmad *et al.*, 2002). A distância célula-célula atua na troca de sinais osteogênicos e nas sinalizações parácrinas (Kim *et al.*, 2011). Adicionalmente, para o cultivo em baixa vazão, o sistema de recuperação de meio é aberto, ou seja, não há o retorno do mesmo meio uma vez que este atravessa o biorreator. A passagem de meio diluindo e “lavando” os fatores de sinalização locais - ou até mesmo as próprias células - pode ter provocado esse resultado negativo (Yeatts & Fisher, 2011; David *et al.*, 2011).

Em condição dinâmica em alta vazão, a viabilidade aumenta significativamente entre os três primeiros dias (*), equilibrando-se até o vigésimo-primeiro. Nas duas últimas semanas de cultivo (14 e 21 dias), a viabilidade celular apresenta-se significativamente maior que nas outras duas condições (*). Os efeitos da mecanotransdução da alta vazão do fluido nas células podem ter contribuído para o efeito positivo. As forças de cisalhamento podem ativar padrões de sinalização, com estímulo na regulação via AMP cíclico (adenosina monofosfato) e óxido nítrico (Zhang *et al.*, 2009). Todas essas vias implicam nos mecanismos de reparo tecidual.

Adicionalmente, o acúmulo de fatores de sinalização do sistema fechado em alta vazão (com retorno contínuo do mesmo meio durante 7 dias) pode resultar em comunicações intercelulares mais importantes que no sistema de cultivo estático ou dinâmico de baixa vazão (sistema aberto).

O gráfico da Figura V.19 apresenta a contagem de núcleos feita através das seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col. Apesar do alto desvio padrão apresentado, pode-se extrair algumas informações pertinentes ao cultivo sob diferentes condições.

Observa-se que a quantidade de núcleos marcados por seção para o cultivo estático aumenta na primeira semana, com ligeira queda a partir da segunda. Em relação à viabilidade apresentada na Figura V.18, as células apresentam perfil semelhante, com diminuição da viabilidade por volta do 21º dia. Bjerre *et al.* (2008) observaram o início do processo de diferenciação e deposição de uma nova matriz extracelular a partir do 7º dia.

As limitações apresentadas em cultivo estático podem ter sido influenciadas por um ambiente desfavorável à proliferação e ao aumento da população celular. De maneira geral, arcabouços 3-D desenvolvidos para engenharia tecidual apresentam deficiências em relação ao aporte de nutrientes e gases em baixos volumes de meio (Zhang *et al.*, 2009). Segundo Liu *et al.* (2009), estruturas 3-D altamente porosas podem provocar gradientes de fatores de crescimento e citocinas em seu interior, diminuindo a adesão e a sinalização celular.

Jaasma *et al.* (2008) e Bjerre *et al.* (2008) afirmam que uma espessura de 150-200µm é o limite de penetração de nutrientes a partir da superfície em direção ao centro da amostra em cultivo estático. Adicionalmente, a superfície recoberta por uma camada de células ativas até o 21º dia pode ter agravado a insuficiência de gases e nutrientes. Segundo Dong *et al.* (2001), osteoblastos necessitam de um ambiente de concentração de oxigênio bem definida para proliferarem.

Os resultados obtidos para o cultivo dinâmico em baixa vazão apresentam uma constante queda do número de núcleos marcados por seção do 1º ao 21º dia. Comparativamente à viabilidade celular, nota-se que as células possuem o seu pico de atividade metabólica em torno do 7º dia, com queda na viabilidade nas duas últimas semanas. Diretamente, a queda na viabilidade está relacionada à queda da quantidade de células nas amostras.

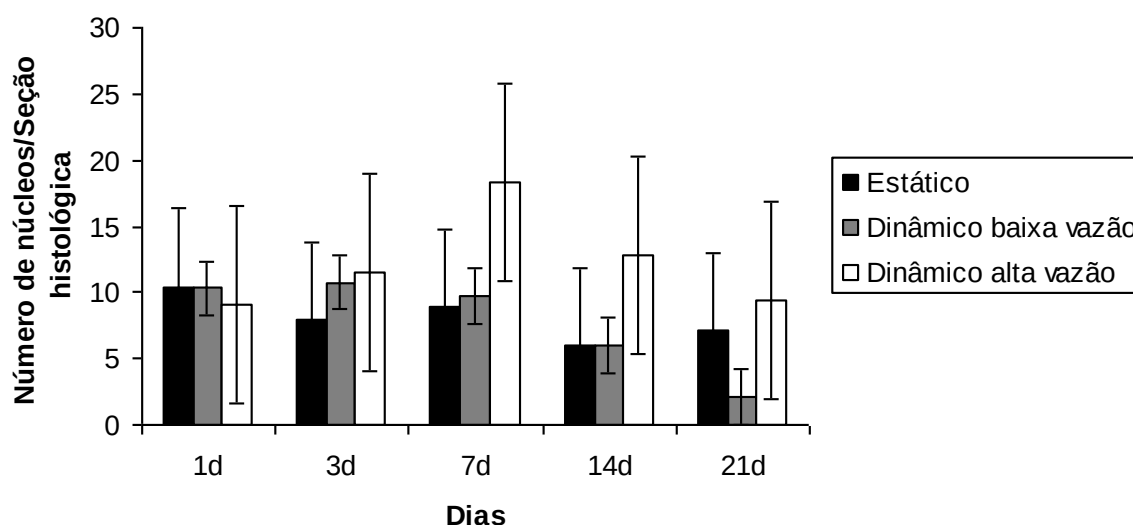


Figura V.19: Contagem dos núcleos celulares marcados por DAPI presentes por seção histológica do arcabouço compósito HA/Col submetido às diferentes condições de cultivo por até 21 dias. n= 4.

Os resultados da quantidade de núcleos marcados para o sistema dinâmico em alta vazão revelam que, apesar de não-significativo, o 7º dia apresenta a maior quantidade de núcleos marcados. Em contrapartida, a viabilidade celular é maior nos últimos tempos de cultivo (14º e 21º dias). Provavelmente existe uma intensa proliferação celular nas primeiras semanas, com aumento da atividade metabólica na segunda e terceira.

Os resultados apresentados nas Figuras V.18 e V.19 mostram que, para o cultivo dinâmico variando a vazão, o comportamento celular pode diferir fortemente. Variando a vazão do fluido no interior de biorreatores, variam-se o transporte de massa, a disponibilidade de nutrientes e retirada de excretas, as forças atuantes, entre outros fatores (Yeatts & Fisher, 2011b).

Observando os resultados práticos do método do MTT, diferenças de coloração das amostras foram visualizadas. Variações no metabolismo celular em relação à posição no interior do biorreator foram vistas. A Figura V.20 apresenta o número de células por posição no interior dos biorreatores, tempo e vazão (baixa e alta).

Em baixa vazão (Figura V.20a), a quantidade de células é significativamente maior na 1ª posição nos 3 primeiros dias. Provavelmente, células presentes nesta posição recebem uma maior concentração de nutrientes que as amostras posicionadas na segunda e terceira posições no interior do biorreator. Não foram observadas diferenças significativas nos outros tempos de cultivo (7, 14 e 21 dias). Provavelmente, o próprio sistema dinâmico de fluido tende a um equilíbrio no interior da câmara, estabelecendo os parâmetros de sobrevivência celular.

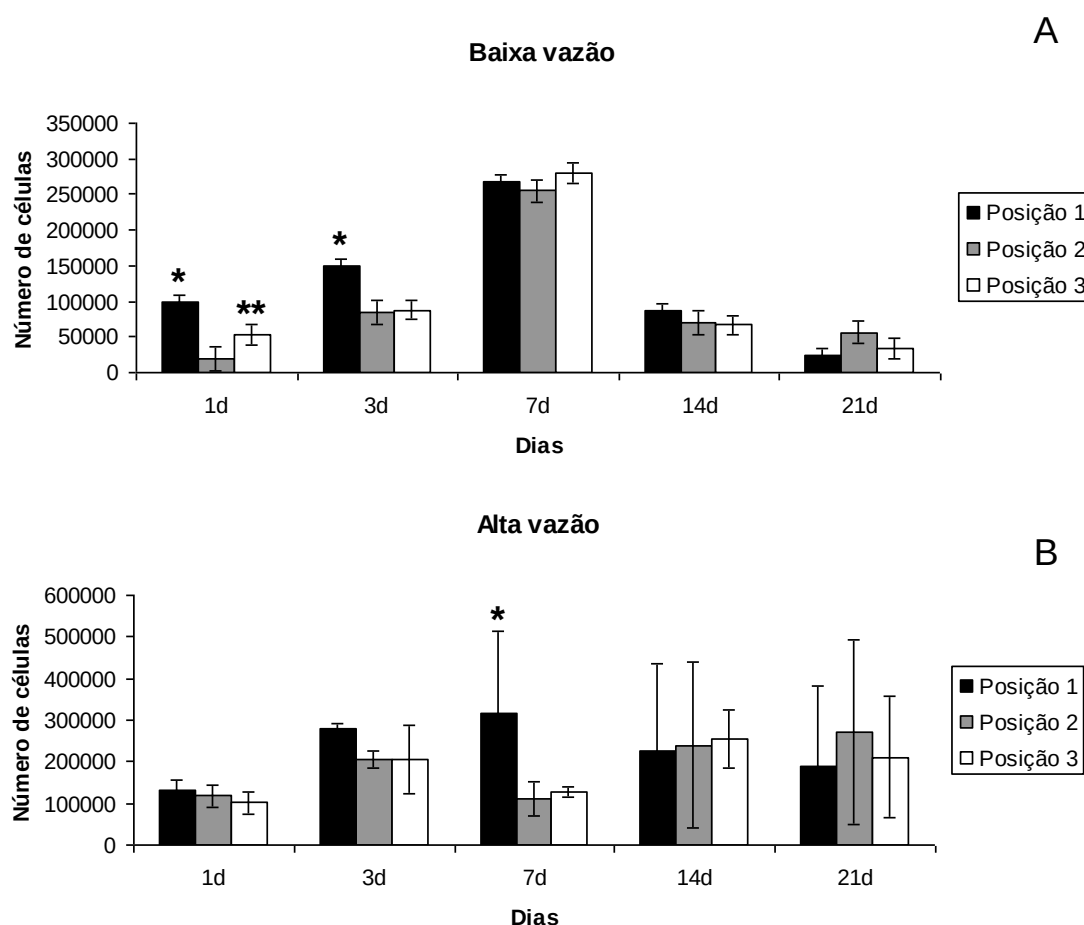


Figura V.20: Número de células Stro+1A cultivadas no arcabouço compósito HA/Col reticulado em diferentes tempos, vazões e posições no interior do bioreator. Diferenças significativas entre os tempos e condições de cultivo (*, **). n=6. $p < 0.05$.

Para o cultivo em alta vazão, não foram observadas diferenças na quantidade de células variando a posição no interior do biorreator (Figura V.20b). Apenas ao 7º dia de cultivo, na primeira posição, a quantidade de células é significativamente maior que nos outros tempos e posições. O sistema em alta vazão permite uma renovação mais rápida

do meio de cultura no interior da câmara. Uma diferente distribuição na passagem do líquido pelas amostras também pode ter influenciado positivamente a troca de nutrientes, gases e excretas entre as células e o meio circundante.

Apesar do sistema dinâmico em alta vazão apresentar um sistema fechado (com troca do volume de meio a cada 7 dias), nenhuma mudança brusca na coloração do meio de cultivo, e logo do pH, foi verificada. A difusão dos gases ocorre pelos tubos de silicone permeáveis dos sistemas. Segundo Kinney *et al.* (2011), células com maior capacidade proliferativa apresentam uma taxa de glicólise (via anaeróbia) mais elevada e um menor consumo de oxigênio (via aeróbia). Portanto, o uso de um sistema fechado para a alta vazão, não afeta a capacidade proliferativa das células, mesmo com uma menor renovação da taxa de oxigênio.

V.6.3- Análise morfológica - microscopia eletrônica de varredura (MEV):

A morfologia celular durante os 21 dias de cultivo sob as diferentes condições foi observada. Micrografias de MEV referentes às 24 primeiras horas e aos 3 primeiros dias de cultivo são exibidas na Figura V.21; aos 7 e 14 dias de cultivo na Figura V.22; e aos 21 dias de cultivo na Figura V.23.

Nos 3 primeiros dias de cultivo, sob todas as condições, as células apresentam morfologia fibroblastoide (espraiadas) na superfície dos arcabouços. Não foram identificadas diferenças morfológicas entre as condições. As células interagem bem com a superfície fibrosa e visualiza-se uma maior quantidade de filópodios nas amostras submetidas às tensões de fluxo do cultivo dinâmico (Figura V.21, b,c,e,f). É evidente que as células submetidas às forças de cisalhamento do meio de cultivo formam um maior número de processos de adesão focal e fibras de tensão (Marques da Silva *et al.*, 2010).

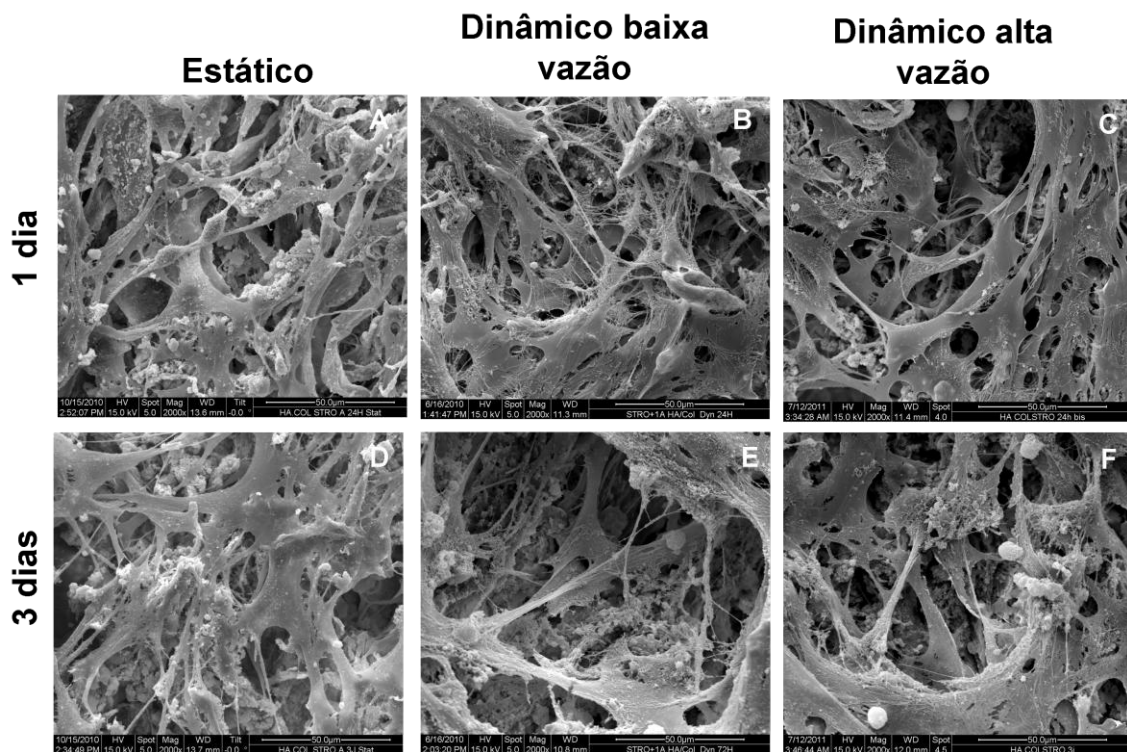


Figura V.21: Micrografias das células Stro+1A cultivadas no arcabouço compósito HA/Col reticulado após 1 e 3 dias de cultivo sob diferentes condições. Magnificação: 2000x.

A partir do 7º dia de cultivo, observam-se diferenças morfológicas mais expressivas entre as condições de cultura. As células submetidas ao cultivo estático mantêm a morfologia já apresentada até o 3º dia, com o surgimento de estruturas de aparência mineral nas superfícies celulares (Figura V.22 a,d). Essas estruturas podem ser secreções celulares de uma nova matriz extracelular composta por proteínas e posteriormente mineralizadas (Bjerre *et al.* 2008).

Em relação ao cultivo dinâmico, as células não são facilmente visualizadas na superfície dos arcabouços submetidos à baixa vazão (Figura V.22b). Adicionalmente, estruturas arredondadas, semelhantes a células em processo de morte celular, são observadas (Figura V.22 e). Do mesmo modo que nos resultados de viabilidade, a partir do 7º dia, a diminuição do número de células pode estar relacionada a um processo apoptótico. Outros métodos podem ser utilizados futuramente para comprovar tal comportamento.

Células submetidas à alta vazão apresentaram morfologia fibroblastóide (altamente espalhadas) ao 7º dia (Figura V.22 c). Na micrografia da Figura V.22 f, visualiza-se estruturas semelhantes a uma nova matriz fibrosa entre as células (setas). De acordo com os resultados da viabilidade, as células Stro+1A estão em uma fase de intensa atividade mitocondrial e, provavelmente, de metabolismo e produção de proteínas. Aos 14º dias, visualiza-se estruturas correspondentes à produção de uma nova matriz extracelular na Figura V.22 f (setas).

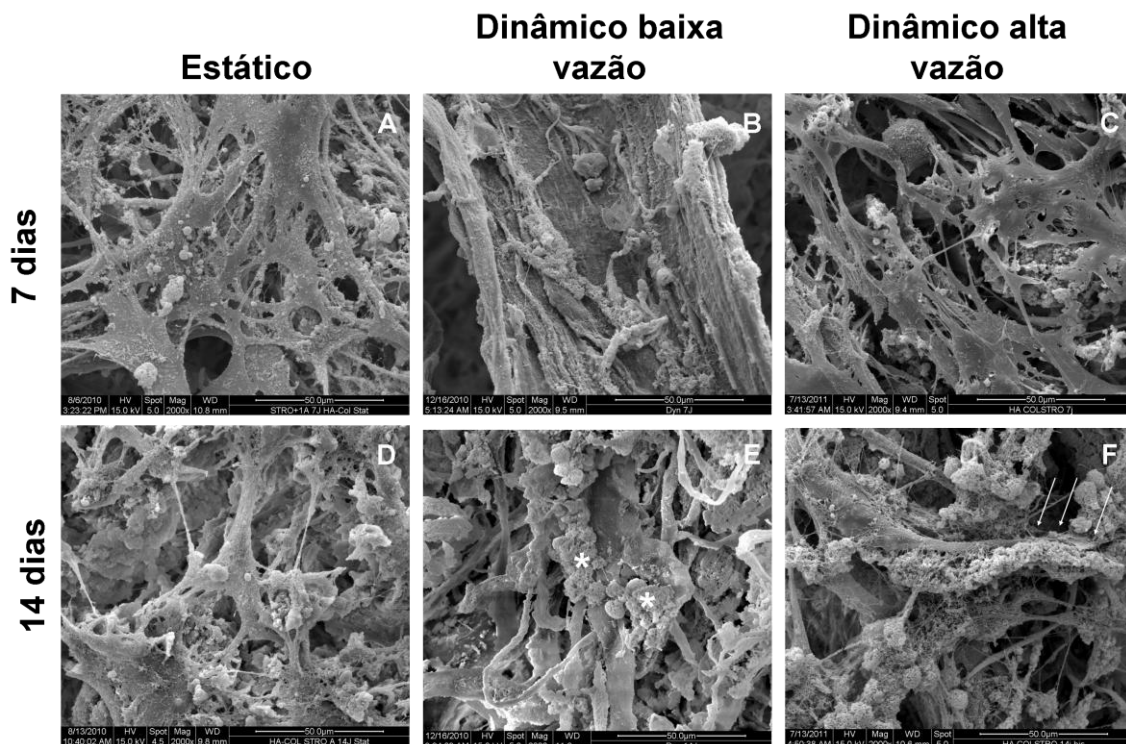


Figura V.22: Micrografias das células Stro+1A cultivadas no arcabouço composto HA/Col reticulado após 7 e 14 dias de cultivo sob diferentes condições. Magnificação: 2000x.

Nas micrografias referentes ao 21º dia de cultivo, a morfologia celular difere entre as condições. As células cultivadas em ambiente estático perdem sensivelmente a morfologia fibroblastóide (Figura V.23 a). Torna-se difícil a visualização das interações celulares com a superfície do arcabouço composto (devido à alta confluência).

Não são observadas células vivas na superfície do arcabouço submetido à condição dinâmica em baixa vazão (Figura V.23 b). A superfície fibrosa do arcabouço

compósito ainda pode ser observada e demonstra-se estável ao longo das três semanas de cultivo.

A morfologia celular em condição dinâmica em alta vazão corresponde às já relatadas ao longo dos 21 dias de cultivo (Figura V.23 c). A presença de estruturas fibrosas na superfície das células ainda está presente, mas não é possível afirmar que foi aumentada.

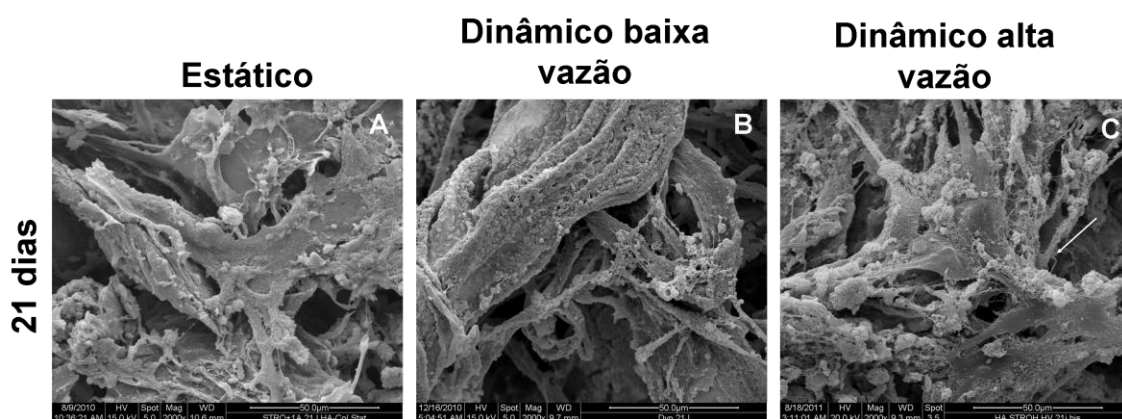


Figura V.23: Micrografias das células Stro+1A cultivadas no arcabouço compósito HA/Col reticulado após 21 dias de cultivo sob diferentes condições. Magnificação: 2000x.

V.6.4- Concentração de íons cálcio em solução:

A fim de analisar as estruturas encontradas nas superfícies celulares, as concentrações de íons Ca^{+2} foram mensuradas no meio de cultivo. Devido ao possível processo de produção de matriz extracelular por parte das células e de precipitação/dissolução da matriz em biomateriais cerâmicos, os resultados de concentração de cálcio sem e com a presença de células foi averiguado.

Em todas as condições de cultivo ocorre a adsorção de íons cálcio. Adicionalmente, mesmo na ausência de células, o material é capaz de adsorver íons cálcio oriundos do meio (Figura V.24 a,b).

De maneira geral, a condição dinâmica apresenta taxas de adsorção de cálcio superiores à condição estática. Na Figura V.24 a, aos 14 dias de cultivo sem células, ambas as condições dinâmicas apresentam uma maior quantidade de íons Ca^{+2}

adsorvidos em relação ao cultivo estático (*,**). Ainda para a condição dinâmica em alta vazão, o resultado é significativamente maior no 7º, 14º, e 21º em relação ao estático e 7º e 21º dia para a condição dinâmica de baixa vazão (*). Entretanto, não existem diferenças significativas entre os tempos de cultivo para a condição de alta vazão. A renovação constante de meio com maior vazão resulta em uma elevada concentração de íons disponíveis em contato com a matriz do material.

Em presença das células Stro+1A (Figura V.24 b), o comportamento de adsorção dos íons Ca^{+2} é mantido. As condições de cultivo não apresentam diferenças significativas entre os tempos. Entretanto, entre as condições, assim como nos resultados apresentados na ausência de células, a condição dinâmica em alta vazão difere significativamente nos 7º, 14º e 21º dia do cultivo estático e do dinâmico em baixa vazão (*).

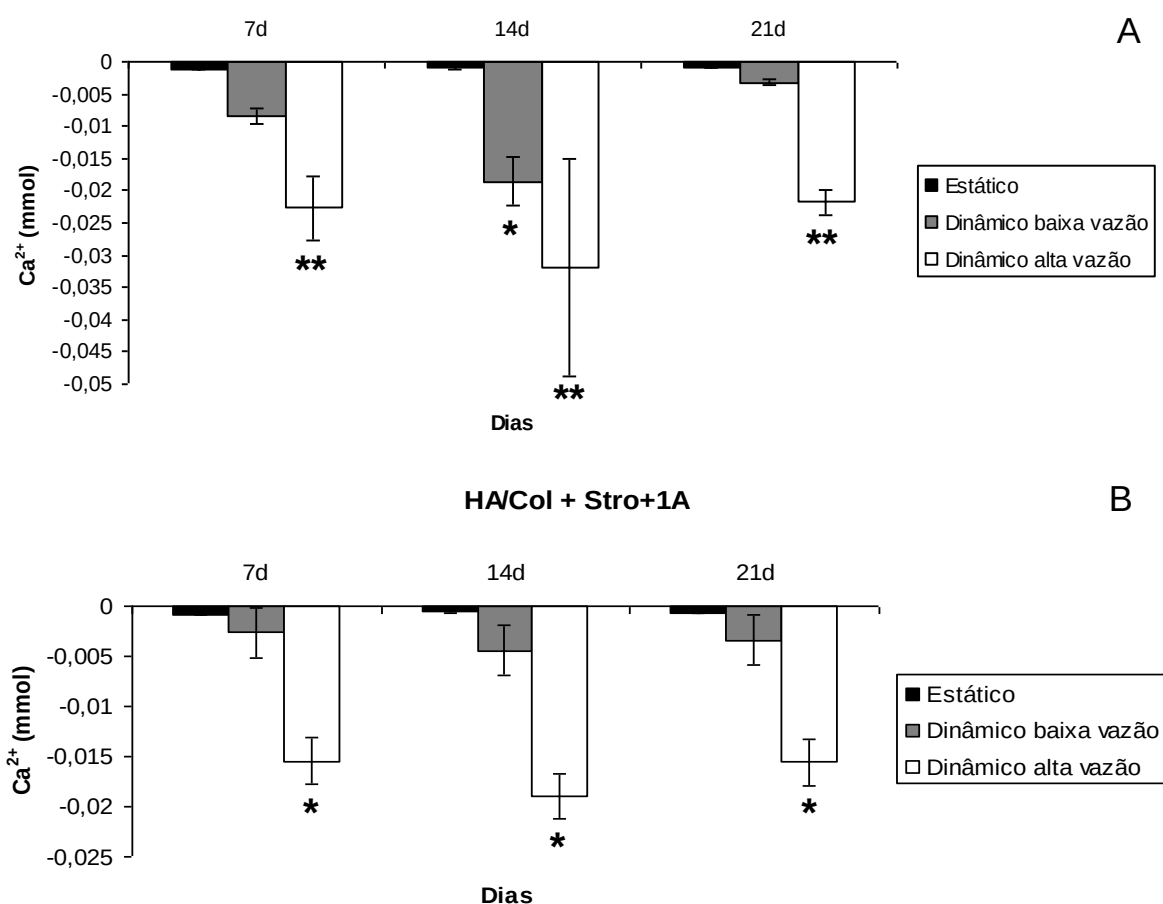


Figura V.24: Concentração de Ca^{+2} em meio de cultura com o arcabouço composto HA/Col reticulado em ausência (A) e presença (B) de células Stro+1A com 7, 14 e 21

dias de cultura e sob diferentes condições. Diferenças significativas entre os tempos e condições de cultivo (*,**). $p < 0.05$.

Em relação à presença de células, existem diferenças significativas em todos os tempos de cultivo (7, 14 e 21 dias) para a condição estática. Segundo Declercq *et al.* (2005), a capacidade de osteoindução e mineralização do biomaterial deve se dar de maneira verdadeira, isto é, com deposição de uma nova matriz extracelular mediada por células, e não apenas como consequência da precipitação espontânea de íons cálcio e fosfato.

Em condição dinâmica em baixa vazão, apenas o 7º dia apresenta diferença significativa. E em condição dinâmica em alta vazão, as células desempenham um papel importante na adsorção de cálcio apenas aos 21 dias. Esse resultado é interessante quando comparamos as morfologias das células na micrografia da Figura V.23 c, onde estruturas semelhantes a uma nova matriz extracelular secretada foi visualizada.

Como demonstrado nas micrografias eletrônicas, as células Stro+1A começam, a partir da segunda semana em cultivo dinâmico em alta vazão, a apresentar em sua superfície estruturas minerais semelhantes a uma matriz extracelular. Entretanto, esse perfil ainda é tímido em relação ao observado para as células em cultivo estático. Geralmente, células estromais iniciam a deposição de cálcio na matriz após 8-10 dias com aumento ao longo do tempo de cultivo. Essa deposição de cálcio ocorre de maneira desorganizada e não-modular (Fromigüé *et al.*, 1997).

Kassem *et al.* (2008) afirmam que o processo de mineralização é mediado por várias proteínas não-colagênicas e proteoglicanas, e a ausência dessas moléculas pode acarretar em padrões de mineralização diferentes dos obtidos naturalmente ou em cultura em condição estática.

V.6.5- Colonização do arcabouço HA/Col reticulado pelas Stro+1A:

A capacidade das células osteoprogenitoras estromais colonizarem o arcabouço 3-D HA/Col reticulado foi avaliada pela visualização dos núcleos celulares marcados com DAPI presentes em cortes transversais. A dispersão das células na

superfície/interior do arcabouço compósito HA/Col está exposta nas Figuras V. 25, V.26 e V.27.

As seções histológicas da Figura V.25 mostram núcleos celulares na superfície das amostras sob as três condições de cultivo após 24 horas de cultivo (Figura V.25 a,b e c). Bjerre *et al.* (2008) obtiveram resultados semelhantes: após dois dias de cultivo estático e dinâmico, as células de medula óssea proliferaram e migraram sobre a superfície da amostra.

As células do sistema dinâmico apresentam núcleos paralelos à orientação das fibras de colágeno (Figura V.25 c e f), provavelmente resultado do alinhamento do citoesqueleto provocado pelas forças de tensão do fluxo (meio de cultura) (Figura V.25 b,c) (Partap *et al.* 2010).

Após 3 dias de cultivo, as células apresentam-se nas primeiras camadas abaixo da superfície das amostras (Figura V.25 d, e e f). Devido à alta porosidade do arcabouço e sua natureza fibrosa, as células têm aparente facilidade de penetração em alguns micrômetros na superfície. Entretanto, a colonização do material fica restrita a uma profundidade em torno de 200µm.

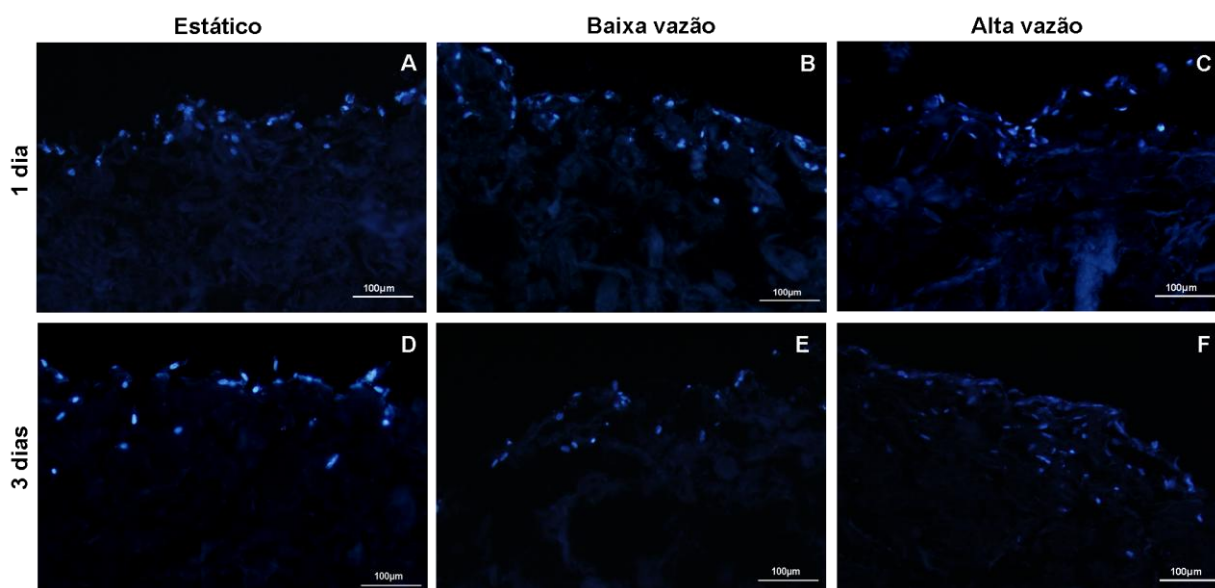


Figura V.25: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 1 e 3 dias de cultivo sob diferentes condições.

A partir do 7º dia de cultivo, observa-se um fenômeno diferente em relação à condição estática. Limitadas pelos gradientes de oxigênio e nutrientes, as células retomam o posicionamento na superfície do arcabouço, iniciando a formação de uma estrutura de camada celular estratificada (Figura V.26 a). Após a segunda semana, essa camada é melhor visualizada (Figura V.26 d). Segundo Oyajobi *et al.* (1999), em placas de cultura tradicionais, as células Stro+1A formam agregados 3-D com presença de matriz extracelular mineralizada (marcada por Von Kossa). Células periféricas continuariam o processo de renovação celular.

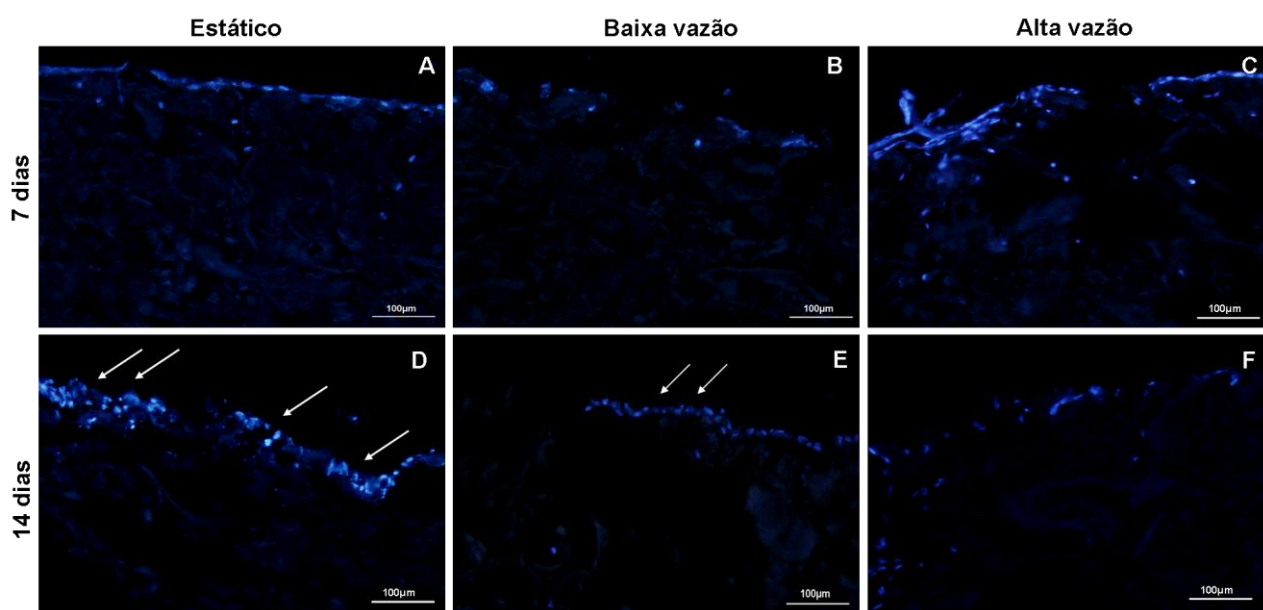


Figura V.26: Seções histológicas do arcabouço composto HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 7 e 14 dias de cultivo sob diferentes condições.

O mesmo comportamento é observado para as amostras submetidas ao sistema dinâmico de baixa vazão (Figura V.26 b, e). Provavelmente, os aportes de oxigênio e nutrientes não são suficientes para promover a migração em direção ao interior da amostra. Adicionalmente, uma diminuição da quantidade de núcleos marcados pode ser reparada a partir da segunda semana (imagem não mostrada). Yeatts & Fisher (2011b) afirmam que, quando as concentrações de oxigênio e nutrientes no interior do material estão abaixo do mínimo necessário, ocorre o processo de morte celular.

Um fato interessante para ser comparado a esse sistema de cultivo é que essa diminuição não é claramente vista na condição estática. A partir de 14 dias, as células submetidas à baixa vazão experimentam uma condição de cultivo com efeito negativo ao seu desenvolvimento e proliferação. A Figura V.27 detalha a morfologia de um núcleo celular submetido à condição dinâmica de baixa vazão. Nota-se que o volume nuclear é maior que os outros núcleos observados na mesma amostra. Em seu interior a cromatina apresenta-se altamente condensada. Apesar da ausência de marcadores específicos de apoptose, presume-se que esse fenômeno pode estar alterando a morfologia celular.

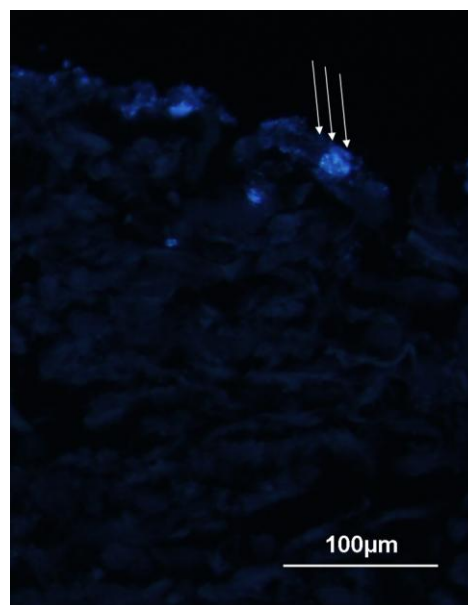


Figura V.27: Micrografia do núcleo das células Stro+1A marcadas por DAPI cultivadas sob o arcabouço HA/Col em sistema dinâmico de baixa vazão após 7 dias. Detalhe para a cromatina altamente condensada no interior do núcleo (setas).

Rauh *et al.* (2011) verificaram um substancial processo de morte celular no cultivo dinâmico (1,0 ml/min) em células MC3T3-E1, cultivadas em arcabouços de osso trabecular. A vazão do fluxo afetou a morfologia, interação célula-célula, produção e composição da matriz extracelular e a expressão de genes osteogênicos.

A partir da segunda semana em condição dinâmica de alta vazão, os núcleos celulares apresentam-se dispersos no arcabouço, assim como visto nos resultados de Bjerre *et al.* (2008). Em seus experimentos, as células osteoblásticas apresentaram um

alto nível de processos de adesão e migração no arcabouço poroso provocado pela passagem do fluxo na superfície do material. As células permanecem proliferando na superfície, com penetração em maiores profundidades no interior da amostra (Figura V.26 c e f).

Aos 21 dias de cultivo (Figura V.28), as células em condição estática mantêm a camada na superfície do arcabouço, sem migração celular em direção ao interior da matriz 3-D (Figura V.28 a). Em cultivo dinâmico em baixa vazão, a presença de núcleos marcados torna-se um trabalho de difícil visualização. Quase não se observou células cultivadas nas amostras.

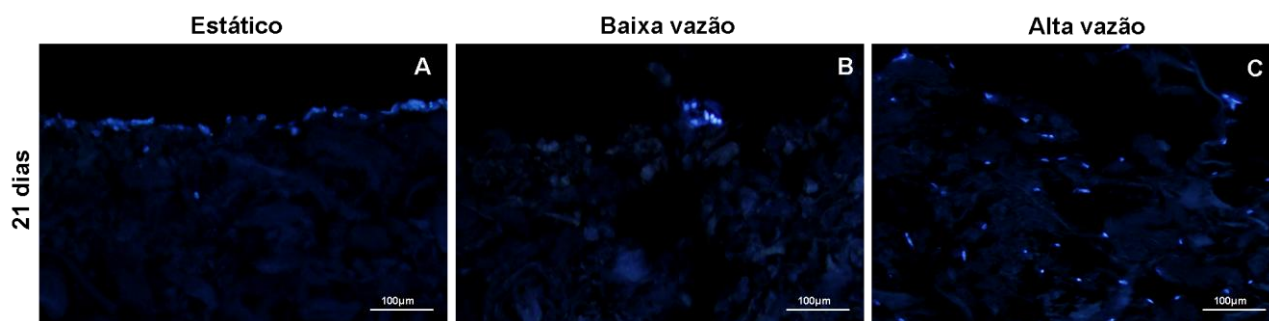


Figura V.28: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 21 dias de cultivo sob diferentes condições.

Em cultivo dinâmico de alta vazão, as seções histológicas revelam a intensa migração celular e colonização do material pelas células Stro+1A (Figura V.28 c). Entretanto, essa migração celular não se dá de maneira homogênea através da amostra. A heterogeneidade do cultivo dinâmico já foi observado anteriormente por diversos trabalhos do grupo de Bjerre *et al.* (2008).

A migração celular pode ter sido influenciada por mudanças na porosidade das amostras. Segundo Liu *et al.* (2009), a hidratação do material em meio de cultura pode levar a expansão de 50-100%, resultando em poros de maiores dimensões.

A Figura V.29 mostra que existiram variações tênues nas porosidades dos arcabouços submetidos aos sistemas de cultivo. Porém, a porosidade não é fator determinante para a migração, visto que os resultados para o cultivo dinâmico de baixa

vazão variam sem resultar numa colonização do material. O gráfico mostra que por volta do 7º dia de cultivo sob alta vazão, houve um aumento da porosidade.

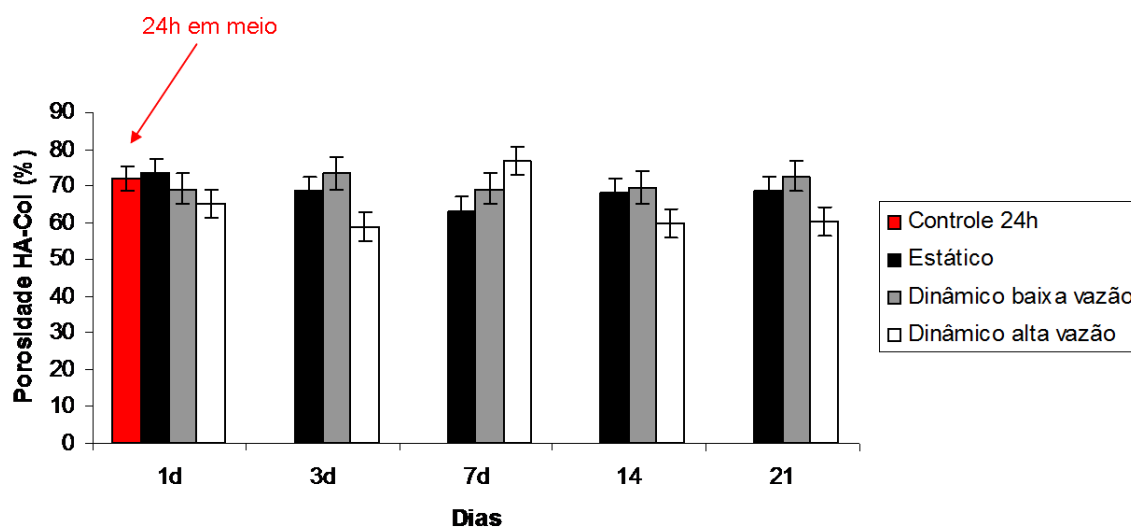


Figura V.29: Porosidade do arcabouço composto HA/Col submetido às condições de cultivo: estático, dinâmica baixa e alta vazão. Em vermelho, porosidade do composto após 24 horas imerso em meio de cultura.

Diferentes fatores parecem atuar conjuntamente na migração celular e colonização do arcabouço 3-D. Seções histológicas de diferentes pontos das amostras foram analisadas (Figura V.30). De maneira geral, em todas as amostras submetidas ao sistema dinâmico, é encontrado um maior número de núcleos marcados por DAPI nas regiões periféricas que nas regiões centrais.

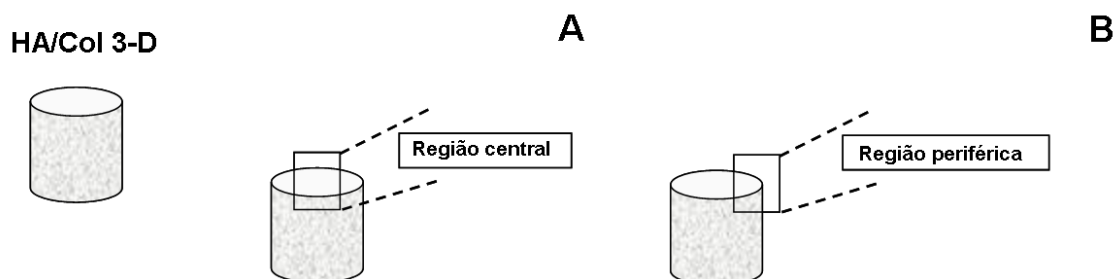


Figura V.30: Diagrama das seções observadas do arcabouço composto HA/Col colonizado pelas células Stro+1A sob condição dinâmica.

A Figura V.31 evidencia que as condições de cultivo na região central e periférica das amostras submetidas aos sistemas dinâmicos não são as mesmas. Jaasma *et al.* (2008) validaram que o cultivo em biorreatores de perfusão apresentam diferenças importantes na passagem do meio de cultura nas superfícies das amostras. Em seus resultados, diferenças entre regiões centrais e periféricas também foram observadas.

Contrariamente aos resultados encontrados pelo grupo de Uemura *et al.* (2003), a região central da amostra submetida ao sistema de cultivo em baixa vazão (Figura V.31 a) apresenta baixa quantidade de núcleos marcados; enquanto a região periférica tem uma expressiva quantidade de células (Figura V.31 b). Esse perfil foi encontrado em todas as amostras, seja de baixa ou alta vazão. As forças de cisalhamento presentes na periferia aumentariam a proliferação de osteoblastos humanos por via ERK-dependente, entre outros segundo Bjerre *et al.* (2008).

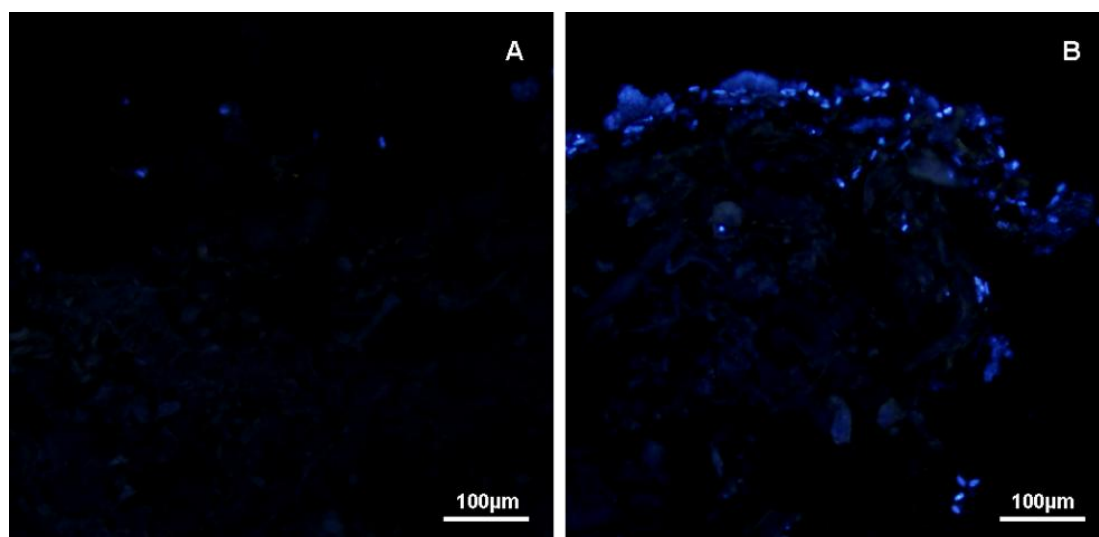


Figura V.31: Seções histológicas do arcabouço composto HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 21 dias de cultivo sob sistema dinâmico em baixa vazão. Em (A), detalhe da região central da amostra e, em (B), da região periférica.

Atualmente, dois tipos de biorreatores em perfusão podem ser encontrados: de perfusão direta ou indireta. Os biorreatores utilizados neste trabalho são classificados como perfusão indireta, pois as amostras não estão hermeticamente instaladas. Logo, os movimentos realizados pelo fluido no interior do biorreator e as forças de cisalhamento presentes são influenciados pela posição espacial das amostras na câmara, pelas

velocidades rotacionais e pela viscosidade do fluido (Kinney *et al.*, 2011). No interior de biorreatores, o fluido (meio de cultivo) em movimento se depara com várias superfícies e objetos, resultando na mudança de direção do movimento para regiões de mais fácil escoamento. Neste caso, as regiões periféricas das amostras no interior da câmara. As forças de cisalhamento e a velocidade do fluido aumentam próximas às paredes da câmara (Kinney *et al.*, 2011).

Forças relacionadas ao movimento do meio de cultivo podem atuar diferentemente em relação à posição da célula na amostra (Bancroft *et al.*, 2003). O impacto da hidrodinâmica aparece: na agregação celular (cinética e tamanho); no metabolismo celular (viabilidade, transporte e proliferação); e no fenótipo celular (diferenciação e funções). Evidentemente, um único parâmetro não atua nas atividades celulares.

Na Figura V.32, o diagrama demonstra um dos movimentos realizados pelo meio de cultivo. Forças de cisalhamento perpendiculares são encontradas na face superior da amostra, enquanto que na periferia, essas forças tornam-se tangentes, se desmembrando em diferentes direções (Figura V.32 c). Provavelmente, a ausência de células nas regiões centrais pode estar relacionada com um conjunto de fatores relacionados a essas forças atuantes (Zhang *et al.*, 2009).

Note que o líquido provavelmente escoar pela lateral das amostras, sem forçar a penetração das células em direção ao centro do arcabouço (Figura V.32 b). Uma vez na periferia, as correntes de convecção podem carregar consigo uma maior concentração de oxigênio e nutrientes, removendo excretas e favorecendo a proliferação celular e colonização do arcabouço 3-D (Yeatts & Fisher, 2011). Segundo David *et al.* (2011), a pressão e força de cisalhamento, e outros estímulos mecânicos, dirige a proliferação e diferenciação de células osteogênicas.

Além disso, estruturalmente, o arcabouço compósito pode se tornar mais poroso nessa região, com a disponibilidade de fibras mais livres e poros de dimensões maiores. A porosidade e o microambiente do arcabouço determinam o comportamento local, resultando em um discreto impacto nas células (David *et al.*, 2011). A arquitetura de arcabouços com organização randômica de suas fibras provoca uma alta variação dos

efeitos das forças de cisalhamento no interior de biorreatores. Uma porosidade uniforme e bem determinada pode otimizar as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade (Martin *et al.*, 2004).

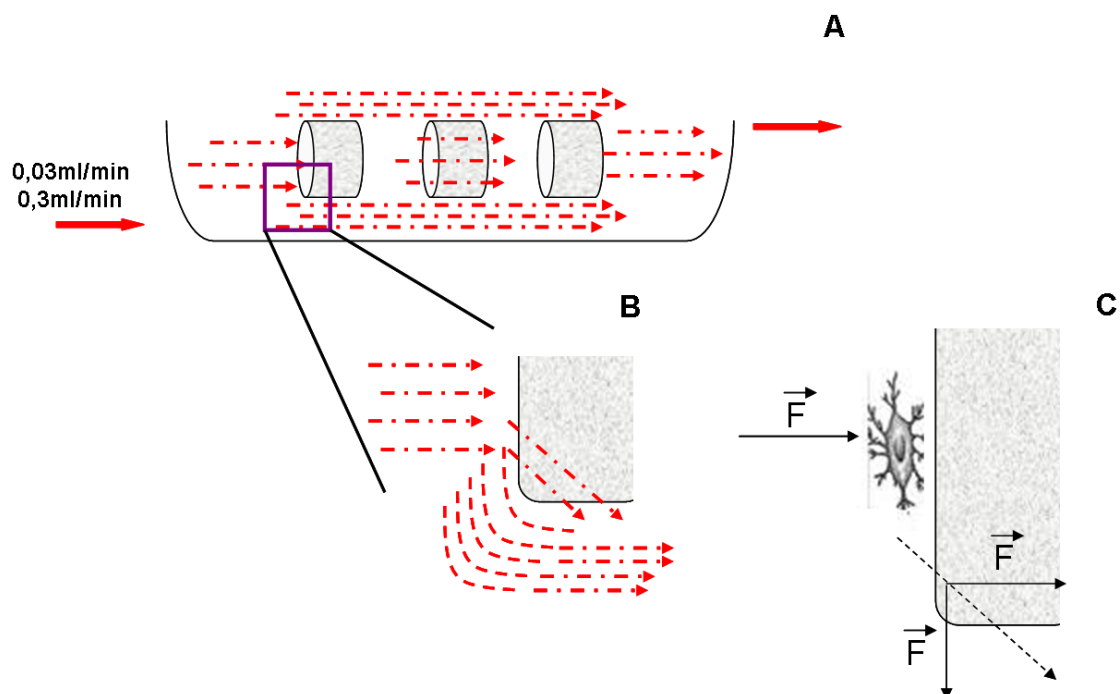


Figura V.32: Diagrama das forças atuantes na superfície do arcabouço composto HA/Col submetido ao sistema dinâmico.

Apesar de inúmeros trabalhos mostrarem que os efeitos do condicionamento mecânico podem aumentar as propriedades estruturais e funcionais dos biomateriais, pouco é conhecido sobre as forças mecânicas específicas ou seus regimes de aplicação (magnitude, frequência, contínuo ou intermitente, ciclos), que são estímulos para um tecido em particular (Martin *et al.*, 2004).

Provavelmente influenciadas pelos movimentos do fluxo contínuo de meio em alta vazão, as células migram e aderem-se em todas as superfícies do arcabouço 3-D. A Figura V.33 representa as faces das amostras observadas, submetidas a 14 dias em sistema dinâmico de alta vazão.

Adicionalmente à capacidade de colonizar o interior do arcabouço 3-D ao longo de 21 dias em sistema de cultivo dinâmico de alta vazão, as células Stro+1A comportam-se como observado na condição estática. De maneira geral, as células

aderem-se nas superfícies das amostras formando uma estrutura em camada estratificada (Figura V.34). Diferentemente dos resultados observados nas micrografias das Figuras V. 25, 26 e 28 a e d (condição estática), as células não se limitaram à face superior das amostras.

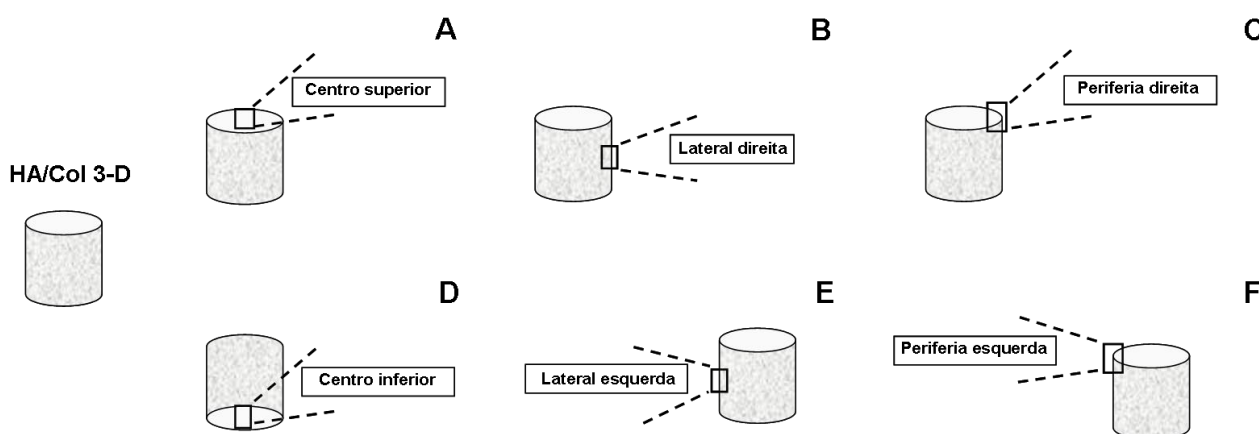


Figura V.33: Diagrama das seções observadas na colonização periférica do arcabouço composto HA/Col por células Stro+1A sob sistema dinâmico de alta vazão após 21 dias.

Os resultados apresentados na Figura V.34 evidenciam que, iniciada a adesão celular na face superior imediatamente em contato as células durante o processo de inoculação, as células podem migrar e aderir em todo arcabouço. Após 2 semanas, um alto número de células migra da face superior da amostra (Figura V.34 a), passando pelas periferias (Figura V.34 c, f), colonizando as laterais esquerda e direita (Figura V.34 b,e), até atingirem a face inferior da amostra (Figura V.34 d).

Progressivamente ocorre a formação de uma camada celular fina e uniforme pelas células nas superfícies externas do arcabouço impedindo a transferência de massa entre o interior e exterior da mesma amostra (David *et al.*, 2011).

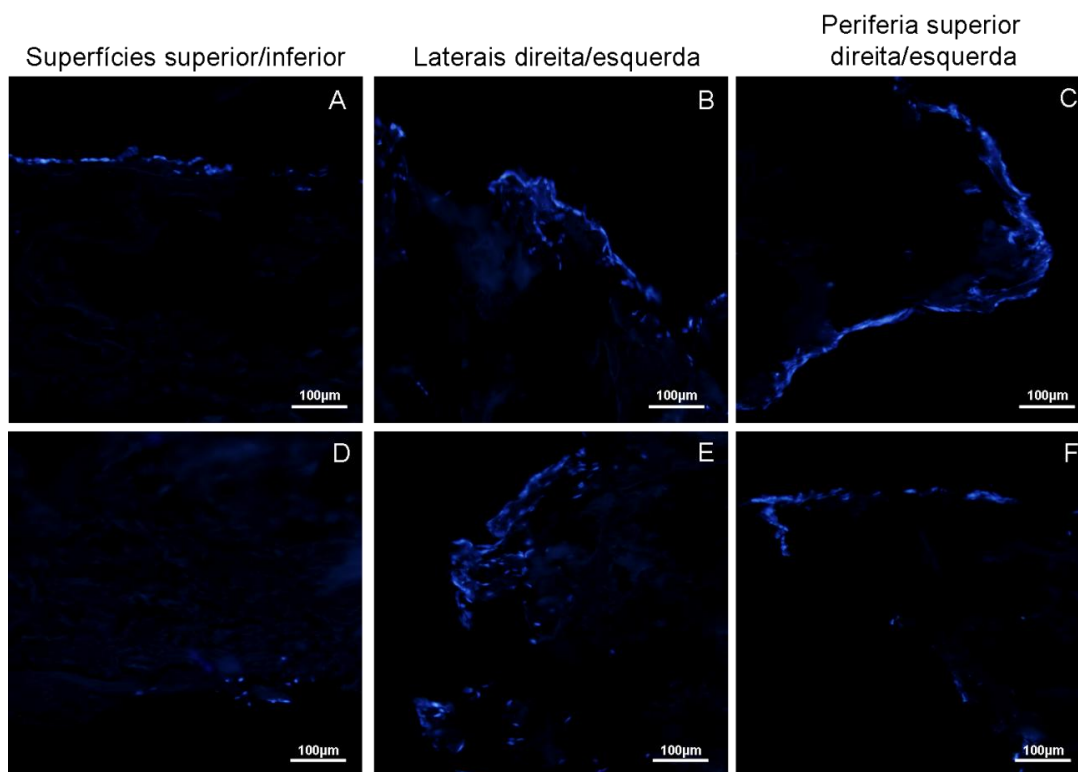


Figura V.34: Seções histológicas do arcabouço compósito HA/Col com núcleos das células Stro+1A marcados por DAPI. Imagens correspondentes a 14 dias de cultivo sob sistema dinâmico em alta vazão. Em (A e D), detalhe da região central da amostra na superfície superior e inferior; em (B e E), detalhe das laterais da amostra; e em (C e F), detalhes da região periférica na superfície superior.

V.6.6- Diferenciação celular:

A diferenciação celular foi verificada através da concentração de três moléculas envolvidas ao processo: a enzima fosfatase alcalina (FA), a proteína osteocalcina (OC) e a proteína pró-colágeno I (PIP). As amostras e as alíquotas de meio foram analisadas ao longo dos 21 dias de cultivo sob as diferentes condições propostas.

Os resultados são apresentados para cada sistema e condição (estático, dinâmico baixa e alta vazão). Apesar das células estarem em contato com o mesmo material, preferiu-se a apresentação dos resultados separadamente. Para os resultados da FA, as análises foram realizadas nas próprias amostras, com a lise das células. Entretanto, para as análises de OC e PIP, alíquotas do meio de cultivo foram recuperadas. Nas amostras

em cultivo dinâmico, a passagem constante de meio de cultivo provocou a diluição das proteínas em questão (Yeatts & Fisher, 2011b).

Todos os resultados foram calibrados para serem submetidos à comparação. Os valores sofreram adequação em relação: ao número de células (ou absorbância referente), aos volumes diários passados pelas amostras e o tempo de cultivo. É evidente que, para os cultivos submetidos ao sistema dinâmico, um possível erro esteja incorporado aos resultados, visto que essas moléculas foram altamente diluídas. Adicionalmente, para concentrações muito diluídas, um efeito de “*threshold*” dos kits utilizados pode ter causado um aumento nos resultados em questão.

As tensões de cisalhamento provocadas pela passagem do fluido são suficientes para a indução da diferenciação osteoblástica, mesmo em culturas sem o acréscimo de dexametasona (Yeatts & Fisher, 2011b; Liao *et al.*, 2008). Em atuação conjunta, os estímulos provocados pela adição de dexametasona e pela perfusão produzem um efeito sinérgico na diferenciação osteogênica em células mesenquimais de ratos. Adicionalmente, os efeitos de íons Ca^{+2} também parecem influenciar esse processo (Liao *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2009) observaram um significativo aumento na proliferação, distribuição celular e diferenciação osteogênica *in-vitro* com a utilização de biorreatores. As tensões de cisalhamento estimulam a proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos por via kinase-dependente, entre outros padrões (Rauh *et al.*, 2011).

Segundo Fromigué *et al.* (1997), células estromais da medula são capazes de produzir FA, OC e PIP; a utilização de dexametasona estimula esses marcadores em curtos períodos de cultura. Entretanto, para uma completa diferenciação, fatores hormonais e locais atuam diferentemente e em vários momentos do processo.

Estudos dos grupos de Uemura *et al.* (2007) e Wang *et al.* (2008) utilizando arcabouços 3-D compostos por β -TCP em biorreatores da empresa Minucell[®], demonstraram aumento da expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina em

osteoblastos de rato. Entretanto, a determinação da vazão de fluxo ótima para cada biorreator e arcabouço utilizado é recomendada (Rauh *et al.*, 2011).

Vebersax *et al.* (2008) cultivaram células mesenquimais humanas em arcabouços baseados em colágeno. Entre os resultados positivos em relação à proliferação e diferenciação celular, os autores chamam a atenção para a degradação da matriz 3-D uma vez submetida às forças de cisalhamento no interior do biorreator.

V.6.6.1- Fosfatase alcalina (FA):

Os resultados da absorbância da FA nas amostras cultivadas sob os diferentes sistemas estão apresentados na Figura V.35. Nas amostras submetidas à condição estática (Figura V.35 a), ocorre o aumento significativo da expressão de fosfatase alcalina pelas células Stro+1A no 21º dia. Entretanto, os resultados anteriores (MEV) evidenciaram uma diferenciação e produção de matriz iniciada anteriormente, no 7º dia. Zhang *et al.* (2010) também observam o aumento da enzima FA por volta do 20º dia de cultivo em células estromais.

O perfil de expressão de FA no sistema dinâmico de baixa vazão é semelhante aos da condição estática, com o aumento significativo em 21 dias (Figura V.35 b). A concentração de FA é medida nas amostras, sem diluição no meio de cultivo. Portanto, as células, mesmo que não numerosas, secretam a enzima progressivamente ao longo dos 21 dias.

Em sistema dinâmico de alta vazão, as células apresentaram baixas concentrações de FA, mesmo quando comparadas às da condição estática (Figura V.35 c). Não houve diferenças significativas entre os tempos de cultivo.

Apesar da dexametasona ser um importante indutor de diferenciação osteogênica e induzir a proliferação celular, a atividade dessa enzima não promove o fenótipo osteogênico completo (Fromigué *et al.*, 1997). Oyajobi *et al.* (1999) e Kartsogiannis & Ng (2004) obtiveram uma baixa expressão de fosfatase alcalina pelas células Stro+1A em cultivo em placas de cultura.

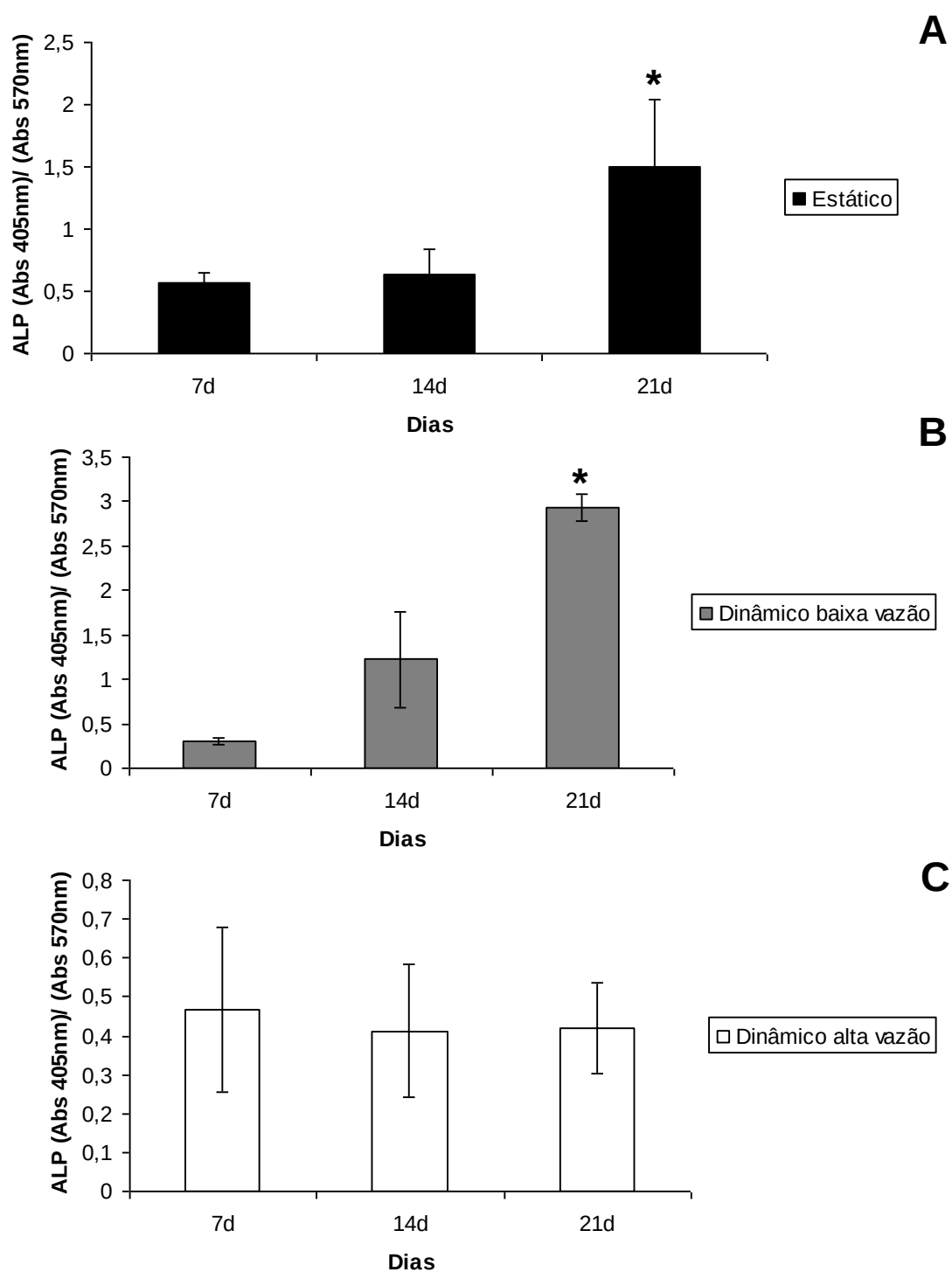


Figura V.35: Concentração de fosfatase alcalina expressa por células Stro+1A cultivadas sob arcabouço compósito HA/Col sob diferentes condições e tempos de cultivo. Em (A), condição estática, e em (B e C), sistema dinâmico de baixa e alta vazão, respectivamente. Diferenças significativas entre os tempos de cultivo (*). $p < 0.05$.

Osteocalcina (OC):

As concentrações obtidas para a proteína OC estão apresentadas na Figura V.36. A utilização de dexametasona afeta negativamente a produção de OC (Liao *et al.* 2008). Entretanto, a nanoestrutura da matriz compósita parece estimular a produção de FA.

A utilização de dexametasona em culturas de células estromais provoca uma inibição na produção de OC em até 3-4 semanas e um aumento na produção de FA. Fromigué *et al.* (1997) verificaram uma diminuição significativa nos níveis de mRNA de OC em até 3 semanas. Geralmente, os maiores níveis de secreção de OC são encontrados ao final do processo de diferenciação (3-4 semanas) (Declercq *et al.*, 2005).

Em condição estática, ocorre o aumento não significativo na concentração de OC em meio de cultura ao longo dos 21 dias de cultivo (Figura V.36 a). Para o sistema dinâmico em baixa vazão, ocorre um pico de OC no meio de cultivo no 14º dia (Figura V.36 b). Todas as diferenças entre os tempos são significativas. Um acentuado aumento na segunda semana foi observado.

Em condição dinâmica de alta vazão, a concentração mais elevada de OC foi verificada aos 7 dias de cultivo, com queda significativa nas duas semanas posteriores (Figura V.36 c).

O estímulo do fluxo constante aumenta significativamente as concentrações observadas. Os resultados obtidos para ambas as vazões são significativamente maiores que os encontrados em condição estática. Apesar da alta diluição à qual as amostras foram submetidas nesses sistemas, a mudança de ambiente, com um transporte de massa constante, provocou o aumento da expressão e secreção dessa proteína para o meio de cultivo.

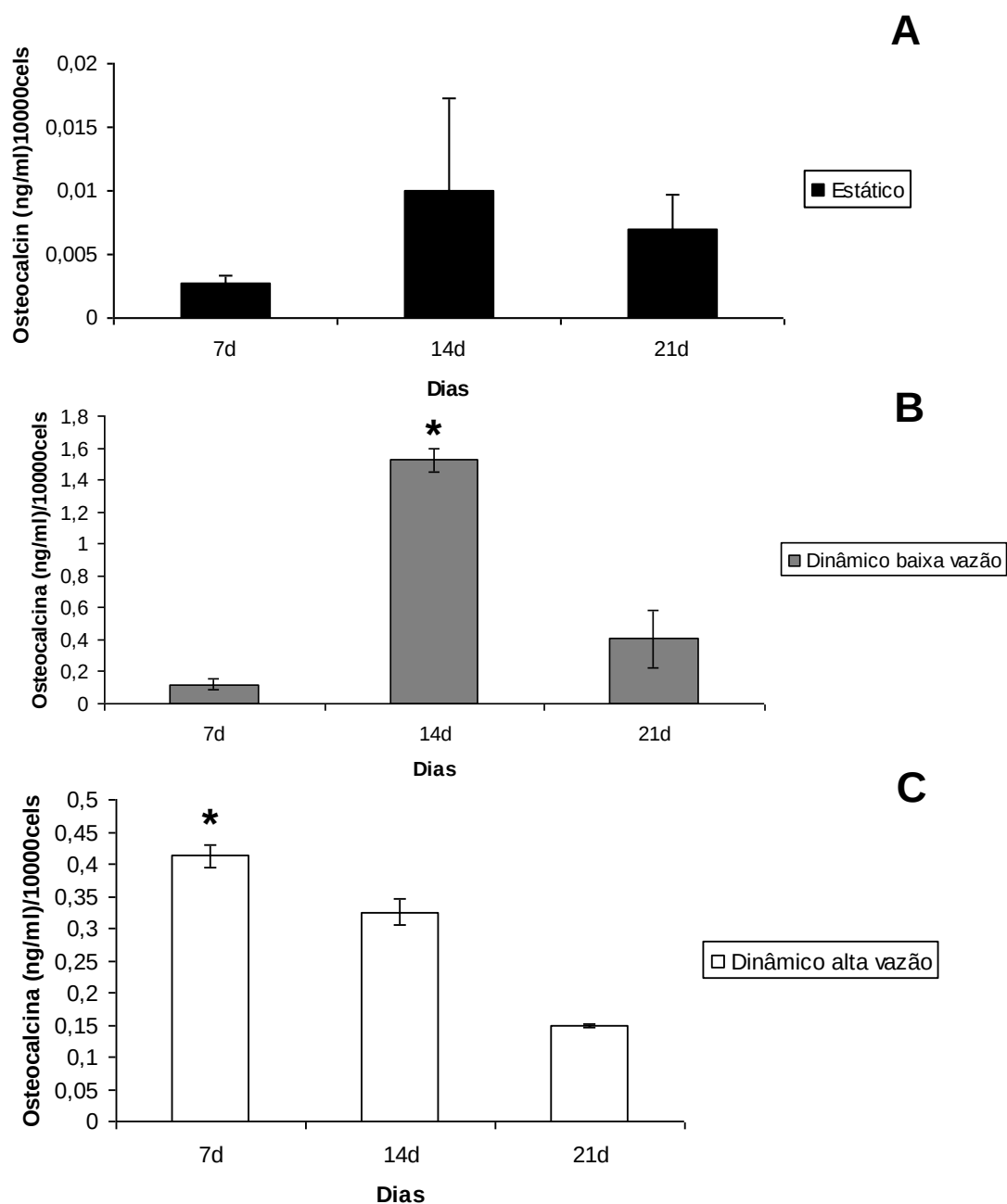


Figura V.36: Concentração de osteocalcina produzida por células Stro+1A cultivadas sob arcabouço compósito HA/Col sob diferentes condições e tempos de cultura. Em (A), cultivo estático, em (B e C), sistema dinâmico de baixa e alta vazão. Diferenças significativas entre os tempos de cultivo (*). $p < 0.05$.

Pró-colágeno I (PIP):

Os resultados referentes às concentrações de PIP estão apresentados na Figura V.37. A produção desse peptídeo pode ser considerada um indício da produção de

matriz extracelular por parte das células cultivadas. Apesar da detecção da secreção de PIP, a distinção de novas moléculas apresenta dificuldades devido à natureza colagênica da própria matriz (Dawson *et al.*, 2008).

Em condição estática, ocorre o aumento da produção de PIP ao longo dos 21 dias, sendo significativo em relação aos 7º e 14º dias (Figura V.37 a). A produção de colágeno pode ser corroborada com as imagens de MEV (Figuras V. 25 e 26), onde células Stro+1A provavelmente iniciam a produção de matriz extracelular. Uma vez aderidas na superfície do arcabouço compósito, as células proliferam, diferenciam e iniciam o processo de produção da matriz. Entretanto, as concentrações observadas são significativamente inferiores aos encontrados em ambos os cultivos dinâmicos. O sistema de fluxo constante parece ser responsável pelo aumento da concentração de PIP pelas células Stro+1A.

O cultivo sob sistema dinâmico em baixa vazão apresenta um pico de concentração de PIP em 14 dias. O aumento em relação ao 7º dia e a queda aos 21 dias são estatisticamente significantes (Figura V.37 b). É difícil justificar a produção de PIP pelas células nesse sistema. Na maioria dos resultados, observou-se uma diminuição no metabolismo celular e na quantidade de núcleos observados. A limitação do baixo número de células pode acarretar em erros de cálculo. Além disso, esse tipo sistema (aberto) resulta em um elevado fator de diluição da proteína no meio de cultivo coletado.

O sistema dinâmico em alta vazão apresenta concentrações inferiores aos da baixa vazão, mas ainda significativamente maiores que as do cultivo estático (Figura V.37 c).

Fromigué *et al.* (1997) obteve uma produção de colágeno do tipo I transiente em cultura de células estromais da medula óssea. A produção desse marcador atinge seu ápice a partir da segunda semana, com queda ao longo do tempo.

Resultados do grupo de Partap *et al.* (2010) mostram um decréscimo significativo na expressão de colágeno tipo-I por osteoblastos cultivados em compósito baseado em colágeno-glicosaminoglicanas após 14 dias de cultivo em ambiente

dinâmico comparados com a condição estática. Seus resultados sugerem que a cultura em biorreatores pode provocar uma negativa regulação desse gene ou acelerar a maturação dos osteoblastos.

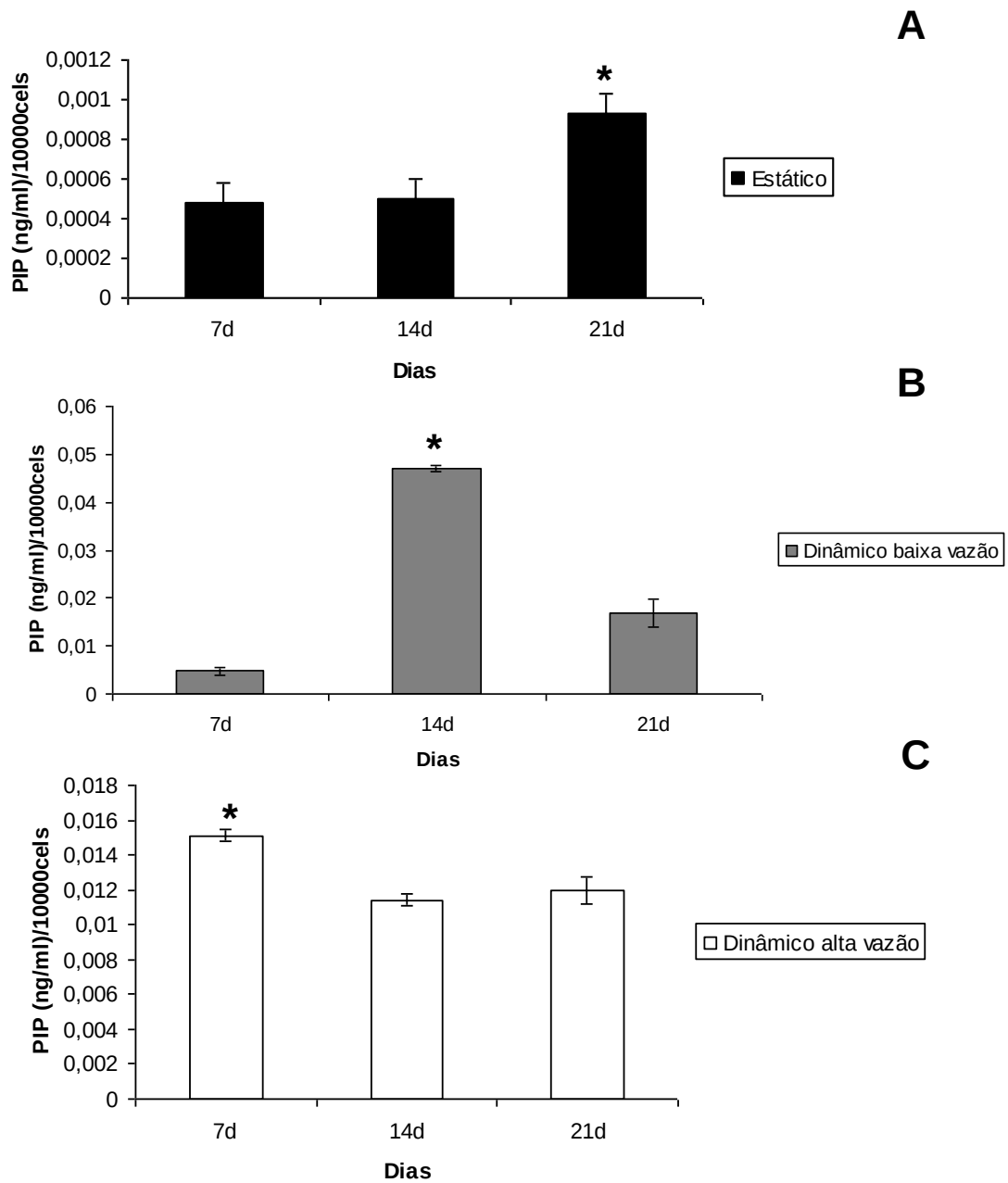


Figura V.37: Concentração de pró-colágeno do tipo I (PIP) produzida por células Stro+1A cultivadas sob arcabouço compósito HA/Col sob diferentes condições e tempos de cultura. Em (A), cultivo estático, em (B e C), sistema dinâmico de baixa e alta vazão, respectivamente. Diferenças significativas entre os tempos de cultivo (*). $p < 0.05$.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O arcabouço compósito 3-D foi fabricado através da síntese do mineral concomitante à agregação das fibrilas de colágeno (Col). Durante a reação, observou-se que as fibras formam estruturas macroscópicas, com ausência de pó livre em solução. Através dos difratogramas e espectros de Infravermelho, pode-se afirmar que a fase mineral é constituída por uma hidroxiapatita (HA) carbonatada do tipo-B e que as cadeias poliméricas do Col estão presentes e foram preservadas sob condições de síntese (38°C e pH=9).

A presença de estruturas orgânicas influencia a formação mineral. A baixa cristalinidade da HA formada permite a degradação uniforme do arcabouço formado após sua aplicação no sítio da lesão.

A estrutura compósita tridimensional (3-D) resultante é altamente porosa (~60%) com poros de tamanho da ordem de 280µm distribuídos de maneira heterogênea por toda a estrutura do material, assemelhando-o a uma esponja porosa. Essa aparência moldável é pertinente aos sítios de aplicações aos quais o material pode ser empregado: enxertos ósseos para reconstrução crânio-facial, por exemplo.

A estequiometria do compósito HA:Col obtida (60:40) foi semelhante à originalmente calculada (50:50). A organização fibrilar apresentou duas configurações: uma com fibras desorganizadas e de fácil degradação e outra com fibras mais organizadas impregnadas de nanocristais de Col (estruturas provavelmente melhor arrançadas com ligações cruzadas) determinando o perfil de resistência térmica com duas faixas de temperatura (além da faixa de evaporação da água).

A deposição mineral das fibras foi observada através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. As fibras de Col apresentaram-se recobertas por policristais de HA. Através das micrografias, os cristais nanométricos (~45nm de comprimento e 5nm de largura) estão embebidos na matriz orgânica com distribuição heterogênea e sem orientação definida. Entretanto, em algumas regiões observadas, os cristais organizam-se em grupos (“clusters”) e apresentam seu eixo c paralelo às fibras de colágeno.

O processo de mineralização pode ser otimizado através do controle da nucleação mineral durante a síntese. A utilização de fibras de Col altamente carregadas (Col aniônico), a presença de moléculas controladoras (como a decorina), etc., podem homogeneizar a deposição mineral, resultando em estruturas orgânico-inorgânicas mais homogêneas.

As ligações formadas entre o agente reticulador glutaraldeído (GTA) e as fibras de Col durante o processo de reticulação são estáveis e contribuem para a ausência de citotoxicidade do material. A reticulação resultou em uma compactação das estruturas orgânicas fibrilares mineralizadas e da resistência à degradação sob condições de cultivo (estufa úmida à 38°C).

Adicionalmente, não houve liberação de resíduos ou pequenas cadeias do GTA para o meio, mesmo com o emprego do sistema dinâmico de fluxo constante. O arcabouço 3-D não perdeu sua macroestrutura quando cultivado em condição estática, sistema dinâmico de baixa (0,03ml/min) e alta vazão (0,3ml/min). A manutenção da estrutura 3-D da matriz no interior de biorreatores demonstra que estas são capazes: de resistir às intensas forças de cisalhamento provocadas pela passagem do fluxo; de servir como arcabouço temporário para o desenvolvimento dos processos biológicos que irão levar ao restabelecimento da saúde do indivíduo.

A acessibilidade às regiões de adesão celular na superfície das fibras foi demonstrada através da coloração de Picrosirius. Células osteoprogenitoras estromais (Stro+1A) mostraram-se, em sua maior parte, aderidas a partir de 6 horas de contato, com exibição de uma morfologia fibroblastóide ao final da nona hora.

A viabilidade celular até 21 dias é diferente para cada um dos três sistemas de cultivo propostos. Para os sete primeiros dias, as células submetidas aos sistemas dinâmicos apresentaram-se mais ativas metabolicamente que as outras submetidas ao cultivo estático. O aumento de transporte de massa, nutrientes e oxigênio e a remoção de excretas podem ter contribuído significativamente para esse resultado. Em cultura estática, a viabilidade celular é baixa e constante. Em cultivo dinâmico de baixa vazão, a viabilidade celular atinge seu pico ao 7º dia, tendo uma queda importante nos 14º e 21º dias. Em cultivo dinâmico de alta vazão, a viabilidade celular aumenta até 21 dias.

Em sistemas estáticos, as limitações para o aporte de oxigênio e nutrientes são um dos fatores que mais afetam o metabolismo celular. Para estruturas tridimensionais, a difusão do gás e de nutrientes atinge em torno de 200µm, obrigando às células a permanecerem na superfície da estrutura. Neste trabalho, observamos através das imagens histológicas que as células Stro+1A permanecem na superfície do arcabouço formando, ao longo dos 21 dias, uma camada estratificada.

Os resultados para os sistema dinâmico de cultivo, variando a vazão, diferem enormemente após o período de 7 dias. Para o sistema em baixa vazão, a queda da viabilidade pode ser explicada pela morte celular. Nas observações histológicas, constata-se uma diminuição, chegando à ausência, de núcleos celulares marcados por DAPI no material. Um fator considerável para o sucesso da colonização de estruturas 3-D é a capacidade das células migrarem e proliferarem. As sinalizações intercelulares e parácrinas são importantes para o equilíbrio e sobrevivência da cultura. Nota-se que, o baixo número de células e a alta diluição e “lavagem” dos fatores de sinalização, podem ter sido determinantes para o insucesso do cultivo dinâmico em baixa vazão.

Em contrapartida, a influência das forças de cisalhamento na superfície de osteoblastos em seu metabolismo é conhecida. O sistema dinâmico de alta vazão proporciona às células cultivadas na superfície forças de cisalhamento diferentes daquelas de baixa vazão. As células Stro+1A estudadas em alta vazão apresentaram alta viabilidade nos últimos dias de cultivo.

Não apenas as forças as quais as células estão submetidas mas também o aporte de oxigênio e nutrientes em maior intensidade mostra ter grande influência. A distribuição destes elementos no interior das câmaras dos biorreatores resultou em diferenças na viabilidade celular em relação à posição da amostra no interior do biorreator. Para o cultivo em baixa vazão, a posição das amostras no interior das câmaras foi determinante para o metabolismo. Nos 3 primeiros dias, as células cultivadas no arcabouço compósito na primeira posição apresentam um metabolismo significativamente maior que nas outras duas posições. Essa influência não foi observada no cultivo em alta vazão. Provavelmente, a troca de gases e nutrientes nesse

cultivo se dá de maneira intensa e rápida (de uma maneira que neutraliza o efeito da posição do compósito no biorreator).

Morfológicamente as células corroboram os resultados da viabilidade. Nos primeiros 7 dias de todos os sistemas de cultivo, as células apresentam-se bem aderidas, com morfologia fibroblastóide, formando uma rede de células interconectadas, com seus prolongamentos em contato com as fibras mineralizadas da matriz. Nota-se que estruturas minerais começam a aparecer nas células submetidas ao cultivo estático a partir do 3º dia.

A partir do 7º dia, a morfologia das células começam a diferir. A quantidade de células observadas em cultivo dinâmico em baixa vazão diminui e as poucas células observadas apresentam-se ocupando uma superfície menor, com menor quantidade de processos celulares. Aos 21 dias de cultivo, não foram mais observadas células viáveis. Em cultivo dinâmico de alta vazão, as células mantêm-se com morfologia fibroblastóide, com o aparecimento de estruturas secretadas e mineralizadas em sua superfície. Os resultados da concentração de íons cálcio mostram uma intensa adsorção desses pelas células e/ou material empregado.

O tipo de biorreator utilizado permitiu o escoamento de líquido (meio de cultivo) pela lateral das amostras. Para a bioengenharia tecidual e, mais especificamente, para o processo de colonização de matrizes 3-D, um biorreator de perfusão completa seria ideal. Em seu interior, o meio de cultivo seria obrigado a permear todos os poros da estrutura, carregando as células e provocando forças de cisalhamento mais importantes. Entretanto, as propriedades mecânicas das matrizes devem ser ajustadas e mantidas ao longo do tempo de cultivo.

Além de melhores resultados em viabilidade e morfologia, as células Stro+1A submetidas ao cultivo dinâmico em alta vazão mostraram excelente capacidade de migração em direção ao interior do arcabouço tridimensional. Enquanto as células submetidas ao cultivo estático são limitadas pelo gradiente de concentração de oxigênio e nutrientes formado a partir da superfície (resultando numa camada estratificada celular na superfície do arcabouço), as células submetidas à alta vazão penetram no material,

colonizando seu interior. Adicionalmente, foi observada uma migração celular em todas as superfícies das amostras.

As células Stro+1A cultivadas em sistema estático apresentaram aumento significativo da enzima FA e do PIP aos 21 dias de cultivo. Apesar dessa tardia expressão da FA, os resultados para OC e PIP condizem com a bibliografia e com as morfologias apresentadas nas micrografias: uma aparente secreção de matriz extracelular posteriormente mineralizada. Para as células submetidas aos sistemas dinâmicos, verifica-se o pico de FA em 21 dias e os de OC e pró-colágeno I em 14 dias.

Esses resultados podem apresentar limitações devido à grande diluição presente nos sistemas dinâmicos. A utilização de um sistema fechado (com retorno do meio de cultivo; sistema dinâmico em alta vazão) demonstrou-se eficaz. Uma vez que a difusão de oxigênio pode ser realizada através das paredes dos tubos conectores e não se demonstrou um limitante para o crescimento populacional, a concentração de moléculas sinalizadoras pode atuar de maneira importante no comportamento celular.

O arcabouço 3-D constituído por HA e Col mostrou ser capaz de servir de suporte para a adesão, proliferação, migração e diferenciação das células osteoprogenitoras estromais até 21 dias, sob diferentes condições de cultivo. A manutenção da sua estrutura original é importante para o reequilíbrio do sítio de aplicação no organismo humano. Por apresentar estruturalmente uma proteína degradável, a reabsorção do material poderá ser realizada de maneira eficiente e concomitante com a nova deposição de matriz óssea. Ao mesmo tempo, esse tipo de arcabouço poroso poderá permitir a invasão de células endoteliais e posterior formação de vasos sanguíneos.

Em relação ao sistema dinâmico de cultivo no interior de biorreatores muito já se avançou para otimizar a migração celular e colonização. Entretanto, o efeito sinérgico de inúmeras variáveis parece determinar o sucesso/insucesso de um “complexo” proposto para aplicações em bioengenharia tecidual. Foi demonstrado nessa tese que vazões que diferem 10x influem de forma drasticamente diferente no comportamento celular. A partir do 7º dia, duas possíveis vias metabólicas podem ter sido seguidas pelas células Stro+1A: a da morte celular para as células submetidas à baixa vazão; e a

alta atividade metabólica, diferenciação e secreção de matriz para as submetidas à alta vazão.

A diferença no transporte de massa de nutrientes e oxigênio, o aumento da porosidade da matriz, as maiores forças de cisalhamento e o aumento da viabilidade, número de células e sinalizações parácrinas podem ter agido conjuntamente para atingir o resultado obtido.

VII(a). CONCLUSIONS

1. Une matrice composite tridimensionnelle poreuse et malléable a été synthétisée par l'agglomération de fibres de collagènes et la déposition de phosphate de calcium.
2. La phase minérale est constituée d'une hydroxyapatite carbonatée de type B déficiente en calcium déposée sur et entre les fibres de collagène. Les cristaux nanométriques sont présents dans la matrice organique sans orientation apparente.
3. Le processus de réticulation accroît la résistance du composite dans l'environnement de culture. Le composite synthétisé et réticulé n'est pas cytotoxique et aucune libération de glutaraldéhyde n'a été constatée pendant 21 jours de culture.
4. Les fibres de collagènes minéralisées maintiennent leurs propriétés de surfaces tout en permettant l'adhésion cellulaire. Les cellules semblent bien adhérentes avec une morphologie polygonale durant 7 jours quelles que soient les différentes conditions d'immersion (statique, dynamiques à basse et haute vitesse).
5. La viabilité cellulaire est fortement influencée par les systèmes de culture utilisés au cours des 21 jours. En conditions statiques, les cellules présentent une faible viabilité. Dans les systèmes dynamiques, le comportement cellulaire diffère à partir du 7^{ième} jour. Une forte chute de la viabilité et de la quantité de cellule est observée en basse vitesse alors qu'en haute vitesse, une augmentation du nombre de cellule est observée.
6. La position de l'échantillon à l'intérieur du bioréacteur est un facteur déterminant pour la viabilité seulement durant les 3 premiers jours dans le système dynamique à basse vitesse.
7. La morphologie cellulaire corrobore les résultats obtenus pour la viabilité. En basse vitesse, les cellules cultivées disparaissent après le 14^{ième} jour. Néanmoins, dans les conditions statiques et dynamiques haute vitesse, les cellules continuent de bien adhérer et de petites structures minéralisées peuvent être observées à leur surface.

8. La migration cellulaire et la colonisation de la matrice sont bien établies durant les 21 jours de culture dans le système dynamique à haute vitesse. En système statique, une couche continue de cellules se forme à la surface de l'échantillon.
9. À l'intérieur du bioréacteur, les échantillons subissent différentes contraintes dynamiques. Dans les 2 systèmes dynamiques, la région périphérique présente une quantité de cellule plus importante comparée à la région centrale.
10. Le système dynamique à haute vitesse montre les meilleurs résultats pour la culture cellulaire dans une matrice tridimensionnelle. Le complexe « composite+cellules+bioréacteur » à haute vitesse est apte à l'utilisation en bioingénierie.

VII. CONCLUSÕES

1. Através da síntese de fosfato de cálcio com concomitante agregação de fibras de colágeno, foi produzido um arcabouço compósito tridimensional poroso e moldável.
2. Obteve-se como fase mineral uma hidroxiapatita carbonatada do tipo B deficiente em cálcio depositada sobre e entre as fibras de colágeno. Os policristais nanométricos aparecem embebidos na matriz orgânica sem orientação aparente.
3. O processo de reticulação provocou aumento da resistência do arcabouço à degradação em ambiente de cultivo. O arcabouço compósito não é citotóxico. Não foi verificada a liberação de glutaraldeído durante 21 dias sob diferentes condições de cultivo celular.
4. A proporção HA:Col encontrada (60:40) foi similar à teórica (50:50). O arcabouço HA/Col mantém suas propriedades estruturais mesmo após 21 dias de cultivo.
5. O arcabouço formado pelas fibras de colágeno mineralizadas mantém sua disponibilidade à adesão celular. As células apresentam-se bem aderidas e com morfologia fibroblastóide até 7 dias de cultivo em todos os sistemas propostos.
6. A viabilidade celular foi altamente influenciada pelos sistemas de cultivo até 21 dias. Em condição estática, as células apresentam baixa e constante viabilidade. Nos sistemas dinâmicos, o comportamento celular difere a partir do 7º dia, com intensa queda na viabilidade e número de células em sistema dinâmico de baixa vazão (0,03ml/min); e aumento significativo para as células submetidas à alta vazão (0,3ml/min).
7. A posição da amostra no interior do biorreator é um fator determinante para a viabilidade nos primeiros 3 dias no sistema dinâmico de cultivo em baixa vazão.

8. A morfologia celular corrobora os resultados obtidos para a viabilidade. Em baixa vazão ocorre o desaparecimento das células no material a partir do 14º dia. Em contrapartida, para a condição estática e sistema de cultivo em alta vazão, as células continuam a apresentar a morfologia fibroblastóide, com presença de estruturas secretadas mineralizadas em sua superfície.
9. Durante os 21 dias de cultivos nos três sistemas apresentados, observou-se a adsorção de íons cálcio. A presença de células aumenta significativamente a adsorção.
10. A migração celular e colonização do arcabouço ocorreram ao longo dos 21 dias de cultivo em sistema dinâmico de alta vazão. Em condição estática, verifica-se a formação de uma camada estratificada na superfície da amostra.
11. Diferentes comportamentos de migração celular foram visualizados. As regiões periféricas das amostras submetidas aos sistemas dinâmicos mostram-se mais colonizadas que as regiões centrais. Em sistema dinâmico de alta vazão, as células também foram uma camada em torno de toda a amostra.
12. As células Stro+1A apresentam baixas concentrações dos indicadores de diferenciação. Os resultados das análises para o cultivo dinâmico são significativamente maiores que os encontrados no cultivo estático.

VIII- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Controlar a porosidade do arcabouço compósito hidroxiapatita/colágeno (HA/Col);
2. Estudar de maneira mais detalhada o processo mineralização do colágeno;
3. Otimizar o processo de inoculação das células sobre o arcabouço HA/Col;
4. Verificar as diferenças de viabilidade celular em relação à posição das amostras no interior dos biorreatores;
5. Modelar o fluxo no interior do biorreator;
6. Realizar análises de imunohistoquímicas relacionadas à: proliferação, diferenciação e apoptose nas lâminas histológicas do arcabouço compósito HA/Col com cultivo celular sob as diferentes condições de cultivo;
7. Estudar a expressão de genes osteogênicos e a influência dos diferentes sistemas de cultivo sob as células Stro+1A;
8. Estudar os processos de osteointegração e substituição tecidual em testes *in-vivo*;

IX- REFERÊNCIAS

ANSELME, K., 2000; “Osteoblasts Adhesion on Biomaterials”, *Biomaterials*, vol. 21, pp.667-678.

ANSELME, K., BIGERELLE, M., 2006, “Modeling Approach in Cell/Material Interactions Studies”, *Biomaterials*, vol. 27, pp. 1187-1199.

AWAYA, N., RUPERT, K., BRYANT, E., TOROK-STORB, B., 2002; “Failure of Adult Marrow-Derived Stem Cells to Generate Marrow Stroma after Successful Hematopoietic Stem Cell Transplantation”, *Experimental Hematology*, vol. 30, pp. 937-942.

AUBIN, J.E, 1998; “Bone Stem Cells”, *Journal of Cellular Biochemistry Supplements*, vol. 30/31, pp. 73-82.

BAHT G.S., HUNTER, G.K., GOLDBERG, H.A., 2008; “Bone Sialoprotein- Collagen Interaction Promotes Hydroxyapatite Nucleation”, *Matrix Biology*, vol. 27, pp. 600-608.

BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A., 2005; “Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol.15, n.1, pp. 13-21.

BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S., ROBEY, P.G., 2001; “Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology and Potential Applications”, *Stem Cells*, vol. 19, pp. 180-192.

BIGI, A., COJAZZI, G., PANZAVOLTA, S., RUBINI, K., ROVERI, N., 2001; “Mechanical and Thermal Properties of Gelatin Films at Different Degrees of Glutaraldehyde Crosslinking”, *Biomateriais*, vol. 22, pp. 763-768.

BJERRE, L., BUNGER, C.E, KASSEM, M., MYGIND, T., 2008; “Flow Perfusion Culture of Human Mesenchymal Stem Cells on Silicate-Substituted Tricalcium Phosphate Scaffolds”, *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2616-2627.

BOHNER, M., 2000; “Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphates Cements”, *Injury International Journal of the Care of the Injury*, vol. 31, pp. 37-47.

BANCROFT, G.N., SIKAVITSAS, V.I., MIKOS, A.G., 2003; “Design of a Flow Perfusion Bioreactor System for Bone Tissue-Engineering Applications”, *Tissue Engineering*, vol. 9, n.3, pp. 549-554.

CAMPBELL, A. A., 2003, "Bioceramics for implants coatings", *Materials Today*, vol. 26-31.

CAMPOS, D.M., SENA, L.A., SOARES, G.A., 2007; “Effect of Sterilization Method on Physico-Chemical Properties of Collagen-Hydroxyapatite Composite”, XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise.

CARTA CAPITAL, 2009; Mundo Grisalho, por André Siqueira. <http://www.cartacapital.com.br/>, acessado em Junho 2010.

CARVALHO, A.C.C., 2009; “Bioengenharia Tecidual: Uso de Células Tronco na Prática Médica”, publicado em site do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE).

CHANG M.C., KO C-C., DOUGLAS W.H., 2003; “Preparation of Hydroxyapatite-gelatin Nanocomposite”, *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2853-2862.

CHANG, M.C., TANAKA, J., 2002a; “FT-IR Study for Hydroxyapatite/collagen Nanocomposite Cross-linked by Glutaraldehyde”, *Biomaterials*, vol. 23, pp. 4811-4818.

CHANG, M.C., TANAKA, J., 2002b; “XPS Study for the microstructure Development of Hydroxyapatite-collagen Nanocomposites Cross-linked Using Glutaraldehyde”, *Biomaterials*, vol. 23, pp. 3879-3885.

CHARULATHA, V., RAJARAM. A., 2003; “Influence of Different Crosslinking Treatments on the Physical Properties of Collagen Membranes”, *Biomaterials*, vol. 24, pp. 759-767.

CHEUNG, D.T., PERELMAN, N., KO, E.C., NIMNI, M.E., 1985; “Mechanism of Crosslinking of Proteins by Glutaraldehyde III. Reaction with Collagen en Tissues”, *Connective Tissue Research*, vol. 13, pp. 109-115.

COMARCK, D.H, 1991, *Ham Histologia*, 9^o edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.

COSTA, R.C.C., MIGUEL, F.B., ROSA,F.P., 2005; “ estratégias de Bioengenharia Tecidual na Reconstrução Óssea”, *Revista Ciência Médica e Biológica*, vol.4, n.1, pp. 70-76.

CUI, F-Z., LI, Y., GE, J., 2007, “Self-assembly of Mineralized Collagen Composites”, *Materials Science and Engineering*, vol. 57, pp. 1-27.

CUI, W., LI, X., XIE, C., ZHUANG, H., ZHOU, S., WENG, J., 2010; “hydroxyapatite Nucleation and Growth Mechanism on Electrospun Fibers Functionalized with Different Chemical Groups and Their Combinations”, *Biomaterials*, vol. 31, pp. 4620-4629.

DAVID, B., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., OUDINA, K., DEGAT, M.C., DESCHEPPER, M., VIATEAU, V., BENSIDHOUM, M., ODDOU, C., PETITE, H., 2011; “A Perfusion Bioreactor for Engineering Bone Constructs: an In-Vitro and In-Vivo Study”, *Tissue Engineering: Part C*, vol.17, n.5, pp. 505-516.

DAWSON, J.I, WAHL, D.A., LANHAM, S.A., KANCZLER, J.M, CZERNUSZKA, J.T., OREFFO, E.O.C., 2008; “Development of Specific Collagen Scaffolds to Support

the Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells”, *Biomaterials*, vol. 29, pp. 3105-3116.

DECLERCQ, H.A., VERBEECK, R.M.H., DE RIDDER, L.I.F.J.M., SCHACHT, E.H., CORNELISSEN, M.J., 2005; “Calcification as an Indicator of Osteoinductive Capacity of Biomaterials in Osteoblastic Cell Cultures”, *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4964-4974.

DOLATSHAHI-PIROUZ, A., JENSEN, T.H.L., KOLIND, K., BÜNGER, C., KASSEM, M., FOSS, M., BESENBACHER, F., 2011; “Cell shape and spreading of stromal (mesenchymal) stem cells cultured on fibronectin coated gold and hydroxyapatite surfaces”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 84, n.1, pp. 18-25.

DONG, J., UEMURA, T., KOJIMA, H., KIKUCHI, M., TANAKA, J., TATEISHI, T., 2001; “Application of Low-pressure System to Sustain In-Vivo Bone Formation in Osteoblast/Porous Hydroxyapatite Composite”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 17, pp. 37-43.

DOROZHUKIN, S., 2007; “Calcium Orthophosphates”, *Journal of Materials Science*, vol. 42, n.4, pp. 1061-1095.

DOS SANTOS, E. A.; FARINA, M.; SOARES, G. A.; ANSELME, K., 2006, "Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cells behavior", In: 20th European Conference on Biomaterials. European Conference on Biomaterials.

ENGEL, E., MICHIARDI, A., NAVARRO, M., LACROIX, D., PLANELL, J.A., 2007; “Nanotechnology in Regenerative Medicine: the Materials Side”, *Trends in Biorechnology*, vol. 26, n.1, pp. 39-47.

ELLIOT, J.C., 1994; “Structure and Chemistry of the Apatite and Other Calcium Orthophosphates”, 1ed. Amsterdam, Elsevier.

FENG, B., WENG, J., YANG, B.C., QU, S.X., ZHANG, X.D., 2004; “Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion”, *Biomaterials*, vol. 25, n.17, pp. 3421-3428.

FICAI, A., ANDRONESCU, E., VOICU, G., GHITULICA, C., FICAI, D., 2010a; “The Influence of Collagen Support and Ionic Species on the Morphology of Collagen/Hydroxyapatite Composite Materials”, *Materials Characterization*, vol. 61, pp. 402-407.

FICAI, A., ANDRONESCU, E., VOICU, G., GHITULICA, C., VASILE, B.S., FICAI, D., TRANDAFIR, V., 2010b; “Self-Assembled Collagen/Hydroxyapatite Composite Materials”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 160, pp. 794-800.

FRIESS, W., 1998; “Collagen – Biomaterial for Drug Delivery¹”, *European Journal of Pharmaceutics*, vol. 45, pp. 113-136.

FRIESS W., LEE, G., 1996. “Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices”, *Biomaterials*, vol. 17, pp. 2289-2294.

FROMIGUÉ, O., MARIE, P.J., LOMRI, A., 1997; “Differential Effects of Transforming Growth Factor β_2 , Dexamethasone and 1,25-Dihydroxyvitamin D on Human Bone Marrow Stromal Cells”, *Cytokine*, vol. 9, n.8, pp. 613-623.

GELINSKY M., WELZEL P.B., SIMON P., BERNHARDT A., KONIG U., 2008; “Porous Three-Dimensional Scaffolds Made of Mineralised Collagen: Preparation and Properties of a Biomimetic Nanocomposite Material For Tissue Engineering of Bone”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 137, pp. 84-96.

GRONTHOS, S., ZANNETTINO, A.C.W, HAY, S.J., SHI, S., GRAVES, S.E., KORTESIDIS, A., SIMMONS, P.J., 2003; “Molecular and Cellular Characterisation of Highly Purified Stromal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow”, *Journal of Cell Science*, vol. 116, pp. 1827-1835.

HARDOUIN, P., ANSELME, K., FLAUTRE, B., BIANCHI, F., BASCOULERGUE, G., BOUXIN, B., 2000; “Ingénierie tissulaire et maladies du squelette”, Rev Rhum, vol. 67, pp. 498-504.

HUTMACHER, D.W., 2000; “Scaffolds in Tissue engineering Bone and Cartilage”, Biomaterials, vol. 21, pp. 2529-2543.

ISO 10993-5 (1999), Biological evaluation of medical devices. “Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods”, International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 10993-12 (1996), Biological evaluation of medical devices. “Part 12: Sample preparation and reference materials”, International Organization for Standardization, Geneva.

ITOH S, KIKUCHI M, KOYAMA Y, TAKAKUDA K, SHINOMIYA K, TANAKA J., 2002; “Development of an Artificial Vertebral Body using a Novel Biomaterial, Hydroxyapatite/Collagen Composite”, Biomaterials, vol. 23, pp. 3919-3926.

JAASMA, M.J., PLUNKETT, N.A., O'BRIEN, F.J., 2008; “Design and Validation of a Dynamic Flow Perfusion Bioreactor for use with Compliant Tissue Engineering Scaffolds”, Journal of Biotechnology, vol. 133, pp. 490-496.

JAYAKRISHNAN A., JAMEELA S.R., 1996; “Glutaraldehyde as a Fixative in Bioprotheses and Drug Delivery Matrices”, Biomaterials, vol. 17, pp. 471-484.

JIANG, B., WU, Z., ZHAO, H., TANG, F., LU, J., WEI, Q., ZHANG, X., 2006; “Electron Beam Irradiation Modification of Collagen Membrane”, Biomaterials, vol. 22, n.1, pp. 15-23.

KALITA, S.J., BHARDWAJ, A., BHATT, H.A., 2006; “Nanocrystalline Calcium Phosphate Ceramics in Biomedical Engineering”, Materials Science and Engineering C, vol. 27, n.3, pp. 441-449.

KANNAN, S., BALAMURUGAN, A., RAJESWARI, S., 2001; "Bio-composites: A Review of Literature", Trends in Biomaterials & Artificial Organs, vol. 14, n.2, pp. 30-36.

KARTSOGIANNIS, V., NG, K.W., 2004; "Cell Lines and Primary Cell Cultures in the Study of Bone Cell Biology", Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 288, pp. 79-102.

KASSEM, M., ABDALLAH, B.M., SAEED, H., 2008; "Osteoblastic Cells: Differentiation and trans-differentiation", Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 473, pp. 183-187.

KIKUCHI, M., SUETSUGU, Y., TANAKA, J., ITOH, S., ICHINOSE, S., SHINOMIYA, K.S., HIRAOKA, Y., MANDAI, Y., NAKATANI, S., 1999; "The biomimetic synthesis and biocompatibility of self-organized hydroxyapatite/collagen composites", Bioceramics, vol. 12, pp. 393-396.

KIKUCHI, M., ITOH, S., ICHINOSE, S., SHINOMIYA, K., TANAKA, J., 2001b; "Self-Organization Mechanism in a Bone-Like Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Synthesized in vitro and its Biological Reaction in vivo", Biomaterials, vol. 22, pp. 1705-1711.

KIKUCHI, M., IKOMA, T., ITOH, S., MATSUMOTO, H.N., KOYAMA, Y., TAKAKUDA, K., SHINOMIYA, K., TANAKA, J., 2004a; "Biomimetic Synthesis of Bone-Like Nanocomposites Using the Self-Organization Mechanism of Hydroxyapatite and Collagen", Composites Science and Technology, vol. 64, pp. 819-825.

KIKUCHI, M., MATSUMOTO, H.N., YAMADA, T., KOYAMA, Y., TAKAKUDA, K., TANAKA, J., 2004b; "Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites", Biomaterials, vol. 25, pp. 63-69.

KIM, K., DEAN, D., LU, A., MIKOS, A.G., FISHER, J.P., 2011; "Early Osteogenic Signal Expression of Rat Bone Marrow Stromal Cells is Influenced by Both

Hydroxyapatite Nanoparticle Content and Initial Cell Seeding Density in Biodegradable Nanocomposite Scaffolds”, *Acta Biomaterialia*, vol. 7, pp. 1249-1264.

KINNEY, M.A., CAROLYN, B.S., SARGENT, Y., MCDEVITT, T.C., 2011; “The Multiparametric Effects of Hydrodynamic Environments on Stem Cell Culture”, *Tissue Engineering: Part B*, vol. 17 (4), pp. 249-262.

LANDIS, W.J., SILVER, F.H, 2002; “The structure and Function of Normally Mineralizing Avian Tendons”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, vol. 133, pp. 1135-1157.

LEGEROS, R.Z., 1994; “Biological and Synthetic Apatites”. In: BROWN, P.N.; CONSTANTZ, B., *Hydroxyapatite and Related Materials*, CRC Press, Boca Raton, pp. 3-28.

LIAO, S., CHAN, C.K., RAMAKRISHNA, S., 2008; “Stem Cells and Biomimetic Materials Strategies for Tissue Engineering”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 28, pp. 1189-1202.

LIU C., 2008; “Biomimetic Synthesis of Collagen/Nano-hydroxyapatite Scaffold for Tissue Engineering”, *Journal of Bionic Engineering Suppl.*, pp. 001-008.

LIU, C., HAN, Z., CZERNUSKA, J.T., 2009; “Gradiente Collagen/hydroxyapatite Composite Scaffold: Development and Characterization”, *Acta Biomaterialia*, vol. 5, pp. 661-669.

LONG, M.W., 2001; “Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells”, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 27, n.3, pp. 677-690.

MARQUES DA SILVA, H., MATEESCU, M., DAMIA C., CHAMPION, E., SOARES, G., ANSELME, K., 2010; “Importance of dynamic culture for evaluating osteoblast activity on dense silicon-substituted hydroxyapatite” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 80, n. 2, pp. 138-144.

MARTIN, I., WENDT, D., HEBERER, M., 2004; “The Role of Bioreactors in Tissue Engineering”, *TRENDS in Biotechnology*, vol. 22, n.2, pp. 80-86.

MCCOY, R., O'BRIEN, F.J., 2010; “Influence of Shear Stress in Perfusion Bioreactor Cultures for the Development of Three-Dimensional Bone Tissue Constructs: A Review”, *Tissue Engineering: part B*, vol. 16, pp. 587-601.

MENEGHINI, C., DALCONI, M.C., NUZZO, S., MOBILIO, S., WENK, R.H., 2003, “Rietveld Refinement on X-Ray Diffraction Patterns of Bioapatite in Human Fetal Bones”, *Biophysical Journal*, v. 84, pp. 2021 – 2029.

NORME FRANÇAISE: NF S 94-066, 1998; “Materiaux pour Implants Chirurgicaux. Détermination Quantitative Du Rapport Ca/P de Phosphates de Calcium”. AFNOR, Premier Tirage, 98-05-F.

OREFFO, R.O.C., TRIFFITT, J.T., 1999; “Future Potentials for Using Osteogenic Stem Cells and Biomaterials in Orthopedics”, *Bone*, vol. 25, n.2, pp. 5S-9S.

OYAJOBI, B.O., LOMRI, A., HOTT, M., MARIE, P.J., 1999; “Isolation and Characterization of Human Clonogenic Osteoblast Progenitors Immunoselected from Fetal Bone Marrow Stroma using STRO-1 Monoclonal Antibody”, *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 14, n.3, pp. 351-361.

PARTAP, S., PLUNKETT, N.A., KELLY, D.J., O'BRIEN, F.J., 2010; “Stimulation of Osteoblasts using Rest Periods During Bioreactor Culture on Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds”, *Journal of Materials Sciences: Materials Methods*, vol. 21, pp. 2325-2330.

PEK, Y.S, GAO, S., MOHAMED ARSHAD, M.S., LECK, K.J., YING, J.Y., 2008; “Porous Collagen-apatite Nanocomposite Foams as Bone Regeneration Scaffolds”, *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4300-4305.

PROVENZANO, P. P., VANDERBY, R.J., 2006; “Collagen Fibril Morphology and Organization: Implications for Force Transmission in Ligament and Tendon”, *Matrix Biology*, vol. 25, pp. 71-84.

RAUH, J., MILAN, F., GUNTHER, K.P., STIEHLER, M., 2011; “Bioreactor Systems for Bone Tissue Engineering”, *Tissue Engineering: Part B*, vol. 17, n.4, pp. 263-280.

RHEE, S.H., SUETSUGU, Y., TANAKA, J., 2001; “Biomimetic Configurational Arrays of Hydroxyapatite Nanocrystals on bio-organics”, *Biomaterials*, vol. 22, pp. 2843-2847.

RODRIGUES, F.T., MARTINS, V.C.A., PLEPIS, A.M.G., 2006; “Comportamento Térmico de Matrizes de Colágeno tipo I Reticuladas com Glutaraldeído”, V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria – V CBRATEC - 2006 - abratec.com.br.

ROSCHGER, P., PASCHALIS, E.P., FRATZL, P., KLAUSHOFER, K., 2008 ; “Bone mineralization density distribution in health and disease”, *Bone*, vol. 42, n. 3, pp. 456-466.

ROSE, F.R.A., OREFFO, R.O.C., 2002; “Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 292, pp. 1-7.

ROUAHI, M.; CHAMPION, E.; HARDOUIN, P.; ANSELME, K., 2006, "Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials", *Biomaterials*, vol. 27, n.14, pp. 2829-2844.

RUIJGROK, J.M., DE WIJN, J.R., BOON, M.E., 1994; “Glutaraldehyde crosslinking of collagen: Effects of time, temperature, concentration and presoaking as measured by shrinkage temperature”, *Clinical Materials*, vol. 17, n. 1, pp. 23-27.

SANTOS, M.H., HENEINE, L.G.D., MANSUR, H.S., 2008; “Synthesis and Characterization of Calcium Phosphate/Collagen Biocomposites doped with Zn^{2+} ”, *Materials Science and Engineering C*, vol. 28, pp. 563-571.

SENA, L.A., CARABALLO, M.M., ROSSI, A.M., SOARES, G.A., 2009; “Synthesis and Characterization of Biocomposites with Different Hydroxyapatite-Collagen Ratios”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, vol., 20, pp. 2395-2400.

SCHARNWEBER, D., BORN, R., FLADE, K., ROESSLER, S., STOELZEL, M., WORCH, H., 2004, "Mineralization Behaviour of Collagen Type I Immobilized on Different Substrates", *Biomaterials*, vol. 25, pp. 2371-2380.

SLÓŠARCZYK, A., PASZKIEWICZ, Z., PALUSZKIEWICZ, C., 2005, "FTIR and XRD Evaluation of Carbonated Hydroxyapatite Powders Synthesized by Wet Methods", *Journal of Molecular Structure*, vol. 744-747, pp. 657-661.

SOGO, Y., ITO, A., KAMO, M., SAKURAI, T., ONUMA, K., ICHINOSE, N., OTSUKA, M., LEGEROS, R.Z., 2004 ; "Hydrolysis and cytocompatibility of zinc-containing α -tricalcium phosphate powder », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 24, n.6–8, pp. 709-715.

SOTOME, S., UEMURA, T., KIKUCHI, M., CHEN, J., ITOH, S., TANAKA, J., TATEISHI, T., SHINOMIYA, K., 2004; "Synthesis and *In-vivo* Evaluation of a Novel Hydroxyapatite/Collagen-Alginate as a Bone Filler and a Drug Delivery Carrier of Bone Morphogenetic Protein", *Materials Science and Engineering C*, vol. 24, pp. 341-347.

SWETHA, M., SAHITHI, K., MOORTHY, A., SRINIVASAN, N., RAMASAMY, K., SELVAMURUGAN, N., 2010; "Biocomposites Containing Natural Polymers and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 47, pp. 1-4.

SUKHODUB, L.F., MOSEKE, C., SUKHODUB, L.B., SULKIO-CLEFF, B., MALEEV, V.Y., SEMENOV, M.A., BEREZNYAK, E.G., BOLDUKH, T.V., 2004; "Collagen-Hydroxyapatite-Water Interactions Investigated by XRD, Piezogravimetry, Infrared and Raman Spectroscopy", *Journal of Molecular Structure*, vol. 704, vol. 53-58.

TARE, R.S., BABISTER, J.C., KANCZLER, J., OREFFO, R.O.C., 2008; "Skeletal Stem Cells: Phenotype, Biology and Environmental Niches Informing Tissue Regeneration", *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 288, pp.11-21.

THEIN-HAN, W., XU, H.H.K., 2011; "Collagen-Calcium Phosphate Cement Scaffolds Seeded with Umbilical Cord Stem Cells for Bone Tissue Engineering", Tissue Engineering: Part A, vol. 17, n.23;24, pp. 2943-2953.

UEBERSAX, L., MERKLE, H.P., MEINEL, L., 2008; "Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells", Journal of Controlled Release, vol. 127, n.1, pp. 12-21.

UEMURA, T., DONGD, J., WANGA, Y., KOJIMA, H., SAITOF, T., IEJIMA, G.D., KIKUCHI, M., TANAKA, J., TATEISHIC, T., 2003, "Transplantation of Cultured Bone Cells Using Combinations of Scaffolds and Culture Techniques", Biomaterials, vol. 24, pp. 2277-2286.

USHA, R., RAMASAMI, T., 2005; "Structure and conformation of intramolecularly Cross-linked Collagen", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol.41, pp. 21-24.

VALLET- REGÍ, M., 1997; "Introduction to the World of Biomaterials", Anales de Química Int. Ed., vol. 93, pp. S6-S14.

VALLET-REGI, M.; ARCOS, D., 2005, "Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants", Journal of Materials Chemistry, vol. 15, n.15, pp. 1509-1516.

VERNON, R.B., GOODEN, M.D., LARA, S.L., WIGHT, T.N., 2005, "Microgrooved Fibrillar Collagen Membranes as Scaffolds for Cell Support and Alignment", Biomaterials, vol.26, pp. 3131-3140.

WAHL, D.A., CZERNUSZKA, J.T., 2006; "Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair", European Cells and Materials, vol. 11, pp. 43-56.

WANG, Y.; UEMURA, T.; DONG, J.; KOJIMA, H. et al., 2003, "Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrowderived osteoblastic cells in porous ceramic materials", Tissue Eng, vol. 9, n.6, pp. 1205-1214.

WANG, H., LI, Y., ZUO, Y., LI, J., MA, S., CHENG, L., 2007 ; “Biocompatibility and Osteogenesis of Biomimetic Nano-Hydroxyapatite/Polyamide Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Biomaterials*, vol. 28, pp. 3338-3348.

WANG, M., 2006; “Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 2, n.2, pp. 80-84.

WIEDMANN-AL-AHMAD, M.W., GUTWALD, R., LAUER, G., HUBNER, U., SCHMELZEISEN, R., 2002; “How to Optimize Seeding and Culturing of Human Osteoblast-Like Cells on Various Biomaterials”, *Biomaterials*, vol. 23, pp. 3319-3328.

WIESMANN, H.P., MEYER, U., PLATE, U., HÖHLING, H.J., 2004; “Aspects of Collagen Mineralization in Hard Tissue Formation”, *International Review of Cytology*, vol. 242, pp. 121-156.

WOPENKA, B., PASTERIS, J.D., 2005, “A Mineralogical Perspective on the Apatite in Bone”, *Materials Science and Engineering*, vol. 25, pp. 131-143.

WU, T.J., HUANG, H.H., LAN, C.W., LIN, C.H., HSU, F.Y., WANG, Y.J., 2004; “Studies on the Microspheres comprised of Reconstituted Collagen and Hydroxyapatite”, *Biomaterials*, vol. 25, pp. 651-658.

YEATTS, A.B., FISHER, J.P., 2011a; “Tubular Perfusion System for the Long-Term Dynamic Culture of Human Mesenchymal Stem Cells”, *Tissue Engineering: part C*, vol. 17, n.3, pp. 337-348.

YEATTS, A.B., FISHER, J.P., 2011b; “Bone Tissue Engineering Bioreactors: Dynamic Culture and the Influence of Shear Stress”, *Bone*, vol. 48, pp. 171-181.

YUNOKI, S., IKOMA, T., MONKAWA, A., OLITA, K., KIKUCHI, M., SOTOME, S., SHINOMIYA, K., TANAKA, J., 2005, “Control of Pore Structure and Mechanical Property in Hydroxyapatite/Collagen Composite Using Unidirectional Ice Growth”, *Materials Letters*, vol.60, pp. 999-1002.

XIAO, Y., MAREDDY, S., CRAWFORD, R., 2010; "Clonal Characterization of Bone Marrow Derived Stem Cells and their Application for Bone Regeneration", *Int. J. Oral Sci.*, vol. 2, n.3, pp. 127-135.

ZHAI, Y., CUI, F.Z., WANG, Y., 2005; "Formation of Nano-Hydroxyapatite on Recombinant Human-Like Collagen Fibrils", *Current Applied Physics*, vol. 5, pp.429-432.

ZHANG, L., TANG, P., XU, M., ZHANG, W., CHAI, W., WANG, Y., 2010; "Effects of Crystalline Phase on the Biological Properties of Collagen-Hydroxyapatite Composites", *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 2189-2199.

ZHANG, Z.Y., TEOH, S.H., CHONG, W.S., FOO, T.T., CHNG, Y.C., CHOOLANI, M., CHAN, J., 2009; "A Biaxial Rotating Bioreactor for the Culture of Fetal Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, vol. 30, pp. 2694-2704.

ZHANG L., WEBSTER, T.J., 2009; "Nanotechnology and Nanomaterials: Promises for Improved Tissue Regeneration", *NanoToday*, vol. 4, pp. 66-80.

ZHAO, F., YIN, Y., LU, W.W., LEONG, C., ZHANG, W., ZHANG, J., ZHANG, M., YAO, K., 2002; "Preparation and Histological Evaluation of Biomimetic Three-dimensional Hydroxyapatite/Chitosan- Gelatin Network Composite Scaffolds", *Biomaterials*, vol. 23, pp. 3227-3234.