

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR GISELE CHERUTTI
..... E APRESENTADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 15.10.2012



.....
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Giselle Cherutti

**Desenvolvimento e Caracterização de
Dispositivo de PLLA/Trietil-Citrato associado à
Derme Suína Acelular para Reparação de
Lesões Cutâneas**

Campinas, 2012

Giselle Cherutti

Desenvolvimento e Caracterização de Dispositivo de PLLA/Trietil-Citrato associado à Derme Suína Acelular para Reparação de Lesões Cutâneas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Orientador (a): Eliana Aparecida de Rezende Duek

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C424d Cherutti, Giselle
Desenvolvimento e caracterização de dispositivo de PLLA/Trietil-Citrato associado à derme suína acelular para reparação de lesões cutâneas / Giselle Cherutti. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Poli (ácido láctico). 2. Colágeno. 3. Derme. 4. Fibroblasto. I. Duek, Eliana Aparecida de Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Development and characterization of PLLA/Triethyl citrate device associated to acellular dermal matrix to repair cutaneous wounds

Palavras-chave em Inglês: Poly (lactic acid), Collagen, Dermis, Fibroblasts

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Maria Clara Filippini Ierardi, Sonia Maria Malmonge

Data da defesa: 15-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DOS MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

**Desenvolvimento e Caracterização de
Dispositivo de PLLA/Trietil-Citrato associado à
Derme Suína Acelular para Reparação de
Lesões Cutâneas**

Autor: Giselle Cherutti

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

A banca examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta dissertação:



Prof. Dr^a. Eliana Aparecida de Rezende Duek
Faculdade de Engenharia Mecânica/Unicamp



Prof. Dr^a. Maria Clara Filippini Ierardi
Faculdade de Engenharia Mecânica/Unicamp



Prof. Dr^a. Sonia Maria Malmonge
Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas/UFABC

Campinas, 15 de fevereiro de 2012

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, pelo amor incondicional, a minha alma gêmea Eduardo, as minhas amigas-irmãs Priscila e Fabiana pelo apoio e incentivo, e a minha avó Vita, que certamente está orgulhosa por mais esta conquista de sua neta.

Agradecimentos

A minha família por ter me ensinado a importância dos estudos e dedicação ao trabalho, pelos sábios conselhos e pelo companheirismo.

A Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek pela orientação, confiança e principalmente pelos ensinamentos, sempre com muito profissionalismo, mostrando o caminho a ser seguido com clareza e objetividade.

A Dra. Adriana Motta pelo auxílio interminável na realização de minhas análises de caracterização, e pelas claras e sugestivas correções de meu trabalho.

A Silvia Mara de Melo Cattani pela confecção das lâminas para a histologia. E a Profa. Dra. Maria Lourdes Peris Barbo, pela análise de minhas lâminas histológicas.

A Claudenete Leal, pela receptividade e grande ajuda na realização dos ensaios mecânicos e de microscopia eletrônica.

A companheira Juliana Almeida por toda a sua ajuda, principalmente nas horas terríveis e confusas. E a amiga Kelly Martins pela ajuda na elaboração de minhas membranas poliméricas e pelos momentos de desabaços compartilhados.

Aos amigos André Dutra Messias e Vinicius A. M. R. Melo pelos ensinamentos, paciência e colaboração durante toda a jornada na utilização dos equipamentos e técnicas de cultivo celular. Além das caronas durante o desenvolvimento prático do estudo. E ao amigo Vitor de Miranda Fedrizzi pelo incentivo e apoio durante todo o processo.

A todos os pesquisadores, mestrandos e doutorandos, do Laboratório de Biomateriais pelo apoio e trabalho em equipe.

Cabe ainda, o sincero reconhecimento às numerosas pessoas que sugeriram, refletiram, esclareceram e, de alguma forma colaboraram na produção desse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

RESUMO

Um dos desafios da Engenharia Tecidual é o de promover um melhor funcionamento de órgãos e tecidos danificados por doenças ou traumas. Com o objetivo de desenvolver um dispositivo bifásico para futura regeneração dérmica e aplicação na Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa, cultivou-se células fibroblásticas da linhagem VERO sobre uma matriz dérmica suína acelular associada a um polímero biorreabsorvível, poli (L-ácido láctico) (PLLA), com adição de um plastificante, o trietil citrato de sódio (TCS). Para a realização da pesquisa, membranas PLLA-TCS e PLLA puro foram preparadas e caracterizadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ensaio Dinâmico Mecânico pelo Módulo de Tração, Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^1H), Ângulo de Contato e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os resultados mostraram que as membranas de PLLA- TCS, tornaram-se porosas e mais hidrofílicas em relação as membranas de PLLA puro, o que aumentou sua interação com as células fibroblásticas. Após a associação das membranas de PLLA-TCS à derme suína, as amostras foram analisadas por meio de Técnicas Histológicas e Microscopia Confocal para avaliar a presença de fibras colágenas e sua organização no arcabouço. Em seguida realizou-se cultura de células fibroblásticas sobre o dispositivo bifásico após 24 horas e 2 dias de cultivo para ensaios de Viabilidade Celular, e posteriormente Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados obtidos pelos ensaios mecânicos e biológicos comprovaram que o material apresentou interação suporte-célula, principalmente devido a sua porosidade e afinidade celular apresentada pela composição estrutural da matriz dérmica, sendo atóxico às células VERO. O material atuou como substrato celular, sendo que a proliferação das células VERO foi maior em comparação com a placa de cultivo (controle), havendo infiltração celular. Concluí-se assim, que o dispositivo estudado apresenta potencial para ser utilizado como um substituto dérmico para implantes em áreas de queimaduras extensas, por ser altamente poroso, promovendo assim, maior migração, adesão e crescimento celular ao mesmo tempo em que o dispositivo é degradado pelo organismo. A capacidade de deformação apresentada pelo futuro substituto dérmico também auxilia em sua implantação, por facilitar o procedimento cirúrgico, que muitas vezes necessita distender um pouco o material para o total recobrimento da lesão; ou as movimentações naturais da pele após o implante. Além disso, o dispositivo minimiza as chances de contração do enxerto, por ser constituído por um componente dérmico.

Palavras-Chave: Poli (L-ácido láctico). Colágeno. Derme suína. Fibroblastos.

ABSTRACT

One of the challenges of the Tissue Engineering is to promote a better functioning of organs and tissues damaged by diseases or traumas. With target for developing a biphasic device for future regeneration and dermal application in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, fibroblasts from VERO cell line were cultivated on a porcine acellular dermal matrix associated to a bioresorbable polymer (PLLA) with the addition of a plasticizer (TCS). For this present study, PLLA-TCS membranes and pure PLLA were prepared and analyzed by means of characterization tests such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamical Mechanical Analysis (DMA), Spectroscopy of the Fourier Transform Infrared, Nuclear Magnetic Resonance (NMR ^{13}C e ^1H), Contact Angle and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The results showed that the PLLA-TCS, became porous and more hydrophilic compared to pure PLLA, which increased its interaction with the fibroblast cells. After the association of the PLLA-TCS to the porcine dermal matrix, the samples were analyzed by Histological Techniques and Confocal Microscopy to evaluate the presence of collagen fibers and their organization within *scaffold*. Afterwards, a culture of fibroblasts cell on the biphasic device was performed after 2 days and 24 hours of cultivation the Cellular Viability test was done and posteriorly Scanning Electron Microscopy (SEM). The results of the biphasic device in relation to mechanical and biological tests showed the cell-support interaction, through the analysis of viability, cell morphology and structural organization of collagen fibers and polymer structure, are nontoxic to VERO cells. The material behaves as a cell substrate where proliferation of VERO cells and their infiltration was higher compared to the cell culture plate. It can therefore be concluded that the studied device has the potential to be used as a substitute for dermal implants in areas of extensive burns, for being highly porous, thus promoting increased migration, adhesion and cell growth while the device is degraded by the body. The device deformation capacity also helps in the substitute implantation for facilitating the surgical procedure which often need to stretch the material for coverage of the injury completely or natural movements of the skin after implantation. Furthermore, the device minimizes the chances of skin graft contraction as the gadget consists of a dermal component.

Keywords: Poly (L - lactic acid). Collagen. Porcine dermis. Fibroblasts.

Lista de Figuras

- Figura 1. Representação esquemática de possíveis defeitos durante a implantação de substitutos de pele. (a) presença de bolhas entre o dispositivo e a ferida; (b) acomodação incorreta do dispositivo sobre a lesão; (c) deformação por cisalhamento do dispositivo; (d) deformação por má colocação do implante. Fonte: YANNAS e BURKE, 1980, pp. 65-81.....12
- Figura 2. Degradação hidrolítica de poliésteres. Fonte: BARBANTI et al. 2005, pp. 13-21.15
- Figura 3. Estrutura química dos monômeros PLA (a) e PGA (b). Fonte: NAIR et al. 2007, pp. 762-79816
- Figura 4. Diferentes formas de estruturas derivadas dos monômeros L-ácido láctico e D-ácido láctico. Fonte: NAMPOOTHIRI et al. 2010, pp. 8493-8501.....17
- Figura 5. Estrutura química do PLLA e do aditivo trietil citrato de sódio. Fonte: WOO *et al.* 1995, pp. 415-42132
- Figura 6. Espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) referente ao PLLA puro. Fonte: MOTTA E DUEK, 2006, pp. 26-32.....33
- Figura 7. Em (a) representação dos grupos funcionais da estrutura química do Trietil citrato. Em (b) espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) referente ao PLLA-TCS.....34
- Figura 8. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN¹³C) PLLA puro. ...35
- Figura 9. Em (a) dados da estrutura química do trietil citrati. Em (b) Espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹³C) referente ao trietil citrato. Fonte: Win Chemical. Disponível em:www.win-winchemical. Acesso em: 24 ago. 2011.36
- Figura 10. Espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹³C) referente ao PLLA-TCS.37
- Figura 11. Espectros obtidos por FTIR. Em (a) PLLA-TCS; em (b) PLLA puro; em (c) trietil citrato puro (fonte: Win Chemical. Disponível em: www.win-winchemical. Acesso em: 24 ago. 2011).38
- Figura 12. Curvas de DSC para membranas de PLLA puro e PLLA-TCS após o segundo aquecimento.....39
- Figura 13. Representação do ângulo de contato da tensão superficial entre a gota e a superfície do material.....42

Figura 14. Imagens obtidas a partir de MEV das membranas de PLLA com trietil citrato de sódio a 5%. Superfície do PLLA-TCS em diferentes aumentos (a) e (b). Superfície de fratura do PLLA-TCS em diferentes aumentos (c) e (d).	44
Figura 15. Imagens obtidas a partir de MEV das membranas de PLLA puras. Superfície do PLLA em diferentes aumentos (a) e (b). Superfície de fratura do PLLA em diferentes aumentos (c) e (d).	45
Figura 16. Comparação do módulo de perda (E'') e módulo de armazenamento (E') sob diferentes temperaturas entre as membranas de PLLA puras e PLLA-TCS após análise de DMA. Em (a) módulos E' e E'' do PLLA puro e em (b) módulos E' e E'' do PLLA-TCS.	48
Figura 17. Análise do módulo de perda (E'') e módulo de armazenamento (E') sob diferentes temperaturas do dispositivo bifásico após ensaio de DMA.	49
Figura 18. Fotografias de lâminas de derme acelular suína. (a) sob luz polarizada em aumento de 40x (a). (b) coradas com Hematoxilina – Eosina (HE) em aumento de 10x.....	51
Figura 19. Imagens de lâminas do dispositivo bifásico na ausência de células fibroblásticas (VERO) coradas com Hematoxilina – Eosina (HE).	52
Figura 20. Imagens de lâminas do dispositivo bifásico na ausência de células fibroblásticas (VERO) coradas com Picrossirius red.	52
Figura 21. Imagens a partir de microscopia confocal evidenciando as fibras colágenas do dispositivo bifásico antes do cultivo celular.....	54
Figura 22. Imagens obtidas por MEV do dispositivo composto por derme em associação com PLLA-TCS antes de sua exposição às células fibroblásticas (VERO). Superfície do dispositivo (a) e (b). Superfície de fratura do dispositivo (c) e (d).	56
Figura 23. Micrografias do dispositivo composto por derme em associação com PLLA-TCS após a exposição às células fibroblásticas (VERO). Imagens da superfície do dispositivo em diferentes aumentos.....	57
Figura 24. Ensaio de viabilidade celular para adesão, após 2 horas de cultivo. As amostras de derme+PLLA-TCS mostraram taxa de adesão superior ($p < 0,005$) em comparação com o controle (placa de poliestireno), sendo estatisticamente diferentes.	59
Figura 25. Ensaio de viabilidade celular para citotoxicidade das amostras, após 24 horas de cultivo. As amostras de derme+PLLA-TCS mostraram-se inferiores ao controle (placa de poliestireno), mas são estatisticamente semelhantes ($p > 0,005$).	60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados obtidos a partir das curvas de DSC para o PLLA puro, o PLLA-TCS e trietil citrato de sódio puro.....	40
Tabela 2. Dados resultantes do ângulo de contato das amostras do polímero puro e do polímero com plastificante.....	42
Tabela 3. Temperatura de transição vítrea das membranas de PLLA puras, PLLA-TCS e dispositivo completo após análise de DMA a partir do módulo de perda (E'').....	47

Lista de Equações

Equação 1	41
-----------------	----

Nomenclaturas

Abreviações

PGA – Poli (ácido glicólico)

PLA – Poli (ácido láctico)

PCL – Poli (ϵ – caprolactona)

PPD – Poli (p-dioxanona)

PLLA – Poli (L-ácido láctico)

PLGA – Poli (L-ácido láctico-co-glicólico)

PTFE – Politetrafluoretileno

TCS – Trietil citrato de sódio

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

FTIR – Infravermelho com Transformada de Fourier

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

DMA – Análise Dinâmico-Mecânica

ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

MEC – Matriz extracelular

Siglas

PBS – Tampão fosfato salino

SFB – Soro fetal bovino

DMSO – Dimetil sulfóxido

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio

HE – Hematoxilina – eosina

Unidades

T_g – Temperatura de transição vítrea

T_f – Temperatura de fusão
 T_c – Temperatura de cristalização
 ΔH_f – Entalpia de fusão
 ΔH_c – Entalpia de cristalização
 CO_2 – Gás de Carbonico
 θ – Theta
W/V – Massa por volume
W/W – Massa molar por massa molar
 M_w – Massa ponderal média ($g \cdot mol^{-1}$)
 cm^2 – Centímetro quadrado
 cm^{-1} – Centímetro a menos um
Kg – Quilo grama
 m^2 – Metro quadrado
mm – Milímetro
nm - Nanometro
 μL – Microlitro
mL – Mililitro
 μm – Micrometro
Hz – Hertz
 min^{-1} – Minutos a menos um
 $^{\circ}C$ – Grau Celsius
 γ_{LV} – Energia interfacial líquido e vapor (mN/m)
 γ_{SL} - Energia interfacial sólido e líquido (mN/m)
 γ_{SV} – Energia interfacial sólido e vapor (mN/m)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	3
2.1	Engenharia tecidual cutânea	3
2.2	Desenvolvimento de dispositivos biossintéticos	8
2.2.1	Características da pele humana e tratamentos com biomateriais	8
2.2.2	Materiais poliméricos para aplicação clínica	14
2.2.3	Polímeros biorreabsorvíveis e mecanismo de ação no processo de regeneração tecidual.....	19
3	METODOLOGIA	24
3.1	Preparação do dispositivo semelhante à derme humana.....	24
3.1.1	Preparação das membranas poliméricas	24
3.1.2	Preparação da derme suína	25
3.1.3	Preparação do dispositivo bifásico	25
3.2	Caracterização das membranas de PLLA e PLLA-Trietil Citrato de Sódio (TCS)	26
3.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
3.2.2	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	26
3.2.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³ C e ¹ H).....	27
3.2.4	Ângulo de Contato	27
3.2.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	27
3.3	Caracterização do dispositivo completo (derme+PLLA-TCS) antes da exposição às células fibroblásticas.....	28
3.3.1	Análise Dinâmico Mecânica (DMA).....	28
3.3.2	Análise histológica do dispositivo	28
3.3.3	Microscopia Confocal.....	29
3.4	Caracterização das membranas poliméricas associada à derme suína após exposição às células de fibroblastos humanos.....	29
3.4.1	Procedimentos de cultivo de células fibroblásticas	29
3.4.2	Viabilidade celular.....	30
3.4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1	Caracterização das membranas de PLLA puro e PLLA-TCS	32
4.1.1	Ressonância Magnética Nuclear.....	32
4.1.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	37
4.1.3	Calorimetria Exploratória Diferencial	39
4.1.4	Ângulo de Contato	41
4.1.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
4.2	Caracterização do dispositivo completo (derme+ PLLA-TCS) antes da exposição às células VERO.....	46
4.2.1	Ensaio Dinâmico Mecânico (DMA)	46
4.2.2	Análise histológica.....	50
4.2.3	Microscopia Confocal.....	54

4.3	Caracterização do dispositivo completo (derme+ PLLA-TCS) após exposição às células VERO	55
4.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
4.3.2	Viabilidade Celular	58
5	CONCLUSÕES.....	62
6	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	63
	Referências Bibliográficas	64

1 INTRODUÇÃO

Dispositivos cutâneos desenvolvidos a partir de polímeros biorreabsorvíveis têm sido amplamente utilizados para o tratamento de lesões de pele como ulcerações, doenças ou queimaduras, auxiliando na regeneração da região lesionada e impedindo o surgimento de infecções secundárias.

Uma das razões mais comuns para a perda de pele é por trauma termal, onde áreas substanciais do tecido são danificadas, havendo ou não possibilidade de regeneração tecidual. Feridas provocadas por queimaduras de profundidade superior a 1 cm de diâmetro, são consideradas lesões de tamanho crítico e necessitam de implantes de pele, já que não há possibilidade de regeneração natural do tecido lesionado, promovendo a formação de extensas cicatrizes, e resultando em limitações de mobilidade tecidual e graves deformidades estéticas.

A queimadura compromete a integridade funcional da pele, responsável pela homeostase hidroeletrólítica, controle da temperatura interna, flexibilidade e lubrificação da superfície corporal, sendo que a gravidade do comprometimento dessas funções é dependente da extensão e da profundidade da queimadura.

De acordo com Vale (2005) as causas mais frequentes de queimaduras são: chama de fogo, contato com água fervente ou outros líquidos quentes e contato com objetos aquecidos. As estatísticas registram que os casos por queimaduras são uma das principais causas de morte no país. Ainda segundo Vale (2005), no Brasil acontecem um milhão de casos por trauma termal a cada ano, 200 mil são atendidos em serviços de emergência e 40 mil demandam hospitalização.

No caso específico de biomateriais para implantes em lesões cutâneas, gerados por trauma termal, a engenharia de tecido possui o objetivo de recuperar tais lesões por meio do cultivo de células do próprio paciente ou de células de um doador. Nesse sentido, o tecido biossintético é projetado para cicatrizar a ferida, fornecendo uma barreira mecânica à infecção e perda de fluidos

corpóreos. Ele também possui diversas propriedades biológicas semelhantes à pele humana que permite e/ou promove o crescimento de novos tecidos e aperfeiçoa as condições para a cura.

Uma variedade de substitutos dérmicos ou equivalentes de pele foram investigados previamente. Materiais biológicos como a derme, bases com colágeno (IntegraTM e Apligraf®) ou bases com fibrina (Beriplast®, HemaseelTM e Bioseed®) são desenvolvidos como biomateriais para o reparo de lesões, principalmente em associação com materiais poliméricos, como o poli ácido láctico (PLA), poli ácido glicólico (PGA) e seus copolímeros. Muitos equivalentes de pele só promovem recobrimento temporário da ferida (Apligraf®, TransCytes®, entre outros) e são geralmente aplicados em lesões de espessura parcial que ainda detêm elementos dérmicos. Já dispositivos de pele permanentes (Dermograft®, PermacolTM, entre outros) promovem recobrimento e regeneração total da ferida, não havendo necessidade de uma retirada posterior do material. Dentre as vantagens associadas ao emprego de produtos comerciais estão: diminuição tanto do número de intervenções cirúrgicas, a que os pacientes são submetidos, como uma menor probabilidade de reintervenções, decorrentes de formação de cicatrizes ou contraturas indesejáveis, além de uma melhor qualidade de recuperação do paciente.

Tais vantagens estão também aliadas à melhoria das propriedades físico-químicas desses substitutos de pele, como no caso da incorporação de aditivos aos dispositivos bifásicos, como polímeros em associação com materiais biológicos. Esses aditivos são importantes por aumentar a interação celular entre o equivalente de pele e o organismo humano, por meio de modificações em sua estrutura, como flexibilidade e maior porosidade. O trietil citrato é um exemplo de aditivo muito estudado para aumentar a porosidade de materiais para implante de pele, e consequentemente aumentar a interação célula-material.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um dispositivo bifásico constituído por matriz dérmica suína acelular associada ao polímero biorreabsorvível PLLA – Trietil Citrato de Sódio e caracterizá-lo por meio de análises físico químicas, mecânicas, morfológicas e de interação celular utilizando-se células fibroblásticas (linhagem VERO), com o intuito de se obter um substituto dérmico comercial.

2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Engenharia tecidual cutânea

Durante as últimas décadas, tem-se presenciado inúmeros avanços no desenvolvimento de dispositivos para a regeneração ou substituição tecidual de pele. Um alto número de produtos encontra-se disponível comercialmente e muitos outros ainda estão em fase de desenvolvimento (ZHONG *et al.* 2010; PRIYA *et al.* 2008). Esses substitutos cutâneos são designados a auxiliar o fechamento de feridas, temporárias ou permanentes (METCALFE e FERGUSON, 2007; GRIFFITH, 2001) - o termo ferida ou lesão pode ser definido como qualquer ruptura da integridade da pele, membranas mucosas ou qualquer outra estrutura do corpo, podendo ser causada por traumas físicos, térmicos, químicos ou desencadeada por uma afecção clínica, apresentando-se de diversas formas, tamanhos e profundidades (IGNÁCIO, 2009) - além de possuírem várias propriedades biológicas e farmacêuticas semelhantes à pele humana que permitem o crescimento de novos tecidos e que otimizam as condições para cura (PHAM *et al.* 2007; HORCH *et al.* 2005).

Várias abordagens têm sido tomadas por diferentes grupos para obtenção de substitutos. Eles podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de células vivas, de tecidos provenientes ou não da mesma espécie, e de biomateriais de origem sintética ou biológica (AUGER *et al.* 2009).

Essas são algumas das considerações que têm impulsionado a busca de substitutos dérmicos ou dérmico-epidérmicos ideais. Nos últimos 30 anos, têm-se buscado a criação de um produto que possa ser reproduzível em larga escala e permanentemente substituir a pele perdida (SCHULTZ 3rd *et al.* 2000).

Desde a introdução dos enxertos de pele por Reverdin em 1871, a enxertia tornou-se uma cirurgia de referência para o recobrimento de feridas cutâneas (HORCH *et al.*, 2005). Já no final dos anos 90, mediante o avanço tecnológico relacionado à enxertia, do prognóstico de pacientes

com grandes queimaduras e do conhecimento da ciência dos materiais e cirurgia, Burke & Yannas iniciaram estudos para a criação de um produto comercial semelhante à pele humana (SCHULZ 3rd *et al.* 2000; HODGKINSON e BAYAT, 2011).

Atualmente, podem ser encontrados no mercado três tipos principais de produtos para enxertos de pele: aloenxertos, células ou tecidos da mesma espécie; xenoenxertos, células ou tecidos de espécies diferentes; e autoenxertos, células ou tecidos do próprio paciente (PHAM *et al.* 2007; METCALFE e FERGUSON, 2007; GROEBER *et al.* 2011). Além disso, esses dispositivos podem ser acelulares ou celulares. Produtos acelulares apresentam uma matriz produzida por materiais sintéticos ou naturais, que possuem as estruturas físico-químicas necessárias permitindo infiltração celular no material, após o implante (GROEBER *et al.* 2011). Já produtos celulares podem ou não estarem associados a matrizes constituídos por materiais sintéticos ou biológicos apresentar matriz, mas devem obter cultivo de células epidérmicas, dérmicas ou ambas (ZHONG *et al.* 2010; COOLEN *et al.* 2010; PRIYA *et al.* 2008; DIECKMANN *et al.* 2010).

Diversos produtos, acelulares ou celulares, à base de colágeno ou derme animal, xeno ou aloenxertos têm sido comercializados como equivalentes dérmicos, sendo que muitos deles são utilizados como dispositivos temporários ou permanentes para o revestimento de queimaduras ou ulcerações. Como exemplos de dispositivos biológicos podem ser citados o PermacolTM, Biobrane®, TransCyte®, Dermagraft®, IntegraTM, AlloDerm®, entre outros (COOLEN *et al.* 2010; DIECKMANN *et al.* 2010; LÍMOVÁ, 2010; LAZIC e FALANGA, 2011).

O PermacolTM é um xenoenxerto a base de colágeno reticulado de matriz dérmica suína acelular e é muito utilizada como curativo permanente devido à longa duração do implante durante o processo de cicatrização (LÍMOVÁ, 2010; CATENA *et al.* 2007; MACLEOD *et al.* 2004).

O AlloDerm® é composto por matriz dérmica humana acelular liofilizada (o que previne o risco de rejeição ao produto) e membrana basal, derivada de aloenxertos de cadáveres humanos. É um dispositivo semelhante ao IntegraTM por promover uma remodelação da camada dérmica do

organismo, mas não é um material sintético. Utilizado comercialmente como revestimento permanente de lesões profundas e extensas (HORCH *et al.* 2005; SUPP *et al.* 2005; SHEVCHENKO *et al.* 2011; OH e KIM, 2011; YIM *et al.* 2010).

O Biobrane® é um curativo sintético composto por uma tela de malha de náilon ligado a uma fina membrana de silicone e revestido por polipeptídios porcino. Pode ser usado como um revestimento temporário de queimaduras superficiais, ou como revestimento de proteção para autoenxertos (PHAM *et al.* 2007; DIECKMANN *et al.* 2010; HUBIK *et al.* 2011; LESHER *et al.* 2011; TENENHAUS *et al.* 2007).

Já o TransCyte® é um dispositivo semelhante ao Biobrane® por também ser um revestimento temporário e biossintético, sendo composto por membrana de silicone semi permeável, cultura de células fibroblásticas humanas sobre colágeno porcino e coberto por malha de náilon. Tem sido indicado como revestimento temporário em queimaduras extensas antes da autoenxertia ou em queimaduras parciais, com pouca profundidade, suas propriedades físicas permitem uma fácil adaptação aos contornos da pele. (CLARK *et al.* 2007; METCALFE e FERGUSON, 2007; TENENHAUS *et al.* 2007; AMANI *et al.* 2006)

Diferentemente dos dispositivos anteriores, o Dermagraft® é um material polimérico (poliglactina) bioabsorvível em forma de rede com fibroblastos neonatal alogênicos semeados. Pode ser usado como revestimento temporário ou permanente para o suporte de enxertos de pele em queimaduras e úlceras (PHAM *et al.* 2007, PRIYA *et al.* 2008; METCALF *et al.* 2007; HORCH *et al.* 2005; LAZIC e FALANGA, 2011).

Mesmo apresentando propriedades semelhantes aos outros dispositivos, o substituto Integra™ é composto por colágeno bovino, semeada com células do próprio paciente, e epiderme temporária de silicone, o que o difere de outros materiais que não apresentam camadas autólogas em seu dispositivo. Essa camada de silicone é removida após a cicatrização da ferida. O Integra™ é indicado para tratamentos de queimaduras parciais ou profundas (PRIYA *et al.* 2008; DIECKMANN *et al.* 2010; METCALFE e FERGUSON, 2007; JONES *et al.* 2005; PAPA *et al.* 2011; CUADRA *et al.* 2012; FIGUS *et al.* 2007).

Apesar de ser o mais utilizado atualmente, o Integra™ ainda não é considerado um dispositivo cutâneo ideal, pela necessidade da retirada de sua camada de silicone (epiderme temporária), já que esse material não é absorvido pelo organismo humano (SALTZMAN, 2004). Por essa razão, dispositivos associados a polímeros que são degradados pelo organismo têm sido largamente estudados (PERAMO e MARCELO, 2010).

Pesquisas realizadas por Greenwood e Dearman (2012) confirmam que a utilização de dispositivos degradáveis diminui drasticamente tanto o tempo requerido para a regeneração do tecido como também a contração do local lesionado. Nesse estudo foi comparado, por meio de testes *in vivo* em suínos, a regeneração de áreas lesionadas por trauma termal utilizando-se um dispositivo biodegradável, NovoSorb™, composto por poliéster-poliuretano, e o substituto Integra, composto por colágeno bovino e silicone. Percebeu-se que, no caso do implante com o Integra, somente após 14-21 dias ocorria à regeneração e retirada total da camada de silicone. Já com o substituto biodegradável observou-se uma regeneração a partir do 3º - 7º dia e com fechamento total da ferida a partir do 14º dia.

Além disso, tais pesquisas buscam obter um dispositivo capaz de se regenerar e mimetizar as funções naturais da pele, como fechar rapidamente a ferida, sendo clinicamente eficiente, ser durável e suficientemente elástico para tolerar alguma deformação, fornecer uma barreira microbiana, estar prontamente disponível imediatamente após a lesão e promover uma regeneração tecidual no local lesionado sem provocar uma resposta inflamatória exacerbada (AUGER *et al.* 2009; SHERIDAN, 2009).

Embora a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares da engenharia tecidual, que orientam o processo de cicatrização de feridas, ainda seja limitada, novas tecnologias têm sido desenvolvidas anualmente para ampliar os conhecimentos sobre o assunto e algumas dessas descobertas ainda podem levar a importantes melhorias clínicas em um futuro próximo (SCHULZ 3rd *et al.* 2000). Tal avanço científico tem permitido o tratamento mais precoce de pacientes com lesões de espessura total e parece se constituir em uma nova e importante alternativa no tratamento de queimaduras graves, onde há necessidade de grandes quantidades de tecidos para o recobrimento da região lesionada (HODGKINSON e BAYAT, 2011).

Estudos realizados tentam solucionar o problema da necessidade de grandes quantidades de pele para o transplante em casos de queimaduras cutâneas crônicas. Modelos de epiderme ou derme humana reconstruída *in vitro* foram desenvolvidos, partindo de experimentos que utilizaram células da pele do próprio paciente (autólogas), ou de doadores (não autólogas), mas tais modelos clínicos só alcançaram relativo sucesso. Este insucesso está relacionado à disponibilidade de tecidos (autólogo ou não) e ao tamanho da lesão, pois em pacientes com lesões de mais de 60% da totalidade da pele, é praticamente impossível promover o fechamento da ferida somente com transplante autólogo ou de doadores (IGNÁCIO, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde ocorrem cerca de um milhão de acidentes por queimaduras por ano no Brasil, ocupam ainda o terceiro lugar entre os acidentes que mais ocorrem no mundo. No país, o Sistema Único de Saúde (SUS) gasta anualmente, cerca de R\$ 55 milhões com tratamentos de traumas térmicos, o que representa 89,9% dos atendimentos realizados em pronto atendimento (DASSIE e ALVES, 2011; IGNÁCIO, 2009). Entre adolescentes e adultos jovens, a maioria dos casos ocorre devido à utilização de álcool líquido, o que representa um agente causal importante. Em adultos, a maior causa de queimaduras está relacionada com acidentes de trabalho entre os homens e violência doméstica entre as mulheres, e ocorrem geralmente com fogo ou eletricidade (IGNÁCIO, 2009).

O tratamento de queimaduras pode ser clínico ou cirúrgico. O tratamento clínico é realizado com maior frequência e pode estar associado a curativos cutâneos, onde durante o processo de reepitelização de uma lesão dependendo de sua espessura pode haver ou não a necessidade de internação do paciente para a realização do tratamento. A intervenção hospitalar ocorre no caso de lesões de espessura parcialmente profunda (segundo grau) ou profundas (terceiro grau). Para o tratamento de traumas térmicos profundos o médico necessita realizar algumas etapas antes de um procedimento clínico ou cirúrgico: desbridamento, descontaminação e análise da extensão da ferida para aplicação do substituto ideal. Esses curativos podem ser sintéticos ou biológicos, com ou sem agentes antimicrobianos (SCHULTZ 3rd *et al.* 2000).

Nas queimaduras de espessura parcialmente profunda (segundo grau) ou total (terceiro grau), que acometem regiões estéticas e funcionais importantes, é necessário um tratamento

cirúrgico, realizado por meio de enxertia de pele no local lesionado, utilizando-se enxertos dermo-epidérmicos, autólogos, alógenos ou xenoenxertos; ou matrizes de regeneração dérmica, cultura de queratinócitos e fibroblastos ou a combinação de ambas (SCHULTZ 3rd *et al.* 2000; PHAM *et al.* 2007).

Apesar do crescente número de curativos cutâneos comercializados e do avanço nas pesquisas, a engenharia tecidual ainda precisa vencer o principal problema encontrado após aplicação de implantes cutâneos, a retração do enxerto, causado pela ausência de uma camada dérmica adequada ou da fina espessura do enxerto. Estudos recentes têm demonstrado que o uso de substitutos dérmicos ou equivalentes que contenham colágeno ou matriz dérmica, em associação com as células do próprio paciente ou de doadores, cultivadas *in vitro* sobre suportes poliméricos biorreabsorvíveis tem proporcionado melhores resultados após o implante (HODGKINSON e BAYAT, 2011).

2.2 *Desenvolvimento de dispositivos bio sintéticos*

Tecidos bio sintéticos são caracterizados por materiais capazes de mimetizar algumas das funções naturais da pele humana. Atualmente, pesquisadores de todo o mundo tem buscado o desenvolvimento de materiais bio sintéticos que auxiliem na reconstrução ou recuperação de áreas lesionadas por doenças ou traumas (LAZIC e FALANGA, 2011).

2.2.1 *Características da pele humana e tratamentos com biomateriais*

A pele é o maior órgão do corpo humano. Em adultos, essa área atinge de 1.5 a 2.0 m² e com peso de 8 a 10 kg. Ela contém três camadas distintas: o tecido subcutâneo (hipoderme), a derme e a epiderme (PALSSON e BHATA, 2004).

A epiderme contém queratinócitos próximos ao extrato germinativo (membrana basal), que garantem a renovação celular e adesão célula a célula, dando origem à camada córnea, além de produzir queratina, uma proteína responsável pela impermeabilização da pele. Também contém melanócitos, células responsáveis pela pigmentação e síntese de melanina; a melanina produzida é progressivamente transferida aos queratinócitos. Por não possuir vasos, os nutrientes e o oxigênio chegam à camada dérmica por difusão provenientes de vasos sanguíneos da derme (SOUTO *et al.* 2006; VERT, 2006).

A derme é o tecido conjuntivo que sustenta a epiderme, sendo composta por colágeno denso e fibras elásticas produzidas por fibroblastos cutâneos; a distribuição desses fibroblastos garante a consistência física da pele (textura e elasticidade). É na camada dérmica que se localizam os vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição da epiderme e também os nervos e órgãos sensoriais a eles associados (VERT, 2006; MANDELBAUM *et al.* 2003).

Já a hipoderme é a camada mais profunda da pele, constituída por tecido conjuntivo frouxo e contém grande quantidade de tecido adiposo, e sendo o local onde se encontra o início das conexões nervosas da pele (MANDELBAUM *et al.* 2003).

Além disso, o tecido cutâneo como um todo possui várias funções complexas, como receptores sensoriais, folículos pilosos para produção e crescimento de pêlos, e dois tipos de glândulas sudoríparas: uma glândula endócrina, que regula principalmente a temperatura corpórea, e uma glândula apócrina (SEAL *et al.* 2001). Como qualquer outro órgão, a pele é irrigada por vasos capilares, o que auxilia principalmente na resposta imune e inervada pelo sistema nervoso, além de proteger o corpo contra as influências do ambiente (SHERIDAN *et al.* 2009; BET *et al.* 2003; SEAL *et al.* 2001). Em respostas imunes agudas ou crônicas, a perda de barreiras contra infecções e desidratação, exige um intenso processo de reparação tecidual para que o organismo sobreviva. Dentro deste processo de reparação encontra-se o processo de reepitelização, onde a superfície da ferida é a primeira a sofrer cicatrização cutânea (HORCH *et al.* 2005; VERT, 2006; MANDELBAUM *et al.* 2003).

Em uma lesão superficial, a pele repara o local lesionado naturalmente, por meio da proliferação e crescimento de derme (fibroblastos e outras células estromais) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos) devido à permanência de células no local da ferida (SOUTO *et al.* 2006; HODGKINSON e BAYAT, 2011). Em lesões de pele e mucosa extensas e profundas, pode ocorrer a destruição de elementos da epiderme e da derme. Isso torna o processo de regeneração lento e suscetível a complicações, ou a impossibilidade de uma regeneração tecidual natural (SHERIDAN *et al.* 2009; SOUTO *et al.* 2006; JONES *et al.* 2005).

A epiderme é capaz de se regenerar. Segundo Bronzino (2006) lesões limitadas à epiderme (lesões de primeiro grau) são caracterizadas por não atingirem funções hemodinâmicas e por apresentarem somente alterações da cor da pele; e regeneram-se por migração de queratinócitos da periferia da lesão, a partir das sobras de tecido basal presente na base da ferida, e da proliferação de queratinócitos fora dos anexos epidérmicos. Esse processo regenera a epiderme completamente (SCHULZ 3rd *et al.* 2000).

A derme pode não se regenerar no caso de lesões extensas. O tecido perdido após uma queimadura total não é recuperado. Mas quando a ferida dermal é superficial, onde não há perda total do tecido, como em queimaduras de segundo grau superficiais (presença de bolhas e vermelidão), a derme mantém a capacidade de regeneração de seus apêndices epidérmicos, promovendo uma cicatrização significativa do ferimento (JONES *et al.* 2005; SCHULTZ 3rd *et al.* 2000).

No entanto, em situações de perda total de derme, como em caso de pacientes com mais de 40% de queimaduras na superfície do corpo (lesões de terceiro grau) (presença de bordo avermelhado e o chamado de recobrimento carapaça) Bronzino (2006) afirma que o organismo não é capaz de regenerar a região lesionada naturalmente e nestes casos há a necessidade de procedimentos artificiais para o tratamento do local, como o uso de dispositivos biossintéticos. Estudos demonstram que queimaduras severas não tratadas por mais de 21 dias provocam infecções severas e aumentam o índice de mortalidade (SHEVCHENKO *et al.* 2010).

A não regeneração dérmica ocorre em lesões extensas na pele, pois além da resposta local, desencadeia-se uma reação sistêmica ao organismo, em consequência da liberação de mediadores pelo tecido lesado. Ocorre assim um imenso dano à integridade capilar, com perda acelerada de fluidos por meio da ferida, que é agravada por subprodutos de colonização bacteriana. Além disso, nas queimaduras extensas, superiores a 40% da área total da superfície corporal, o sistema imune é incapaz de delimitar a infecção, que, tornando-se sistêmica, diminui a sobrevivência do paciente. Essa resposta sistêmica manifesta-se por febre, circulação sanguínea hiperdinâmica e ritmo metabólico acelerado, e desequilíbrio hidroeletrolítico (VALE, 2005; SUPP *et al.* 2005).

Por essa razão, a utilização de dispositivos biossintéticos dérmicos ou neo-dérmicos tem apresentado resultado promissor para a cicatrização de regiões lesionadas. Pesquisas têm demonstrado que a aplicação de materiais biossintéticos hábeis ao transplante precisam possuir algumas características importantes: como ser atóxico, não provocar reações inflamatórias ou antigênicas, promover barreira contra micro-organismos, evitar desidratação da superfície corpórea e contribuir para a regulação de temperatura (SHEVCHENKO *et al.* 2010; BET *et al.* 2003). Tais dispositivos precisam aderir ao ferimento, possuir mecanismos de defesa e apoio para o local de cicatrização da ferida, ser elástico e com longa durabilidade, apresentar potencial de crescimento semelhante à pele humana e com boa qualidade estética (MARGULIS *et al.* 2005).

Segundo Rodas (2004), os substitutos dérmicos, pensando em suas características físico-químicas, bioquímicas e mecânicas, também devem ser desenvolvidos de maneira a serem facilmente manuseáveis durante a sua implantação, sem fraturar e acomodando-se perfeitamente sobre o leito da ferida, principalmente sem formar bolsas de ar entre a superfície da lesão e o dispositivo, pois isso pode tornar o paciente susceptível a infecções secundárias e sem resistência a forças de cisalhamento que ocorram naturalmente após implante ou devido a sua má implantação (Figura 1).

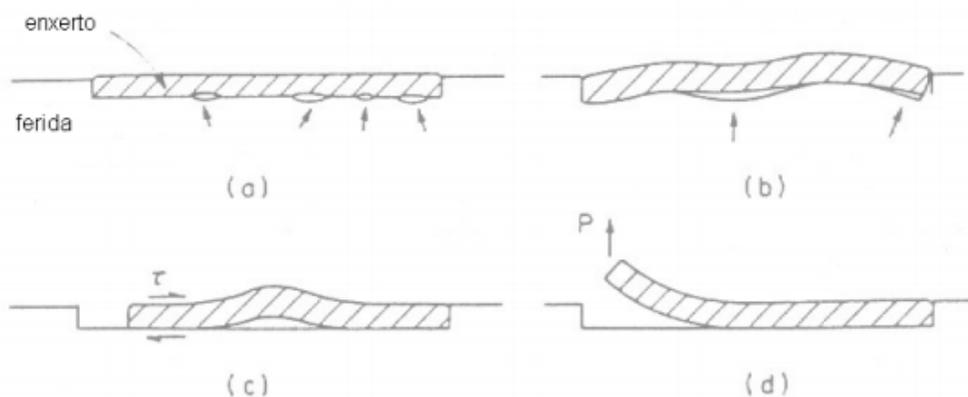


Figura 1. Representação esquemática de possíveis defeitos durante a implantação de substitutos de pele. (a) presença de bolhas entre o dispositivo e a ferida; (b) acomodação incorreta do dispositivo sobre a lesão; (c) deformação por cisalhamento do dispositivo; (d) deformação por má colocação do implante. **Fonte:** YANNAS e BURKE, 1980, pp. 65-81.

Além das propriedades necessárias para transplantes, recentemente inúmeras pesquisas têm retratado alguns casos clínicos bem sucedidos mostrando a viabilidade de substitutos biossintéticos produzidos a partir de enxertos de culturas epiteliais associadas a polímeros biorreabsorvíveis em pacientes com queimaduras (KREMER *et al.* 2000; ARVELO, 2007). Outros grupos têm sido capazes de demonstrar que um modelo de queratinócitos extraído de uma biópsia da pele suína em matriz de colágeno-glicosaminoglicano, em algumas semanas, formou uma neopiderme suína (SOUTO, 2005).

Autores como Kremer *et al.* (2000) afirmam que tais estudos mostraram que a associação entre polímeros biorreabsorvíveis e matriz de colágeno em uma cultura dermo-epidérmica promoveu uma maior proliferação celular e formação de uma pele bem estruturada para enxertos. Além disso, dispositivos associados a materiais poliméricos reduzem a probabilidade de contração do enxerto após o implante.

A contração do enxerto é um dos principais problemas na obtenção de substitutos biológicos de pele. Geralmente a camada celular, pobre em propriedades físicas, sofre uma contração significativa, reduzindo o tamanho do enxerto quando as células são retiradas do cultivo *in vitro* e implantadas (HODGKINSON e BAYAT, 2011).

Biomateriais associados a polímeros e derme (alogênica ou xenogênica), por exemplo, são considerados ótimos materiais para a regeneração cutânea por apresentarem propriedades que auxiliam na reconstrução da derme ou da espessura total da pele perdida e devido a sua capacidade de reduzir a formação de cicatrizes e contração do enxerto (Peramo e Marcelo, 2010). Materiais à base de derme xenogênica, como no caso da pele suína, são largamente utilizados há décadas e até hoje são bem aceitos como curativos cutâneos por médicos e cientistas. A derme suína é a que mais se assemelha com a derme humana (cerca de 76%). A disposição e a estrutura do colágeno suíno e humano são semelhantes, apesar da derme suína ser mais densa e conter menos elastina (CAMPBELL *et al.* 2010).

Além disso, a regeneração dérmica suína ocorre em aproximadamente 30 dias, sendo praticamente igual à regeneração humana, que ocorre por volta de 30 dias (LIU *et al.* 2010). Segundo Liu e colaboradores (2010) após análise histológica e ultramicroestrutural o tecido cutâneo da espécie de mini pig estudado apresentou a mesma estratificação do tecido humano e períodos muito próximos de regeneração pós implante, evidenciando assim tais semelhanças entre suínos e humanos.

De acordo com o levantamento de Yannas e colaboradores (2011) existem diversas similaridades entre a regeneração de pele humana e a de espécies de suínos, o que justifica a utilização, por exemplo, de matrizes dérmicas xenogênicas suínas como suportes para o tratamento de traumas de pele em pacientes, sendo essas matrizes cultivadas ou não com células epidérmicas ou dérmicas. Hodgkinson e Bayta (2011) relataram estudos que desenvolveram substitutos utilizando matrizes dérmicas decelularizadas sob cultivo de células autólogas e reforçam que tais matrizes são excelentes *scaffolds* para migração e proliferação celular por oferecerem um ambiente propício às células.

Já Kellouche e colaboradores (2007) compararam dois cultivos de diferentes tipos de fibroblastos (derme humana e banco de células) sobre matrizes dérmicas alogênicas e observaram que ao fim de 21 dias de implante em ratos nude com queimaduras de terceiro grau, houve um crescimento celular similar entre os tipos de fibroblastos, demonstrando, por meio de teste imuno-histoquímicos, que o suporte dérmico é ideal para o cultivo celular.

Substitutos dérmicos são considerados suportes ideais também por serem utilizados em regiões de difícil implantação ou até mesmo de difícil regeneração, assim como pesquisado por Tang e colaboradores (2011) que promoveram a regeneração tecidual, por meio de uma matriz dérmica alogênica acelular sob cultivo autólogo, em 14 pacientes durante 4 anos, com queimaduras graves no rosto. Durante a pesquisa, os resultados mostraram que entre 2 a 3 semanas houve neoformação tecidual no local da lesão, provando que matrizes dérmicas acelulares têm sido utilizadas com sucesso no tratamento de queimaduras espessura integral ou parcial, e na reconstrução de áreas que apresentam recuperação tardia. Matrizes dérmicas acelulares também são estudadas para a regeneração funcional de queimaduras em mãos sendo este outro local de difícil reconstrução, como descrito por Askari e colaboradores (2011) que, após um estudo em 9 pacientes com queimaduras graves e comprometimentos motores, obtiveram a regeneração e movimentação motora de suas mãos.

2.2.2 *Materiais poliméricos para aplicação clínica*

Atualmente, diferentes tipos de materiais poliméricos têm sido amplamente utilizados na área clínica e cirúrgica para o controle de drogas, suturas cirúrgicas, implantes para fixação de fraturas e regeneração de tecidos ou órgãos, principalmente devido a sua alta biocompatibilidade com o organismo humano (BOCCACCINI *et al.* 2005; SEAL *et al.* 2001).

Além disso, segundo Bohlmann (2005) esses biomateriais podem ser classificados em biodegradável, bioabsorvível ou biorreabsorvível, de acordo com a necessidade do implante. Biodegradável é o termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos, que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vitro*, mas sem eliminação de produtos ou subprodutos no organismo humano (MINUTH *et al.* 2005; VERT, 1992); esses polímeros também podem ser degradados pelo próprio organismo, afetando a integridade do material (GIBSON *et al.* 2008). Dispositivos bioabsorvíveis são aqueles que podem se dissolver nos fluidos corpóreos do indivíduo sem qualquer quebra ou diminuição de sua cadeia macromolecular. Já os biorreabsorvíveis demonstram sua degradação por meio da diminuição de tamanho (Figura 2), e

são reduzidos a CO₂ e água, sendo reabsorvidos pelas vias metabólicas do organismo (BARBANTI *et al.* 2005; VERT, 1992).

Dentre esses biomateriais biorreabsorvíveis encontra-se uma classe de polímero sintético composta por poliésteres. Fazem parte desse grupo o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico), (PCL), poli (p-dioxanona) (PPD), poli(L-ácido láctico) (PLLA), entre outros (BARBANTI *et al.* 2005; REZWAN *et al.* 2006).

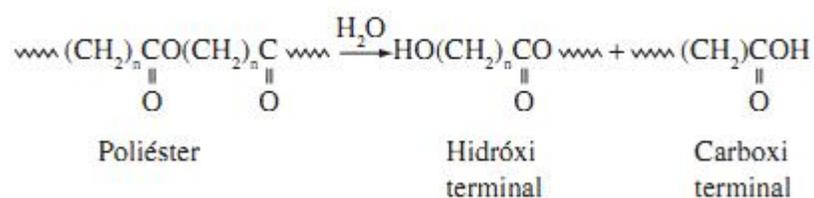


Figura 2. Degradação hidrolítica de poliésteres. **Fonte:** BARBANTI *et al.* 2005, pp. 13-21.

De acordo com Bohlmann (2005) dispositivos à base de poli (ácido láctico) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) são comercializados desde a década de 70, sendo largamente utilizados, entre outros, para o recobrimento de lesões e considerados um dos polímeros mais estudados da atualidade. A descoberta do PLA ocorreu em 1960, por Kulkarni e colaboradores, descrevendo assim seu uso médico por meio de suturas cirúrgicas para a reconstrução de fraturas mandibulares em cães (MAURUS *et al.* 2004).

Polímeros como o PLA possuem alto potencial terapêutico devido a sua fácil degradabilidade, o que auxilia no reparo de lesões no organismo em um período de tempo limitado (VERT, 2006; MACNEIL, 2008). Além do mais, estudos têm se focado na produção de polímeros que apresentem características mecânicas e físico – químicas ideais para o implante, e que sejam funcionais e se assemelhem à estrutura natural de órgãos e tecidos (BARBANTI *et al.* 2005). Esses estudos vêm sendo realizados há muitas décadas a fim de melhorar tais propriedades mecânicas, físico-químicas e bioquímicas, como o pesquisado por Chen e colaboradores (2000), que relatam a importância da estrutura química do material polimérico, devendo esta ser a mais compatível possível ao organismo humano. Durante sua pesquisa Chen e colaboradores (2000)

também afirmam que a associação de arcabouços poliméricos a matérias naturais aumenta ainda mais essa biocompatibilidade. Além disso, as propriedades mecânicas de biopolímeros sintéticos podem ser rigorosamente controladas, e, portanto, podem ser utilizados *in vitro* para demonstrar o funcionamento de características viscoelásticas em cultivo de células animais ou humanas.

A estrutura química do PLA pode ser constituída por meio de duas formas organizacionais de seus monômeros: L-ácido láctico ou D-ácido láctico. A polimerização desses monômeros isoladamente leva à formação de um polímero semicristalino, enquanto que sua mistura resulta em um polímero totalmente amorfo. O polímero poli (L-ácido láctico) ou PLLA apresenta cristalinidade em torno de 37% e possui capacidade de formação de fibras fortes, apresentando grande resistência mecânica, o que o torna um excelente suporte biomédico. Devido ao seu caráter hidrofóbico, o tempo de degradação é lento e por isso dependendo da aplicação clínica faz-se necessário a incorporação de aditivos para a diminuição desse período longo de degradação (MOTTA *et al.* 2006).

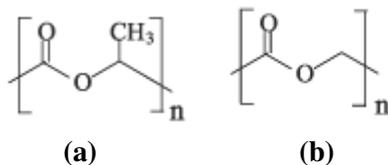


Figura 3. Estrutura química dos monômeros PLA (a) e PGA (b). **Fonte:** NAIR et al. 2007, pp. 762-798

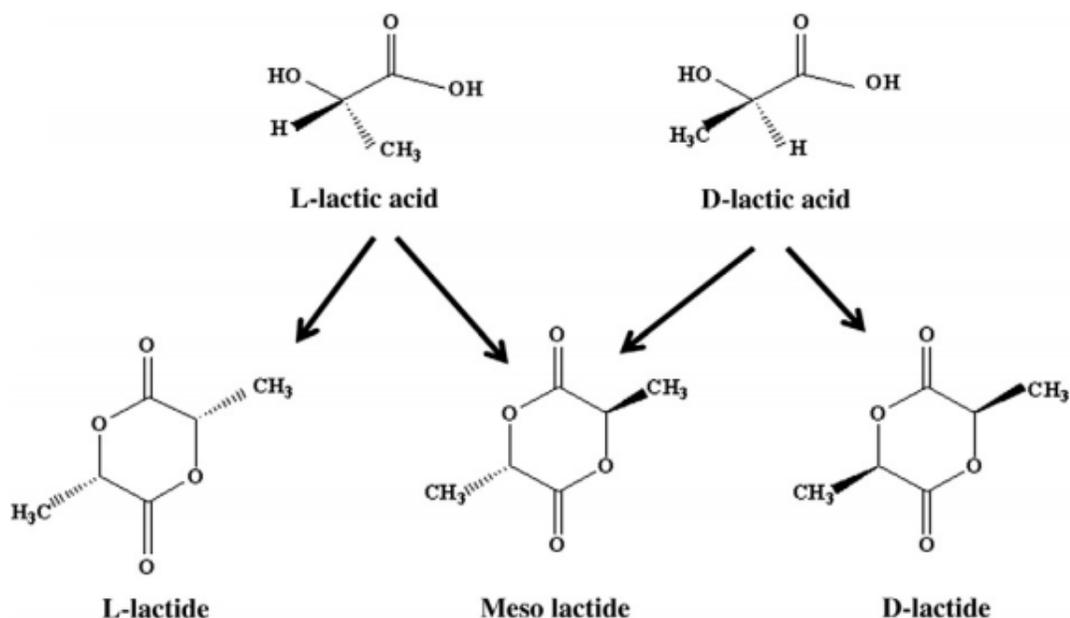


Figura 4. Diferentes formas de estruturas derivadas dos monômeros L-ácido láctico e D-ácido láctico. **Fonte:** NAMPOOTHIRI et al. 2010, pp. 8493-8501.

Em estudos de Minuth (2005) foi demonstrado que a incorporação desses aditivos ao material polimérico, como, por exemplo, o trietil citrato de sódio, um plastificante polimérico, pode potencializar suas propriedades físico-químicas e mecânicas, em determinadas aplicações. As propriedades mecânicas e de degradação do PLA podem ser modificadas e adequadas por meio de ajustes em parâmetros como tamanho de suas cadeias, grau de cristalinidade, entre outros, que melhoram o seu desempenho, como em preparo de membranas para curativo de lesões cutâneas, devido ao aumento de sua flexibilidade e diminuição do tempo de degradação no organismo durante o processo de cicatrização (ALMEIDA, 2010; SCAPIN, 2003).

Normalmente, o trietil citrato de sódio é utilizado como aditivo na indústria alimentícia. Entretanto, também tem sido incorporado a dispositivos em pesquisas científicas para área clínica, por melhorar suas propriedades mecânicas, sendo utilizado em revestimento para reduzir a fragilidade, aumentar a capacidade de deformação de membranas a coalescência filmes (DAS *et al.* 2008). O aumento da deformação desses suportes após a introdução do plastificante ocorre principalmente devido à alteração de sua configuração estrutural, reduzindo sua temperatura de

transição vítrea, mas sem alterar sua composição química ou propriedades termomecânica (PEREGO e CELLA, 2010). A concentração de aditivo incorporado ao material também é de extrema importância para que não haja alterações em suas propriedades mecânicas (PEREGO e CELLA, 2010).

De acordo com estudos realizados por Scapin (2003) a associação do trietil citrato ao polímero biorreabsorvível PLLA aumentou a interação celular entre o dispositivo e o organismo, devido à formação de poros e maior flexibilidade do material, além de ter se degradado muito mais rapidamente. Essa interação tecido-suporte polimérico também foi observada por Luciano e colaboradores (2003) que por meio da análise de membranas de PLLA com diferentes concentrações de trietil citrato obteve bons resultados *in vivo*, principalmente com a membrana PLLA/Trietil citrato 5%, comprovando que a incorporação do plastificante aumenta a interação celular.

Estudos como o de Lazzeri e colaboradores (2005) também demonstraram que matrizes de PLLA/Gelatina sob cultivo de fibroblastos durante 8 semanas apresentaram rápida proliferação e adesão ao material analisado. Foram comparadas também matrizes com e sem gelatina e observou-se que em presença da gelatina, houve maior adesão celular, o que prova a importância de dispositivos bifásicos, como polímeros associados a matrizes de colágeno, para o crescimento celular.

Pesquisas recentes relatam que nanofibras de PLLA com modificação em sua superfície apresentaram significativo aumento na adesão e espraiamento das células sobre o material. A proliferação celular sobre a nanofibra foi mantida por 2 semanas com relativo aumento na produção de componentes da matriz extracelular (NAIR *et al.* 2007).

Autores como Kasaj (2008), que também utilizam biomateriais, analisam diferentes tipos de dispositivos para regeneração tecidual, como materiais poliméricos biorreabsorvíveis associados a colágeno porcino, e concluem que tais dispositivos biológicos obtiveram maior interação celular em comparação a outros materiais não biorreabsorvíveis como o politetrafluoretileno (PTFE).

Pesquisas clínicas têm demonstrado que o uso de dispositivos poliméricos, como substitutos dérmicos ou equivalentes que contenham colágeno ou matriz dérmica, em associação com as células do próprio paciente ou de doadores, cultivadas *in vitro* sobre suportes poliméricos biorreabsorvíveis têm proporcionado melhores resultados, após o implante (LAZIC e FALANGA, 2011).

2.2.3 Polímeros biorreabsorvíveis e mecanismo de ação no processo de regeneração tecidual

No campo da engenharia tecidual o uso de biomateriais como suporte celular é fundamental para a reconstrução de órgãos e tecidos. Na década de 70, inúmeras técnicas foram desenvolvidas visando a reconstrução de tecidos e órgãos lesionados, como no ano de 1975, em que Rheinwald e Green desenvolveram procedimentos importantes para a regeneração tecidual a partir de implantes celulares, que posteriormente foram largamente utilizados por pesquisadores, em associação com biomateriais, principalmente na área clínica para o estudo de queimaduras ou lesões de pele no geral (LAZIC e FALANGA, 2011).

Tais estudos da área biomédica levaram ao desenvolvimento de materiais poliméricos com características químicas desejáveis para aplicações clínicas, como a morfologia da superfície, porosidade e degradação, para que auxiliassem na regeneração tecidual (STOCK e VACANTI, 2001). Esses parâmetros têm um papel significativo na adesão, proliferação, diferenciação celular e secreção de moléculas de matriz extracelular, durante o processo de cicatrização e devem, portanto, serem considerados fundamentais para o desenvolvimento de novos polímeros (PÉRTILE, 2007).

Pesquisas recentes têm se focado na utilização de elementos químicos básicos e estruturas químicas simples para a produção de biomateriais como arcabouços celulares, pois na ausência de peptídeos de adesão, as células interagem com o arcabouço por meio de proteínas adsorvidas, e nesse sentido a hidrofiliabilidade do material polimérico é extremamente importante (PLACE,

2009). Contudo, essa interação entre os biomateriais e/ou células com o implante deve ser neutra, no sentido de que o implante não deve alterar as características físico-químicas ou biológicas naturais do organismo e não deve afetar as propriedades do implante (PERAMO e MARCELO, 2010).

Além disso, o conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e um melhor entendimento dos processos em nível celular durante a adesão podem colaborar para o desenvolvimento de novos biomateriais e para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (PÉRILE, 2007).

A principal função dos suportes poliméricos é proporcionar suporte para o crescimento celular e, servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original até a neoformação tecidual e sua biorreabsorção completa (BARBANTI *et al.* 2005).

Nesse sentido, a adesão celular ao substrato é necessária para uma boa interação suporte-célula. No entanto, o substrato não precisa apresentar componentes de matriz extracelular para que a adesão celular ocorra, a similaridade físico-química é geralmente desejada quando o objetivo é promover diferenciação celular ou uma interação mais efetiva entre o polímero e o local implantado (PLACE, 2009; SANTOS JR *et al.* 2007).

O processo de adesão celular tem como etapa inicial a adsorção de proteínas provenientes de fluidos biológicos sobre as superfícies do substrato. Esta adsorção é diretamente relacionada às cargas da superfície e tem influência direta sobre a adesão celular (WILSON *et al.* 2005). Wilson e colaboradores (2005) definem a fase de adesão celular, como um processo que ocorre num curto espaço de tempo, no qual as ligações físico-químicas entre as células e substrato são resultantes de forças iônicas (van der Waals), que se formam entre moléculas do substrato e as várias moléculas biológicas, como as proteínas do citoesqueleto, da membrana celular e de matriz extracelular. Essa cadeia apresenta interações que resultam na transdução de sinais, promovendo a transcrição de fatores e conseqüentemente regulação da expressão de genes (ANSELME, 2000).

Por esta razão, células isoladas não podem formar tecidos, pois requerem um ambiente específico para que a adesão celular ocorra, o qual normalmente inclui a presença de um material suporte, que sirva como arcabouço, agindo como uma matriz para o crescimento, servindo como suporte físico e substrato adesivo para o crescimento celular após o implante (STOCK e VACANTI, 2001).

Assim é preciso entender que as células são provenientes de enorme riqueza de informações de seus ambientes, incluindo o material que as envolve e sua matriz extracelular (MEC). O biomaterial deve assumir esse papel instrutivo no meio extracelular, a fim de manter a viabilidade celular e comportamento das células sobre controle, como por exemplo, o implante de matriz dérmica induz à proliferação e diferenciação celular, produzindo matriz extracelular e subsequente formação tecidual (PLACE, 2009; GALLAGHER *et al.* 2006). E dessa maneira, a diversidade de respostas celulares a diferentes materiais evidencia a capacidade das células de discriminar quimicamente o suporte, de se adaptar a ele e de aderir ou não à sua superfície, já que as características da superfície do material irão determinar esse comportamento celular e definirão o grau de sucesso do implante (ANSELME, 2000).

Juntamente a isso, Peramo e Marcelo (2010) afirmam que é necessário compreender quais os mecanismos de ação do suporte enxertado durante o processo de regeneração do local do trauma. Tal procedimento baseia-se em:

- 1) colonização celular (fibroblastos), onde células da periferia da lesão migram para o local do implante;
- 2) produção de fatores de crescimento, que estimulam a migração de outros tipos celulares e incentiva a proliferação celular;
- 3) migração de queratinócitos ao redor do suporte;
- 4) resposta imune.

Um largo número de queratinócitos é observado ao redor de lesões crônicas, no entanto, essas células não migram para dentro da área da ferida. Uma das explicações possíveis é a degradação da matriz extracelular por proteases que se apresentam em altas concentrações nesses tipos de feridas. O controle da síntese e/ou degradação da matriz extracelular parece ter

expressivas implicações na reconstrução da área lesionada. Uma matriz extracelular temporária é importante por promover um bom substrato para a migração celular como de queratonócitos e leucócitos, e por isso o biomaterial é considerado um importante suporte para a manutenção dessa matriz extracelular (PERAMO e MARCELO, 2010; STOCK e VACANTI, 2001).

Portanto, os polímeros devem apresentar propriedades físico-químicas e/ou mecânicas o mais próximas possível do tecido em que será implantado, a fim de manter a produção de matriz extracelular e consecutivamente a proliferação celular. Essas propriedades incluem um equilíbrio entre hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, distribuição eletrônica, dureza, elasticidade e força (GALLAGHER *et al.* 2006; SANTOS JR *et al.* 2004).

Existe uma relação entre hidrofiliabilidade e adesão celular. Além de outros parâmetros, substratos mais hidrofílicos tendem a promover melhor interação com as células (SANTOS JR *et al.* 2004).

Boa interação do suporte com células ou tecidos também depende da estrutura desses dispositivos. De acordo com a literatura, materiais mais porosos promovem maior crescimento celular e induzem a produção de componentes da matriz extracelular por essas células (SANTOS JR *et al.* 2007). A distribuição uniforme e as interconexões dos poros são importantes para facilitar a formação de tecidos (VAN SLIEDREGT *et al.* 1994). *In vivo*, a porosidade e as interconexões dos poros são essenciais para a proliferação de vasos, facilitando a nutrição dos tecidos ao redor do implante (PLACE, 2009).

Após experimentações de Paiva e colaboradores (2009) analisou-se que *scaffolds* de PLLA porosos, desenvolvidos a partir do método de difusão induzida por separação de fase, apresentou poros homogêneos em sua estrutura interna, promovendo difusão de nutrientes e produção de matriz extracelular de fibroblastos cultivados sobre o suporte.

Assim, uma das propriedades dos biomateriais, considerada ideal, é a de induzir a proliferação natural do tecido, por meio da interação entre o material e as células do organismo, reduzindo minimamente a sinalização de respostas inflamatórias (VAN SLIEDREGT *et al.* 1994;

SEAL *et al.* 2001). E diante do exposto, verifica-se que a busca, na área de regeneração de pele, por materiais que sejam capazes de ajudar na reconstrução tecidual tem sido expressiva, de modo a desenvolver substitutos capazes de cicatrizar feridas por completo em períodos relativamente curtos (PERAMO e MARCELO, 2010).

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação do dispositivo semelhante à derme humana

3.1.1 Preparação das membranas poliméricas

No início da experimentação dessa pesquisa, realizou-se um estudo piloto para avaliar qual concentração do plastificante trietil citrato de sódio (TCS) seria incorporado as membranas de poli (L-ácido láctico) (PLLA) e atenderia as necessidades exigidas para aplicação em questão. Preparou-se assim, membranas de PLLA-TCS nas concentrações de 5%, 7%, 10% e analisou-se por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e macroscopicamente, qual concentração de plastificante presente nas membranas de PLLA-TCS se mostraria menos frágil e quebradiça. A concentração de 5% foi a que mostrou-se mais adequada para a pesquisa, por não estar quebradiça, e sim muito flexível e ter apresentado alta porosidade pela MEV em comparação com as outras concentrações testadas.

Portanto, membranas de PLLA ($M_w: 267.000 \text{ g.mol}^{-1}$) na concentração de 10% (w/v) com adição de 5% (w/w) de aditivo Trietil Citrato de Sódio foram preparadas pelo método de evaporação do solvente utilizando-se clorofórmio (Merse). O polímero empregado (PLLA) foi sintetizado no Laboratório de Biomateriais – PUCSP, segundo procedimento de Motta e Duek (2006). A dissolução do polímero e do plastificante em clorofórmio foi realizada sob agitação durante 8h, à temperatura ambiente. A solução foi vertida sobre placas de vidros e o solvente evaporado de forma controlada, em cuba saturada de solvente, por aproximadamente 24h. Posteriormente, as membranas permaneceram em estufa a vácuo para evaporação de resíduos de solvente. Membranas de PLLA puras foram preparadas, seguindo o procedimento anterior e utilizadas como controle.

3.1.2 *Preparação da derme suína*

Para o preparo do dispositivo coletou-se fragmentos de 16cm² de pele de suínos da raça *Large White*, com aproximadamente 100 kg e 5 meses de idade, proveniente da fazenda Paineira, em Araçoiaba da Serra – SP. As amostras foram extraídas de acordo com Prasertsung e colaboradores (2007) e tratados segundo procedimento adaptado de Takami e colaboradores (2010), sendo primeiramente congelados a - 20°C por 24 horas e em seguida mergulhados em nitrogênio líquido a -196°C por 48 horas. Posteriormente os fragmentos foram imersos em solução de cloreto de sódio e incubados em estufa a 37°C por 12 horas. Após esse período a epiderme, e a hipoderme e anexos foram retirados mecanicamente com auxílio de pinça, lâmina de micrótomo e lupa (Leica Zoom 2000). Em seguida a derme foi mantida em solução de tampão fosfato salino (PBS) em estufa a 37°C por 10 dias para a eliminação de restos celulares. O PBS foi trocado diariamente durante o período de incubação. Os fragmentos foram cortados ao meio com auxílio de lâmina de micrótomo, congeladas a – 20°C novamente por 24 horas e liofilizadas por mais 24 horas.

3.1.3 *Preparação do dispositivo bifásico*

O dispositivo foi preparado associando os fragmentos de derme suína liofilizados às membranas de PLLA-trietil citrato de sódio, por meio do procedimento adaptado de Park (2007), borrifando-se clorofórmio na superfície do polímero para associação á derme suína, formando assim um dispositivo bifásico. Posteriormente o dispositivo foi mantido em estufa a vácuo por 48 horas para eliminação de resíduos do solvente e esterilizado com óxido de etileno (Acecil – Campinas/SP). O resíduo de óxido de etileno foi eliminado por evaporação em temperatura ambiente por um dia.

3.2 Caracterização das membranas de PLLA e PLLA-Trietil Citrato de Sódio (TCS)

As membranas de PLLA puro e PLLA-TCS foram comparadas por meio de ensaios de caracterização como Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ensaio Dinâmico Mecânico pelo módulo tração, Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^1H), Ângulo de Contato e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das membranas foi analisada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/UNICAMP), por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Zeiss, modelo EVO MA-15. Para a realização desse ensaio, a membrana polimérica foi fragmentada e análise realizada na superfície e superfície de fratura (obtidas após congelamento em nitrogênio líquido) do material polimérico.

3.2.2 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho está fundamentada na absorção de radiação por moléculas orgânicas. A Transformada de Fourier (TF) auxilia na compreensão e simplifica os resultados obtidos após essa absorção de energia. Tal efeito ocorre quando os conteúdos energéticos da radiação infravermelha incidente e do campo elétrico gerado pelas ligações químicas são similares, sendo associado a comprimentos de onda específicos (Araujo, 2007). As análises de FTIR foram obtidas na região de 4000 a 650 cm^{-1} , em amostras na forma de membranas, conduzidas pelo espectrômetro BOMEN MB-Séries Perkin-Elmer (resolução 4 cm^{-1} ; ganho 1; 4000 a 700 cm^{-1} , 08 varreduras), obtidos pela Central Analítica – IQ/Unicamp, em

Campinas. O software Opus 4.2 (Bruker, Alemanha) apresentou os espectros resultantes após as análises.

3.2.3 *Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³C e ¹H)*

Os espectros de RMN ¹³C e ¹H foram obtidos pela Central Analítica – IQ/Unicamp, por espectrofotômetro GEMINI 300BB, a 75 MHz para RMN ¹³C e 300 MHz para RMN ¹H. Tubos de 5 mm de diâmetro e solvente clorofórmio deuterado foram utilizados para o preparo das amostras, e em concentração de 5% em massa polimérica, para os dois espectros realizados (RMN ¹³C e RMN ¹H), à temperatura ambiente.

3.2.4 *Ângulo de Contato*

Medidas do ângulo de contato foram realizadas por meio do goniômetro de ângulo de contato Ramé-Hart Mod. 100, do Laboratório de Plasmas Tecnológicos – Unesp, em Sorocaba. O software utilizado para as medidas foi o Ramé-Hart Imaging Software 2001 que realiza análise matemática avançada do perfil da gota. Para a realização das medidas utilizou-se água deionizada, sendo que o volume da gota formada sobre a superfície da amostra foi de 5µL.

3.2.5 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

As análises de DSC foram obtidas num equipamento TA Instruments (modelo 2920) pelo Laboratório de Biomateriais – PUCSP, em Sorocaba. As amostras foram submetidas ao primeiro aquecimento na faixa de 25 a 200°C, resfriamento de 200°C a -50°C e um segundo aquecimento de -50 a 200°C, utilizando-se velocidade de 10 °C min⁻¹ em todos os processos, em atmosfera de

nitrogênio. Foram utilizadas massas de aproximadamente 7-10 mg, em suportes de alumínio herméticos.

3.3 Caracterização do dispositivo completo (derme+PLLA-TCS) antes da exposição às células fibroblásticas

3.3.1 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)

O comportamento mecânico das membranas de PLLA e PLLA-TCS, e do dispositivo completo, durante o ensaio de tensão versus deformação, foi determinado a partir de análises de DMA. Para isso utilizou-se o equipamento NETZSCH-Análises dinâmico-mecânico-242 da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/Unicamp). As amostras foram submetidas à deformação senoidal de 240 μ m de amplitude a uma frequência constante de 1,00 Hz na faixa de -100 a 200°C, a uma taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹, usando um sistema de tração.

3.3.2 Análise histológica do dispositivo

O dispositivo contendo matriz dérmica suína associada a polímero bioreabsorvível foi fixado em formol 10% por 4 horas e embebido em parafina. Os cortes histológicos foram preparados e corados, segundo Pereira (2006), sendo os cortes seccionados com navalhas descartáveis em micrótomo Leica RM 2245 a uma espessura de 4 μ m e as fitas obtidas colocadas em banho histológico, os cortes retirados com o auxílio de lâminas. As lâminas, já prontas, foram mantidas num suporte de madeira para secagem e posteriormente lavadas e novamente secas em estufa a 60°C, por 15 minutos. Foram utilizadas as seguintes colorações para análise em microscópio óptico com luz polarizada (Eclipse E800 – Nikon):

- Hematoxilina-Eosina (HE): distinção de componentes de núcleo celular e colágeno para confirmação da ausência de células no material;
- Picrosirius red: visualização de fibras elásticas – diferenciação da composição colágena da matriz extracelular presente no material.

3.3.3 *Microscopia Confocal*

Os cortes histológicos preparados anteriormente foram utilizados para análise de organização de fibras colágenas e interação celular por meio de microscopia confocal. Utilizou-se o equipamento Invertido Zeiss Axio Observer.Z1 LMN NDD 780, do Laboratório de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (Instituto de Física/Unicamp). As lâminas foram analisadas num comprimento de onda de 470µm em segunda harmônica.

3.4 *Caracterização das membranas poliméricas associada à derme suína após exposição às células de fibroblastos humanos*

3.4.1 *Procedimentos de cultivo de células fibroblásticas*

A linhagem celular de fibroblasto (VERO) foi adquirida pelo Instituto Adolfo Lutz. O meio de cultura utilizado é específico para esse tipo celular, meio 199 (Cultilab). A esse meio de cultura foi adicionado antibiótico e antifúngico (Sigma - Aldrich).

Após a adição da linhagem celular no meio de cultura, as células foram contadas e distribuídas em frascos de cultura (*Corning*), com uma concentração de 1×10^5 células por cm^2 . Foram, então, incubados a 37°C com 5% de tensão de CO_2 . O cultivo celular foi repicado uma vez por semana. Os repiques foram realizados a partir da confluência das linhagens celulares.

3.4.2 Viabilidade celular

Para este ensaio utilizou-se uma cultura de células da linhagem VERO. O procedimento foi realizado segundo a literatura pesquisada (ISO 10993-5E, 2009). O meio de cultura utilizado foi o meio 199 suplementado com 10% de SFB. A técnica empregada no ensaio de citotoxicidade direta e adesão celular, desenvolvida por Mosmann (1983), utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo), que é clivado somente por células vivas e metabolicamente ativas, formando o precipitado azul denominado formazan, detectável espectrofotometricamente. Nos ensaios de adesão e citotoxicidade, os tempos de incubação foram de duas e vinte e quatro horas, respectivamente.

Para a realização desse ensaio, primeiramente, as membranas (amostras com 6 ou 7 mm de diâmetro) associadas a derme suína acelular, previamente esterilizadas com óxido de etileno, foram incubadas em placa de 96 poços contendo meio 199 sem SFB durante 24 horas à temperatura de 37°C em estufa. Após esse período, retirou-se o meio e em cada poço adicionados 200 µL de uma suspensão contendo 2×10^4 células/mL de meio 199 suplementado com 10% de SFB. O sistema foi mantido à temperatura de 37°C em estufa para cultura de células pelo tempo desejado (24 horas para o teste de citotoxicidade, duas horas para o ensaio de adesão) quando então, os sobrenadantes foram retirados e os poços lavados (três a quatro vezes) com 100 µL de meio 199 contendo ou não 10% de SFB.

Após a lavagem, adicionou-se 200 µL de meio 199 puro contendo 20 µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio MTT (5mg/mL). As placas foram mantidas por quatro horas à temperatura de 37°C no escuro. A etapa seguinte consistiu na retirada dos sobrenadantes e lavagem dos poços (três vezes) com tampão PBS. A extração e solubilização do produto formado (formazan) foram realizadas pela adição, em cada poço, de 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). Transferiu-se, então, 100 µL das soluções contidas em cada poço para uma nova placa e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de placas ELISA (Elx – 800 – UV, Bio-Tek Instruments, EUA), com emprego de filtro com comprimento de onda de 570 nm. As mitocôndrias de células vivas, por meio da enzima succinato dehidrogenase, são capazes de

reduzir a substância amarelada solúvel em água MTT convertendo-a em um composto insolúvel em água, o formazan, o qual é solubilizado pelo DMSO. A quantidade de formazan produzida, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células vivas. Os valores médios de absorvância de cada uma das condições experimentais foram obtidos por meio de análise estatística dos resultados utilizando-se o teste t-Student.

Como controle para ambos os testes, adesão celular e citotoxicidade direta, foi utilizado a própria placa de cultivo celular de poliestireno.

3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após o cultivo de células fibroblásticas sobre o dispositivo completo, sua morfologia foi analisada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/UNICAMP), por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Zeiss, modelo EVO MA-15.

Para realização desse ensaio, as amostras foram fixadas durante 1 hora à temperatura ambiente em solução fixadora contendo os seguintes reagentes (Sigma): 1,25% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído, 0,03% ácido pícrico, 1% ácido tânico, dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Sigma) por 15 minutos e desidratadas em etanol em concentrações crescentes.

As amostras contendo células VERO foram submetidas ao procedimento de ponto crítico, em seguida, metalizadas por deposição de uma fina camada de ouro (Sputter Coater BAL-TEC SCD 050) e visualizadas por MEV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização das membranas de PLLA puro e PLLA-TCS

Os ensaios realizados para a caracterização das membranas poliméricas foram ressonância magnética nuclear de próton e carbono treze, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier, calorimetria exploratória diferencial, ângulo de contato, ensaio dinâmico mecânico e microscopia eletrônica de varredura.

4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

O intuito desse ensaio foi verificar as alterações detectadas nas membranas de PLLA após a adição do plastificante trietil citrato de sódio (TCS).

A figura 5 apresenta a estrutura química do poli (L-ácido láctico) e do plastificante trietil citrato de sódio.

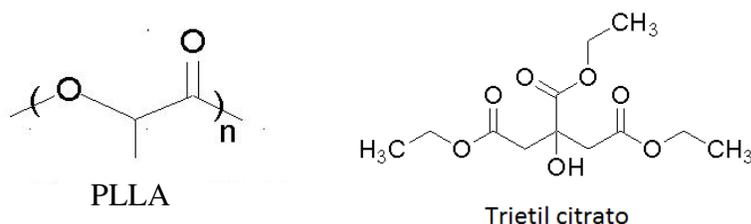


Figura 5. Estrutura química do PLLA e do aditivo trietil citrato de sódio. **Fonte:** WOO *et al.* 1995, pp. 415-421

Para efeito de comparação foram analisados os espectros do PLLA puro e do PLLA com plastificante, separadamente.

Os espectros de RMN de H^1 para o PLLA puro apresentam claramente os deslocamentos característicos desse polímero. A figura 6 mostra os sinais referentes ao H proveniente do CH 5,15 ppm (b), e o sinal referente ao grupo CH_3 em 1,58 ppm (a), estando de acordo com Kricheldorf e Sumbél (1988). Já o pico a 7,3 ppm (c) corresponde às impurezas do solvente $CDCl_3$ mostradas pelo grupo $CHCl_3$.

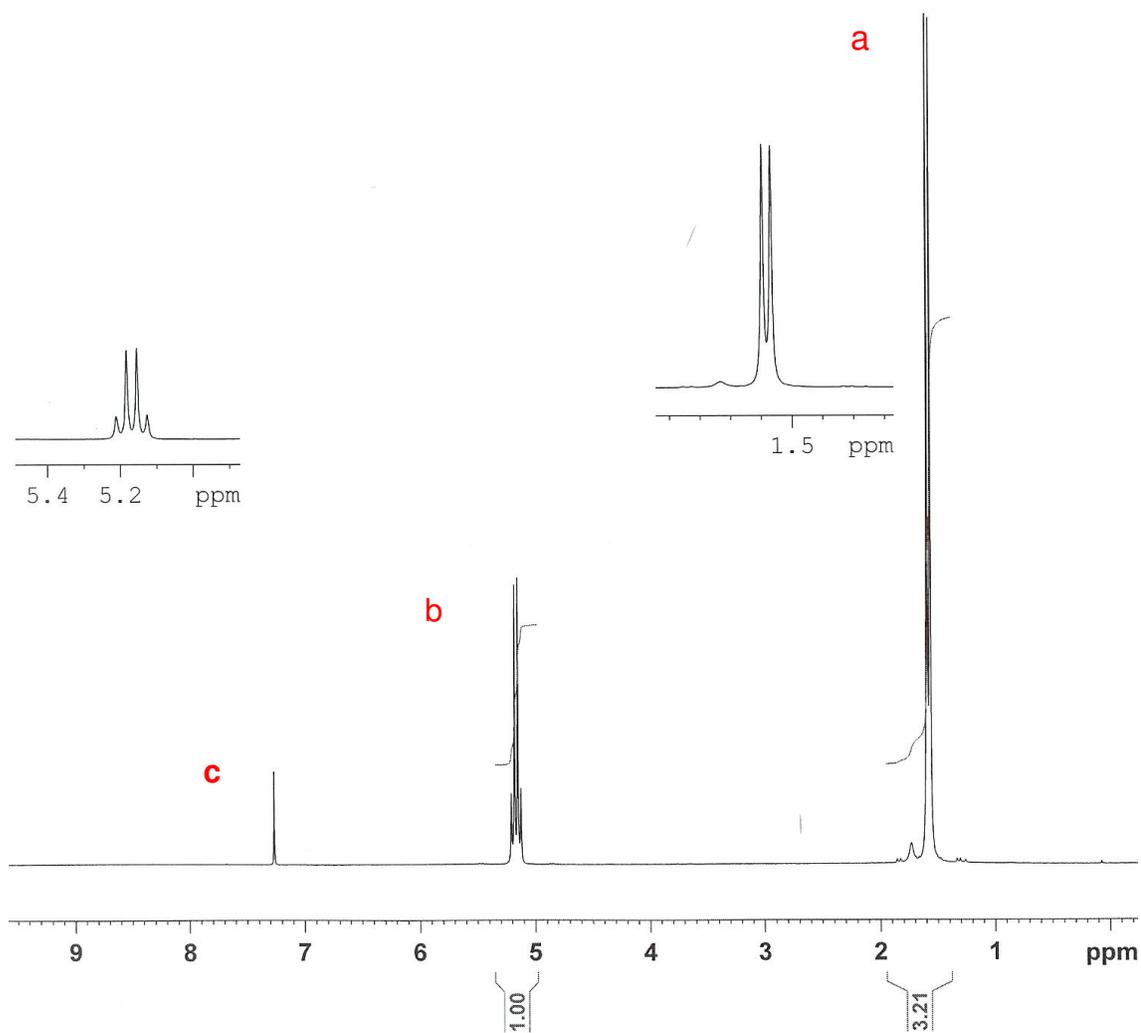
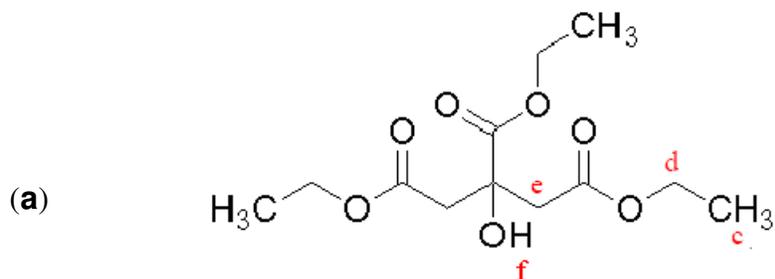


Figura 6. Espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN^1H) referente ao PLLA puro. **Fonte:** MOTTA E DUEK, 2006, pp. 26-32.

O espectro de RMN^1H do polímero PLLA na presença do plastificante (Figura 7b) já apresenta um número bem maior de deslocamentos, além dos sinais mencionados anteriormente referentes aos prótons característicos do PLLA (CH em 5,15 ppm, e o sinal referente ao grupo

CH₃ em 1,58 ppm). Os sinais característicos do trietil citrato aparecem nos seguintes deslocamentos: em 1,34 ppm (c) referente ao grupo CH₃-CH₂O; no pico 2,8 ppm (e) em um quarteto atribuído ao grupo CH₂-C(OO); em 4,16 ppm (d) atribuído ao CH₂OCO, e em 7,3 ppm (f) referente ao COH dos grupos terminais do trietil citrato. O espectro do PLLA-TCS foi comparado à estrutura química do trietil citrato como mostra a figura 7a.



Fonte: WOO *et al.* 1995, pp. 415-421

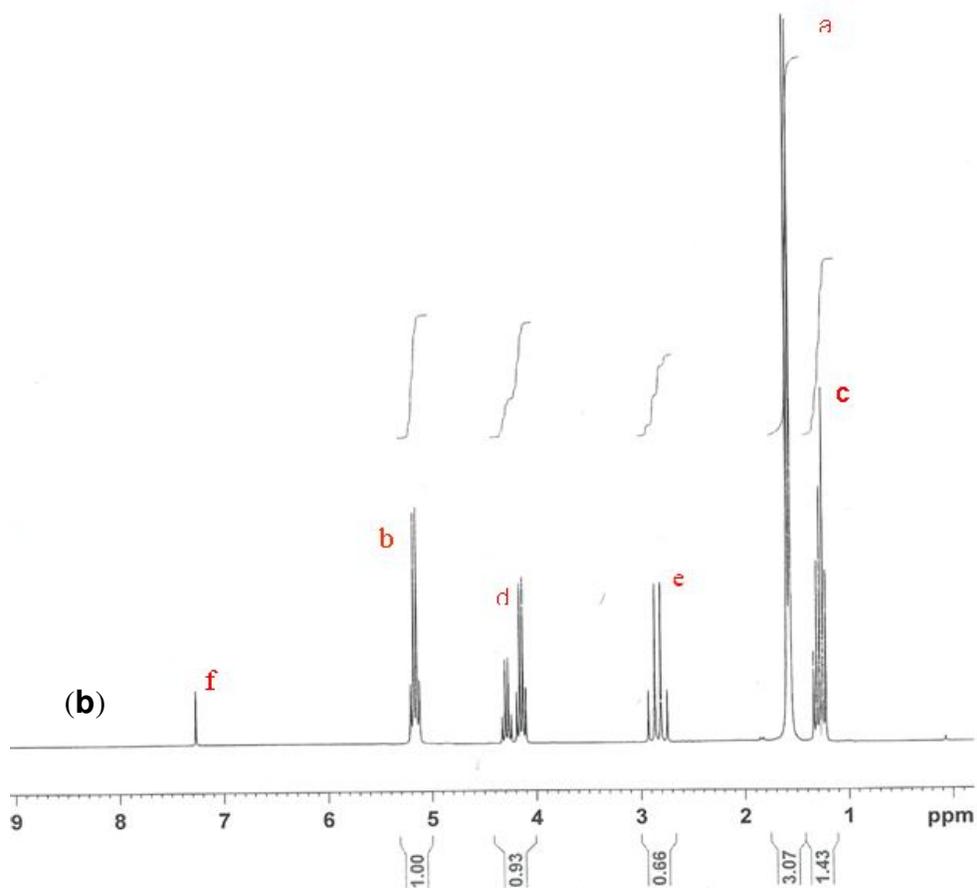


Figura 7. Em (a) representação dos grupos funcionais da estrutura química do Trietil citrato. Em (b) espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) referente ao PLLA-TCS.

O espectro de RMN¹³C, Figura 8, mostram 3 picos característicos do PLLA puro. O primeiro pico em 16,6 ppm (a) referente ao grupo CH₃, o segundo em 69 ppm (b) referente ao grupo CH e por fim um pico em 169,6 ppm (c) referente ao C=O. O pico 76,5 ppm se refere ao solvente CDCl₃. Os picos encontrados no espectro encontram-se de acordo com a literatura pesquisada (WOO *et al.* 1995).

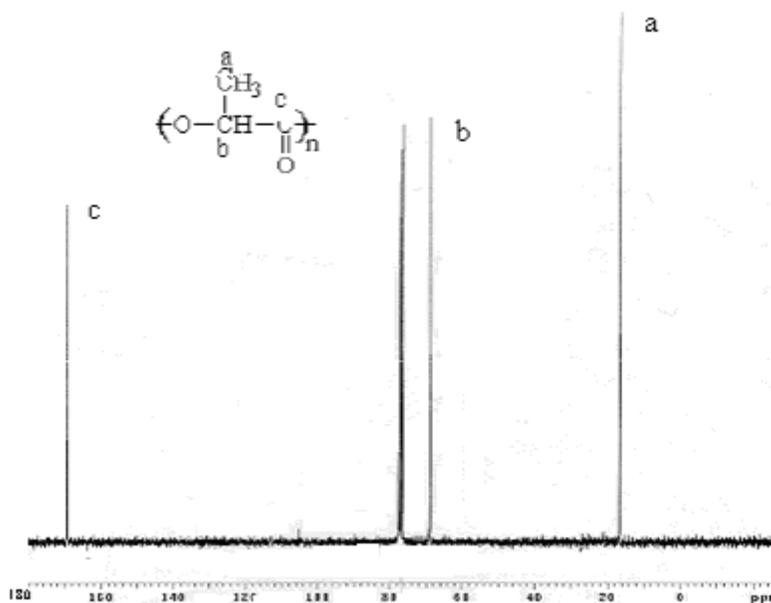


Figura 8. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN¹³C) PLLA puro.

O espectro de RMN¹³C do trietil citrato, Figura 9b, mostra os sinais característicos dos carbonos presentes em sua estrutura química, baseado nos dados da Figura 9a.

O espectro de RMN¹³C da membrana de PLLA-TCS, Figura 10, representa os picos presentes tanto no espectro do PLLA puro como no espectro do plastificante.

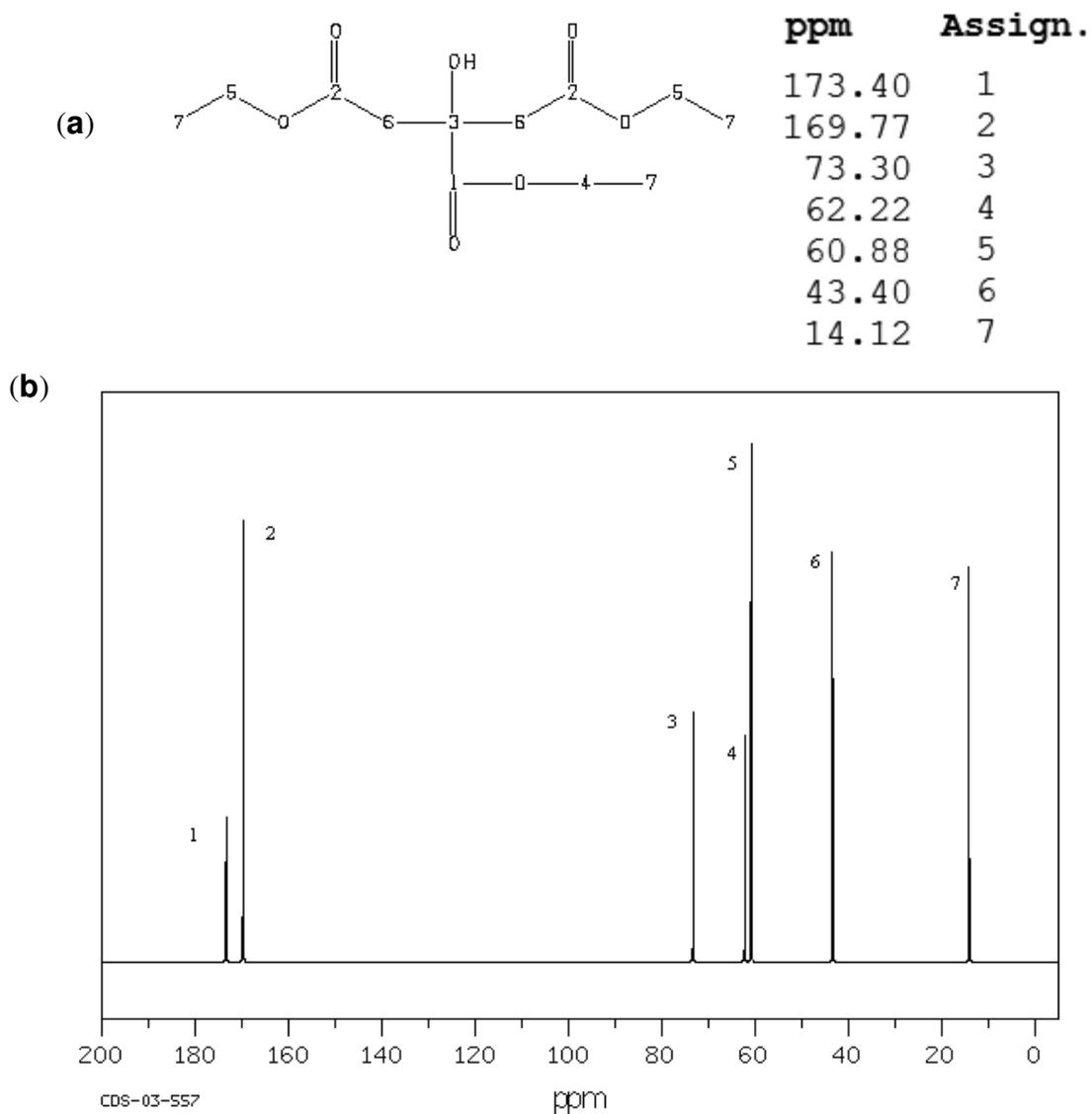


Figura 9. Em (a) dados da estrutura química do trietil citrato. Em (b) Espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹³C) referente ao trietil citrato. **Fonte:** Win Chemical. Disponível em: [www.win-winchemical](http://www.win-winchemical.com). Acesso em: 24 ago. 2011.

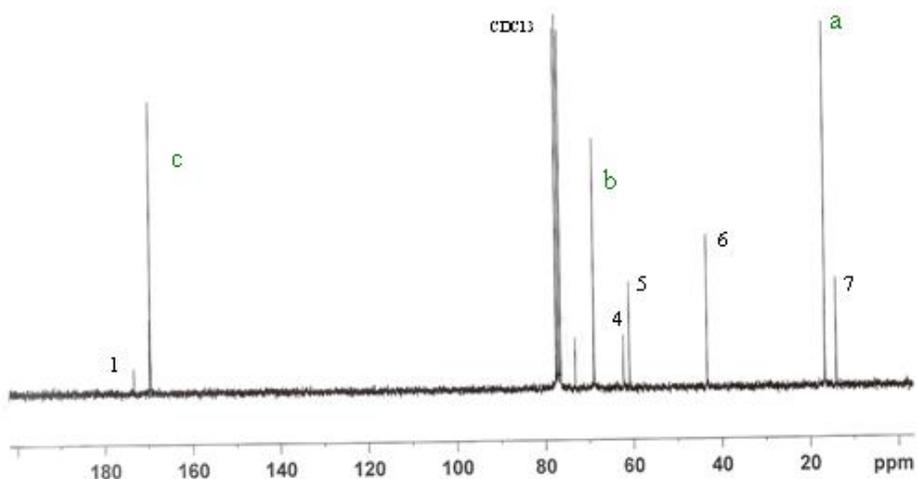


Figura 10. Espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMNC¹³) referente ao PLLA-TCS.

4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FTIR do polímero PLLA puro e do PLLA-TCS foram realizados pela técnica de reflexão total atenuada.

A figura 11 compara os espectros do PLLA puro, do plastificante puro e do PLLA-TCS. O espectro do PLLA puro, Figura 11b, apresentou bandas características observadas nos picos: em 1453 cm^{-1} e em 1363 cm^{-1} referente à deformação angular da ligação C-H alusivo ao grupo CH_3 ; em 1128 e 1079 cm^{-1} da deformação axial da ligação C-O da ligação COO cm^{-1} (DRUMOND e WANG, 2004); em 1182 cm^{-1} apresenta na ligação C-C; além do pico característico dos poliésteres – em 1743 cm^{-1} referente à deformação axial da carbonila (C=O), e deformação axial simétrica e assimétrica na ligação C-H em 2946 e 29954 cm^{-1} , respectivamente.

Já no espectro do plastificante puro, Figura 11c, é possível detectar bandas similares ao do PLLA, em algumas regiões, como a banda característica da presença do grupo OH que ocorre na região próxima a 3500 cm^{-1} . Em função das bandas tanto do PLLA como do trietil citrato serem

bastante similares, a análise da composição PLLA-TCS (figura 11a) se diferenciou basicamente do polímero puro (PLLA) na constatação da banda em 3513 cm^{-1} referente ao estiramento OH.

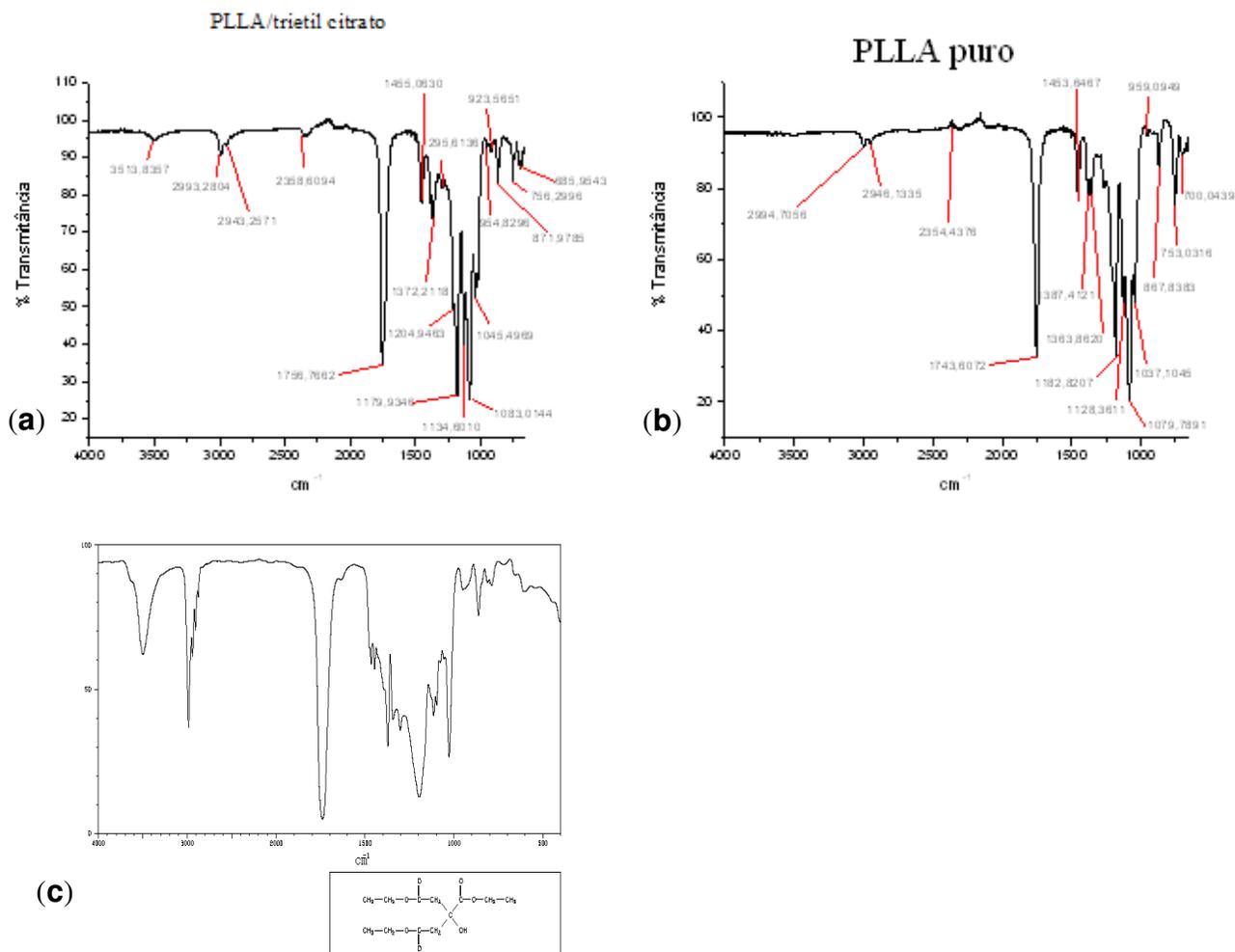


Figura 11. Espectros obtidos por FTIR. Em (a) PLLA-TCS; em (b) PLLA puro; em (c) trietil citrato puro (fonte: Win Chemical. Disponível em: www.win-winchemical.com. Acesso em: 24 ago. 2011).

No espectro de FTIR do PLLA-TCS, Figura 11a, observou-se um discreto deslocamento da banda do estiramento O-H, para maiores comprimento de onda em 3550 cm^{-1} , e 3500 cm^{-1} em relação ao trietil citrato puro. Esse deslocamento pode ser atribuído a ligações secundárias (pontes de hidrogênio) entre o PLLA e o trietil citrato.

4.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

A técnica conhecida como Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) analisa as propriedades térmicas dos materiais, principalmente a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_f), entalpia de fusão (ΔH_f), temperatura de cristalização (T_c) e entalpia de cristalização (ΔH_c).

A Figura 12 representa as curvas de DSC para o PLLA puro e com plastificante Trietil Citrato de Sódio.

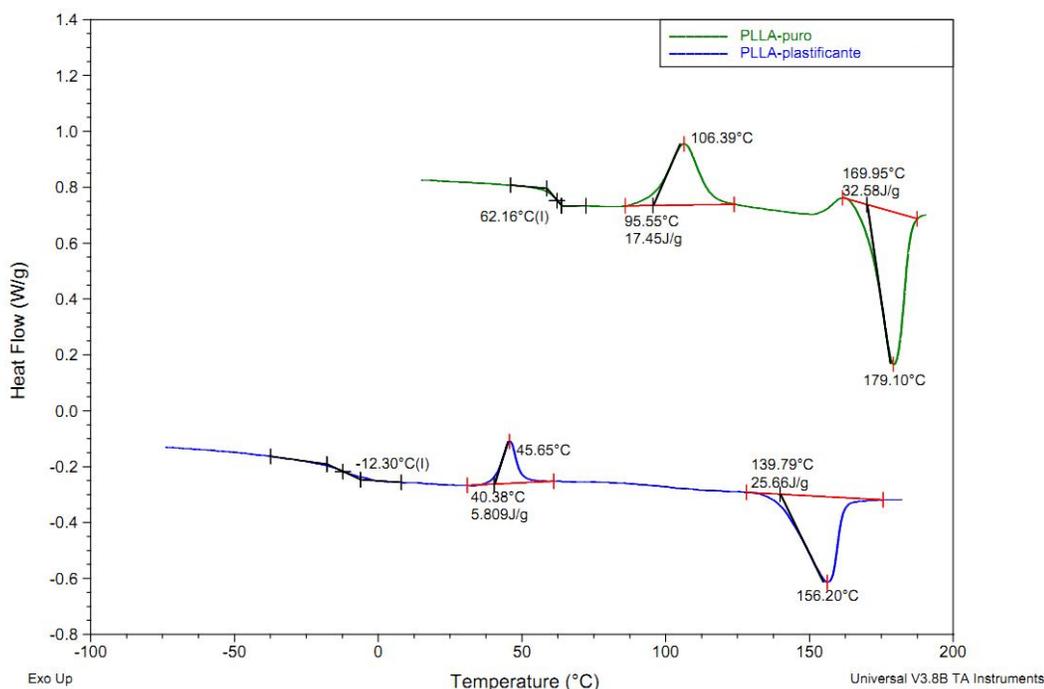


Figura 12. Curvas de DSC para membranas de PLLA puro e PLLA-TCS após o segundo aquecimento.

O termograma para PLLA puro durante o segundo aquecimento (figura 12) mostra a presença de temperatura de transição vítrea, temperatura de cristalização e temperatura de fusão, curva típica de polímero semi cristalino. Após adição do plastificante, verifica-se o mesmo comportamento, mas como esperado, os processos ocorreram em temperaturas inferiores.

Os valores resultantes de T_g , T_f , T_c , ΔH_f e ΔH_c para o PLLA puro, trietil citrato puro e PLLA-TCS foram descritos na tabela 1.

Tabela 1. Dados obtidos a partir das curvas de DSC para o PLLA puro, o PLLA-TCS e trietil citrato de sódio puro.

Composição	Aquecimento	T_g (°C)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_f (°C)	ΔH_f (J/g)
PLLA puro	2°	62	106	17,5	179	32,6
Trietil Citrato de Sódio puro	2°	-71	-21	20	5	4
PLLA/Trietil Citrato de Sódio	2°	-12	45	5,8	156	25,6

Mediante análise da tabela 1 pode-se verificar claramente uma diminuição acentuada na T_g do PLLA na presença do plastificante, além disso, tanto a temperatura de cristalização como a temperatura de fusão do PLLA diminuem consideravelmente, após adição do trietil citrato de sódio na composição da membrana do polímero, alterando seus valores de 106 °C para 45 °C em T_c e de 179 °C para 156 °C em T_f . Embora o plastificante influencie a T_g , parâmetro referente estritamente as regiões amorfas do polímero, indiretamente afeta a temperatura de cristalização e temperatura de fusão, como pode ser verificado pela tabela 1. Como o plastificante provoca uma separação entre as cadeias do polímeros, a cinética de cristalização é reduzida e conseqüentemente, a proporção de regiões cristalinas e a força entre as cadeias é reduzida. Isso explica a diminuição na temperatura de fusão para as amostras de PLLA-TCS comparadas as amostras de PLLA puro.

Os plastificantes, de acordo com a literatura, influenciam fortemente nas propriedades de um polímero, pois são responsáveis por mudanças na organização das cadeias poliméricas, o que pode ser verificado pela diminuição da T_g da matriz polimérica, sendo uma medida clássica da eficiência do plastificante (SEARS e DARBY, 1982).

Em um estudo realizado por Luciano (1997) e (2001) membranas de PLLA puro e com diferentes concentrações do plastificante trietil citrato de sódio, foram comparadas por meio de ensaios de DSC em relação ao tempo de degradação de cada amostra. As membranas com diferentes concentrações de plastificante apresentaram uma grande variação em sua T_g , estando esta sempre a baixo de zero, e na T_f , que diminuiram em relação ao tempo de degradação. Segundo o autor, isso ocorre devido à degradação das partes amorfas, por reduzir as forças de interação e, permitindo assim, maior mobilidade entre as cadeias poliméricas, o que também torna o polímero mais flexível.

4.1.4 Ângulo de Contato

O ângulo de contato é analisado por meio das características da superfície da amostra e pode ser representada pela medida de sua tensão superficial. Segundo Ignácio (2009) o ângulo de contato pode ser relacionado com três forças superficiais que mantêm a gota de um líquido em equilíbrio com uma superfície sólida (figura 13), sendo representadas pela equação:

$$\gamma_{LV} \cos\theta + \gamma_{SL} = \gamma_{SV} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

γ_{LV} - energia interfacial entre líquido e vapor (mN/m).

γ_{SL} - energia interfacial entre sólido e líquido (mN/m).

γ_{SV} - energia interfacial entre sólido e vapor (mN/m).

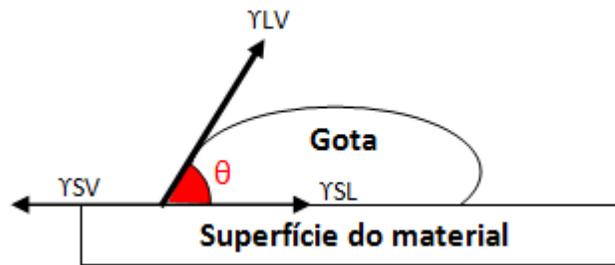


Figura 13. Representação do ângulo de contato da tensão superficial entre a gota e a superfície do material.

De acordo com pesquisas de Ignácio (2009) o ângulo θ igual a 0° significa que o líquido molha completamente a superfície, ou seja, líquido e sólido (material) possuem a mesma tensão superficial. Por outro lado, ângulos que se aproximam de 180° , indicam que o líquido tem baixa molhabilidade sobre a superfície sólida, ou seja, tensão superficial do líquido é muito diferente que a da superfície do material. Assim, a tensão superficial dos polímeros varia com a composição química de suas moléculas, o que irá interferir diretamente em sua hidrofobicidade ou hidrofobicidade em relação a sua interação celular.

Essa interação célula-substrato foi comprovada por meio da análise do ângulo de contato, que demonstrou que a hidrofobicidade do PLLA-TCS em comparação com o PLLA puro é 20% mais hidrofílico, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Dados resultantes do ângulo de contato das amostras do polímero puro e do polímero com plastificante.

Amostras	Ângulo de Contato
PLLA	80,7
PLLA - TCS 5%	64,1

Segundo Barbanti e colaboradores (2005) existe uma importante relação entre hidrofobicidade e adesão celular, onde substratos mais porosos tornam-se mais hidrofílicos e interagem mais intensamente com as células, facilitando sua adesão e produção de matriz extracelular.

A hidrofílicidade / hidrofobicidade do material depende não somente da estrutura química de sua superfície, como também de sua rugosidade; assim, quanto menor o ângulo de contato (tendendo a zero grau) maior é a afinidade química entre a superfície polimérica e a gota, como mostrado na figura 13 acima.

A adição do aditivo trietil citrato de sódio ao polímero tornou a membrana mais porosa, diminuindo o tempo de degradação e aumentando a afinidade celular. O mesmo resultado foi observado por Silva e colaboradores (2002), em que foram implantadas membranas de PLLA – trietil citrato 7% no subcutâneo de ratos wistar por 180 dias, sendo, analisados suas propriedades biológicas e a morfologia dos poros durante o período de implante. Ao fim do estudo comprovou-se por meio de ensaios mecânicos, ângulo de contato e microscopia, que a presença do plastificante tornou a membrana mais porosa e, portanto, diminuiu seu tempo de degradação ao fim dos 180 dias em comparação com membranas de PLLA puras.

4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das membranas, particularmente o tamanho e distribuição dos poros, é muito importante para a adesão das células ao suporte polimérico. As membranas de PLLA preparadas na concentração de 5% de trietil citrato de sódio e as membranas de PLLA puras foram comparadas e analisadas por MEV, figura 14 e 15 respectivamente. Verificou-se que as membranas de PLLA-TCS apresentaram alta porosidade, com interconexões e microvilosidades entre os poros, mas com variação de diâmetros, caracterizando uma morfologia heterogênea, em relação às membranas de PLLA puras. As figuras 14 e 15 (a) e (b) mostram a superfície do suporte de PLLA-TCS e PLLA pura, em diferentes aumentos, enquanto, as figuras 14 e 15 (c) e (d) mostram a superfície de fratura das membranas, sendo possível a visualização, na imagem de maior aumento, de grupos de partículas esféricas no interior da amostra de PLLA-TCS. Nas imagens de fratura (figura 14c e d) também observou-se uma extensa distribuição das interconexões dos poros.

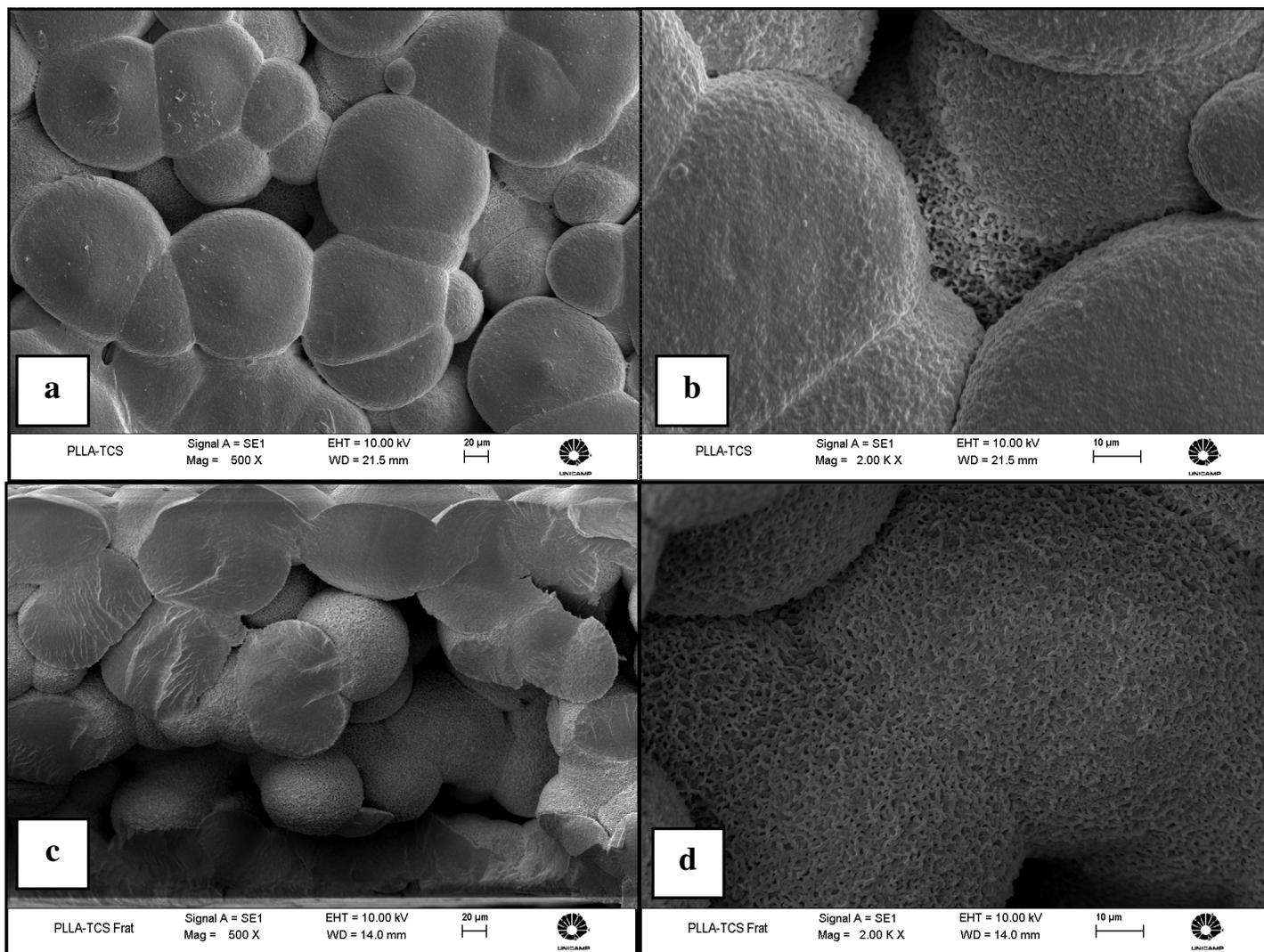


Figura 14. Imagens obtidas a partir de MEV das membranas de PLLA com trietil citrato de sódio a 5%. Superfície do PLLA-TCS em diferentes aumentos (a) e (b). Superfície de fratura do PLLA-TCS em diferentes aumentos (c) e (d).

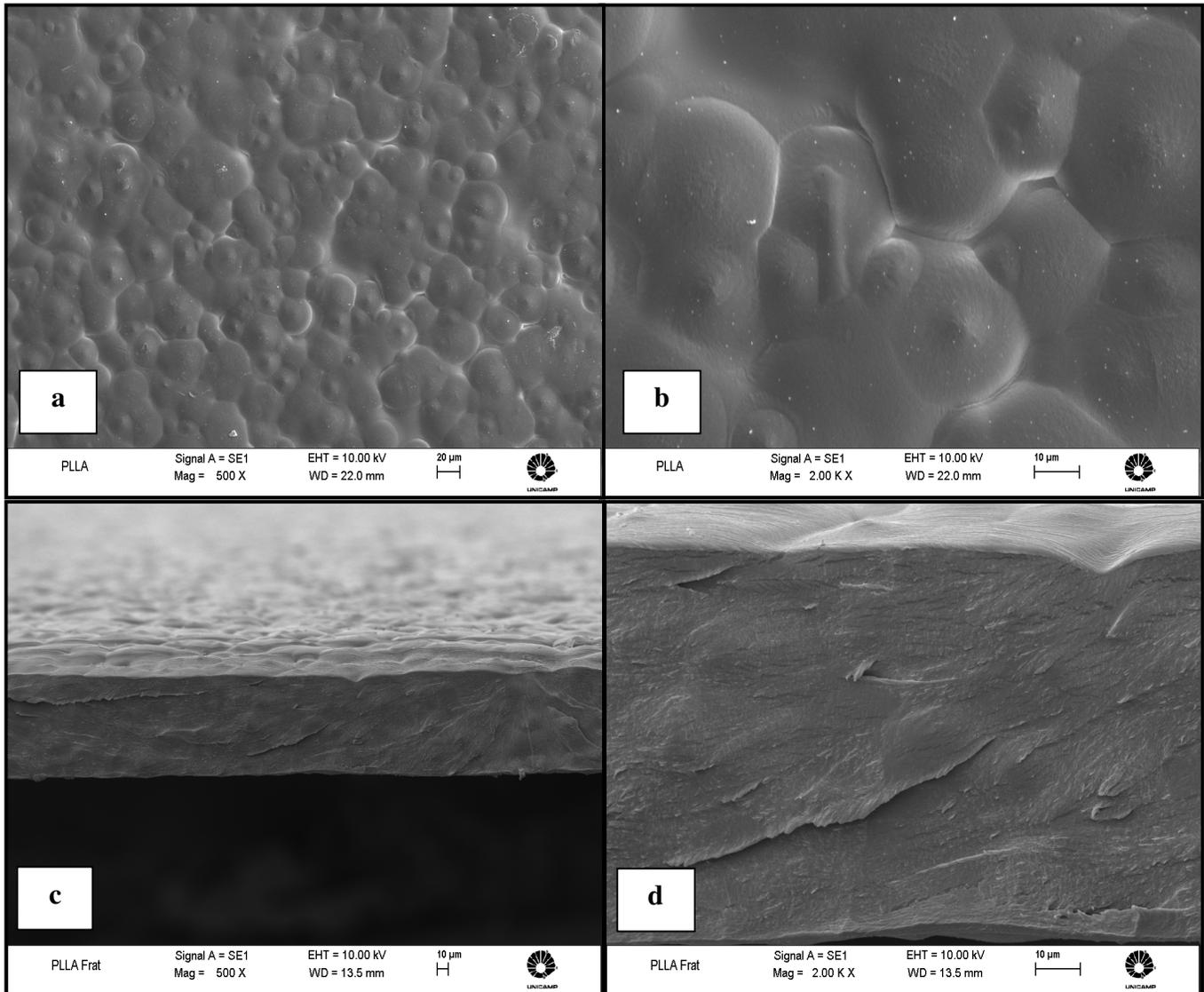


Figura 15. Imagens obtidas a partir de MEV das membranas de PLLA puras. Superfície do PLLA em diferentes aumentos (a) e (b). Superfície de fratura do PLLA em diferentes aumentos (c) e (d).

A análise do dispositivo por meio das imagens de microscopia eletrônica confirma que a adição do plastificante melhora as propriedades físico-químicas do material, principalmente pelo aumento de sua porosidade, o que segundo Luciano e colaboradores (2003), promove maior interação suporte-célula, além de não ser tóxico as células por ele estudadas após longos períodos de cultivo. Luciano e colaboradores (2003) também afirmam que membranas de PLLA com

plastificante degradam muito mais rapidamente em comparação a membranas de PLLA puras, podendo ser utilizadas para o recobrimento de lesões ou cultura celular, principalmente por promover rápida migração celular e invasão de matriz extracelular, ao mesmo tempo em que ocorre a degradação do suporte polimérico.

4.2 Caracterização do dispositivo completo (derme+ PLLA-TCS) antes da exposição às células VERO

A caracterização do dispositivo em estudo foi realizada por meio do ensaio dinâmico-mecânico (DMA), análise histológica e microscopia confocal antes do cultivo celular.

4.2.1 Ensaio Dinâmico Mecânico (DMA)

A análise dinâmico-mecânica (DMA) objetiva relacionar as propriedades macroscópicas dos materiais de estudo, tais como as propriedades mecânicas, às relaxações moleculares associadas a mudanças conformacionais e as deformações microscópicas geradas a partir de rearranjos moleculares (WUNDERLICH, 1997; CASSU e FELISBERTI, 2005).

Os polímeros apresentam relaxações que são características das fases, por exemplo, um material amorfo apresenta a temperatura de transição vítrea, a temperatura denominada T_g ou T_α , que é a temperatura na qual as cadeias passam do estado vítreo a viscoelástico. A faixa de temperatura na qual esse processo ocorre depende de vários fatores, tais como composição da mistura, flexibilidade das cadeias, massa molar do polímero, presença de plastificante, cristalinidade, etc (DUARTE, 2009).

Nesse estudo as análises de DMA foram realizadas nas membranas de PLLA puras, PLLA-TCS e no dispositivo contendo derme suína acelular. Os valores de temperatura de transição

vítrea (T_g) são mostrados na tabela 3 e foram obtidos a partir do módulo de perda (E''), como representado na figura 16 e 17.

Tabela 3. Temperatura de transição vítrea das membranas de PLLA puras, PLLA-TCS e dispositivo completo após análise de DMA a partir do módulo de perda (E'').

Amostras	T_g (°C)
PLLA	55
PLLA-TCS	-60
Dispositivo completo	-30

Verificou-se a evidente ação do plastificante trietil citrato de sódio quando incorporado ao polímero PLLA, cuja temperatura de transição vítrea apresentou uma considerável queda, de 55 °C para -60 °C. Além disso, percebeu-se que a amostra referente ao PLLA-TCS apresentou uma única T_g , enquanto que, para a amostra de PLLA puro, além da T_g , observou-se a presença de relaxação do tipo β (- 25°C) (indicado pela seta na figura 16a), referente as relaxações secundárias associadas aos grupos metila ligados à cadeia principal. Essas relaxações são referentes a fase amorfa, ocorrem a temperaturas inferiores à T_g e se apresentam em formas de picos na curva de E'' x T. Em relação as amostras de PLLA-TCS (figura 16b), não se verificou relaxações do tipo β na faixa de temperatura estudada, o que pode ser explicado pela ação do plastificante, cuja função é separar as cadeias poliméricas, dificultando o processo de cristalização, e favorecendo o movimento das cadeias em uma temperatura mais baixa. Provavelmente, nesse caso, as relaxações do tipo β , não possam ser detectadas. A diminuição do processo de cristalização pode ser confirmada pelos dados do DSC, mostrando a diminuição do valor da entalpia de fusão (ΔH_f), com a adição do plastificante nas membranas de PLLA.

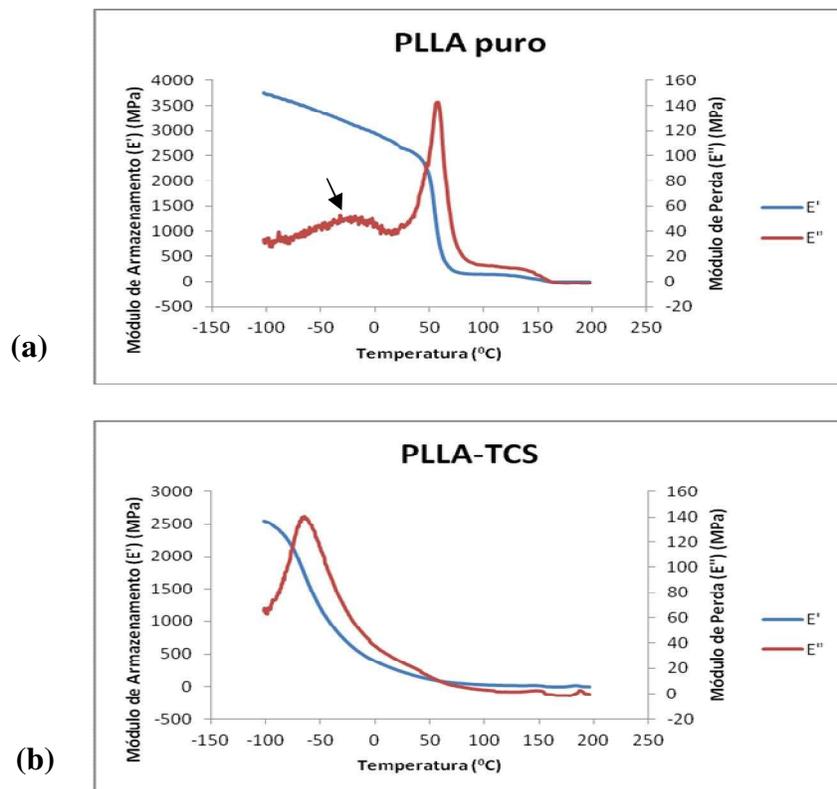


Figura 16. Comparação do módulo de perda (E'') e módulo de armazenamento (E') sob diferentes temperaturas entre as membranas de PLLA puras e PLLA-TCS após análise de DMA. Em (a) módulos E' e E'' do PLLA puro e em (b) módulos E' e E'' do PLLA-TCS.

No caso do dispositivo bifásico (figura 17) a presença da derme suína também exerceu uma expressiva influência sobre a membrana de PLLA-TCS, agindo de forma a minimizar o efeito do plastificante sobre o PLLA, já que a T_g passou de -60 °C (PLLA-TCS) para -30 °C (dispositivo completo).

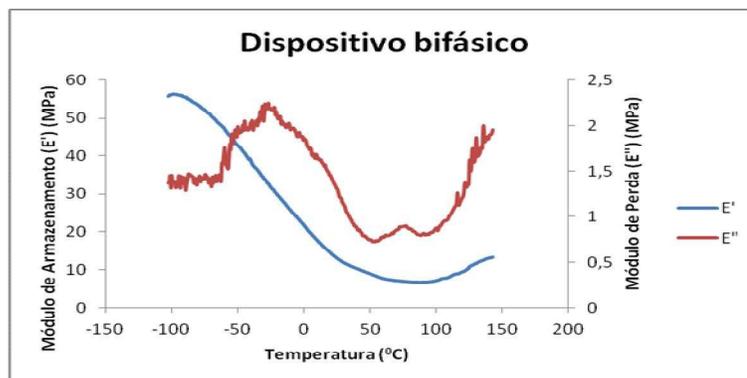


Figura 17. Análise do módulo de perda (E'') e módulo de armazenamento (E') sob diferentes temperaturas do dispositivo bifásico após ensaio de DMA.

De acordo com a literatura pesquisada o plastificante reduz a T_g , sendo que as concentrações variam com os diferentes sistemas, na qual a efetividade do sistema é máxima, e assim, a quantidade de aditivo adicionado ao material polimérico pode influenciar o seu comportamento, podendo, em altas concentrações, não produzir o mesmo efeito, tendo um limite de solubilidade, e em grandes quantidades ocorre separação de fase. Em estudos realizados por Pillin e colaboradores (2006) blendas de PLLA/PEGs mostraram que concentrações maiores de 20% do plastificante poli (caprolactona-triol) induziram a separação de fase.

Segundo Ke e colaboradores (2002), blendas de poli (L-ácido láctico) associado ao diisocianato de metilendifenilo (PLLA/MDI) com adição de diferentes concentrações de trietil citrato foram analisadas por DMA e mostraram que o aumento da concentração do plastificante diminuiu o módulo de elasticidade, mas por outro lado, aumentou o alongamento do material, por consequência da separação de fase, verificada morfológicamente quando a concentração do plastificante foi acima de 15%.

Levando-se em consideração os dados obtidos nesse estudo, a concentração de plastificante a 5% foi considerada adequada para a realização a pesquisa por não apresentar separação de fase, como mostrado pelo MEV.

A figura 17 demonstrou que a derme atuou de maneira a diminuir a T_g entre o PLLA-TCS e o dispositivo bifásico. Isso também foi evidenciado pela tabela 3, na qual se notou uma redução

de 30°C, entre o PLLA-TCS e o dispositivo, em comparação com o PLLA puro e com plastificante que apresentou uma diferença de 85°C na transição vítrea. Esses dados mostram que a função da derme no material bifásico é importante, pois a presença de fibras colágenas e elastina em sua matriz, faz com que o dispositivo mantenha sua capacidade de deformação, ao mesmo tempo que reduz seu alongamento, quando comparado a membrana de PLLA-TCS, o que preserva a estrutura física do dispositivo bifásico, já que as fibras naturais presentes na derme promovem resistência ao alongamento excessivo do material (provocado pela incorporação do trietil citrato). Isso pode ser verificado por meio dos valores do módulo de armazenamento (E'), mostrado na figura 17. A capacidade de deformação do material analisado pode auxiliar em sua aplicação durante um procedimento cirúrgico, por facilitar o recobrimento de lesões, podendo assim, atuar como um substituto dérmico.

Por tanto, mediante os resultados obtidos pelas análises realizadas, conclui-se que apesar do arcabouço polimérico servir como um bom suporte para a proliferação celular há a necessidade da presença de um componente que seja mimético ao ambiente natural para as células fibroblásticas presentes na camada dérmica da pele, e por essa razão, a matriz dérmica é extremamente importante por promover esse ambiente adequado para a proliferação celular e produção de matriz extracelular, além de auxiliar na diminuição do alongamento excessivo provocado pela incorporação do aditivo. Mesmo assim, apesar de mimetizar a camada dérmica natural da pele, a matriz dérmica suína sozinha não seria capaz de atuar como barreira física contra agentes externos, papel esse atribuído ao suporte polimérico.

4.2.2 Análise histológica

Durante a análise dos cortes histológicos da derme acelular suína (figura 18) corados em Hematoxilina – Eosina (HE), as fibras colágenas apresentam-se coradas em rosa pela eosina, mas sem a presença de estruturas coradas em roxo, (figura 18b), o que comprova que a matriz dérmica utilizada para o desenvolvimento do dispositivo bifásico derme + PLLA-TCS encontrava-se

completamente decelularizada. Observa-se, também, o caráter birrefringente das fibras de colágeno após a polarização, coradas em tons de vermelho (Figura 18a).

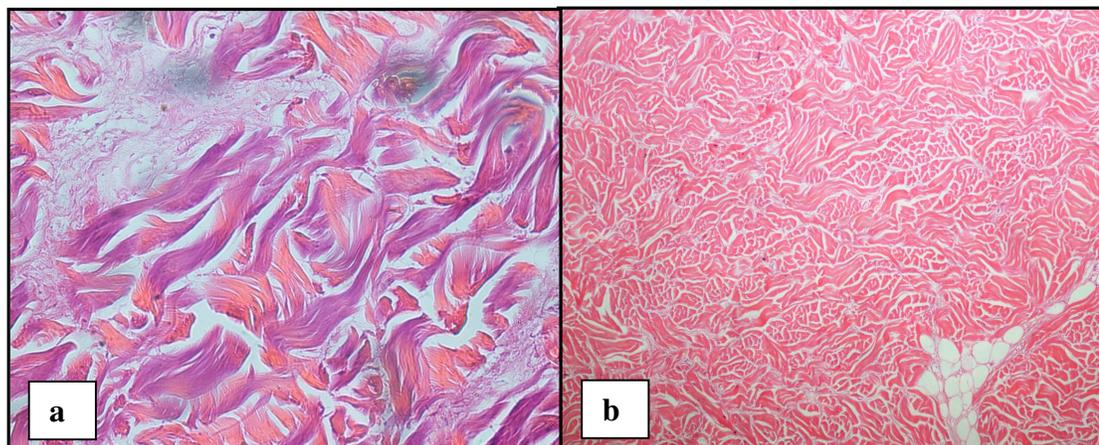


Figura 18. Fotografias de lâminas de derme acelular suína. (a) sob luz polarizada em aumento de 40x (a). (b) coradas com Hematoxilina – Eosina (HE) em aumento de 10x.

Segundo a literatura existem três tipos principais de fibras no tecido conjuntivo: fibras colágenas, fibras reticulares e fibras elásticas. A proteína do colágeno é uma das mais abundantes do corpo, e faz parte da constituição das fibras colágenas e reticulares.

As fibras colágenas são formadas por fibrilas de colágeno com um padrão de estriações típico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Essa morfologia estriada das fibras de colágeno pode ser observada na figura 18.

A figura 19 mostra imagens de cortes histológicos do dispositivo bifásico sem a presença de células fibroblásticas, coradas em Hematoxilina – Eosina e Picrossirius red. A coloração com HE foi utilizada para avaliar as estruturas que compõem o dispositivo (derme e polímero) e novamente para confirmar a ausência de células na matriz dérmica (figura 19). Já a coloração com Picrossirius red foi importante para verificar a disposição e estrutura das fibras colágenas presentes na derme, afim de também confirmar sua semelhança em relação à matriz dérmica humana (figura 20).

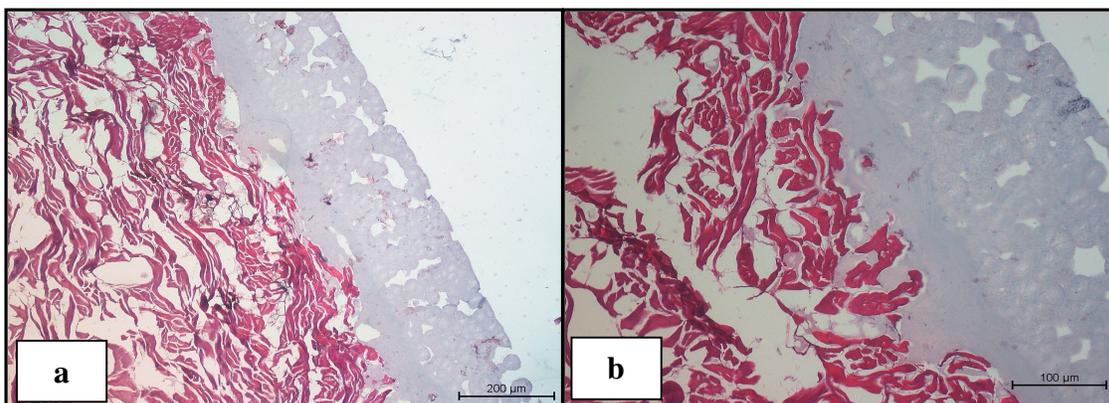


Figura 19. Imagens de lâminas do dispositivo bifásico na ausência de células fibroblásticas (VERO) coradas com Hematoxilina – Eosina (HE).

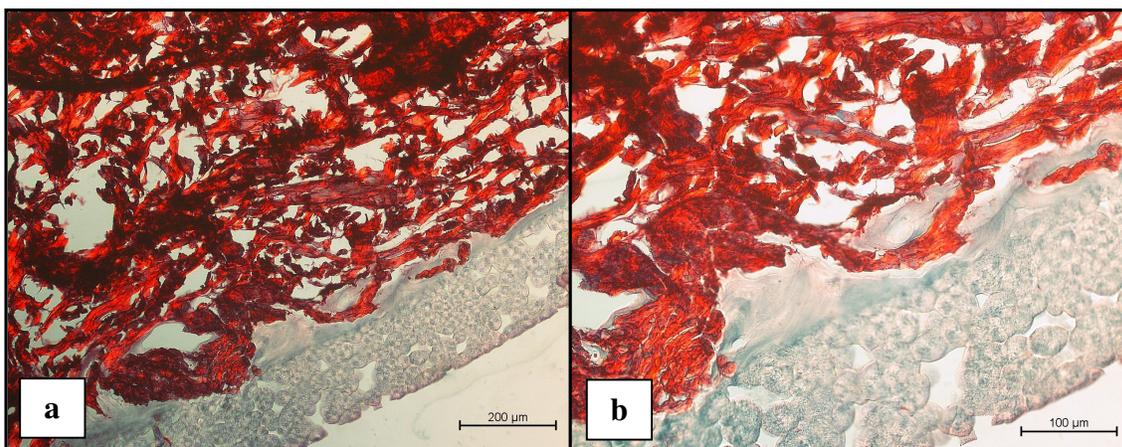


Figura 20. Imagens de lâminas do dispositivo bifásico na ausência de células fibroblásticas (VERO) coradas com Picrosirius red.

Autores como Sweat e colaboradores (1964) foram um dos primeiros a estudar métodos de coloração de fibras colágenas e em suas pesquisas buscavam uma substância que corasse definitivamente o colágeno, utilizando assim o corante Vermelho Sírio (Sirius Red), associado ao ácido pícrico, denominando-a de solução de Picrosirius Red. A solução de Picrosirius Red, segundo os autores, pode ser bem visualizada, principalmente, sob microscopia de polarização.

Juntamente aos estudos de coloração das fibras de colágeno, há muitas décadas pesquisadores trabalham com o objetivo de avaliar a neoformação de fibras de colágeno e consecutivamente a sua reconstrução tecidual, e a interação entre as fibras e o ambiente celular, principalmente após implantes.

A utilização de matrizes dérmicas ou colágeno, extraído de fontes xenogênicas, mostram-se extremamente favorável à cultura de células fibroblásticas. Segundo Santos Jr e colaboradores (2007) as células cultivadas sobre diferentes tipos de colágeno são capazes de produzir componentes de matriz extracelular como glicosaminoglicanos e fibronectina, de modo a formar um tecido que se assemelha, em suas características, a um tecido reconstituído. Mesmo apresentando inúmeras vantagens, como ser biodegradável e biorreabsorvível, e ser altamente flexível, o PLLA-TCS, dependendo da concentração de plastificante, pode também apresentar algumas desvantagens como rápida degradação, maior hidrofobicidade e baixa resistência a forças mecânicas de compressão comparado ao PLLA puro. Por essa razão a utilização de materiais compósitos como na associação de matrizes dérmicas ou colágeno purificado a membranas tridimensionais densas e porosas de PLLA têm, de acordo com estudos de Santos Jr e colaboradores (2007), proporcionado maior adesão de células fibroblásticas, sendo capazes de produzir matriz extracelular, como colágeno IV e fibronectina.

Materiais xenogênicos derivados de suínos são amplamente utilizados como substituto tecidual para a cicatrização de lesões de pele, principalmente devido à semelhança morfológica existente entre a pele de porco e a humana. Matrizes dérmicas suínas decelularizadas são uma alternativa para a reconstrução de feridas provocadas por queimaduras, pois além das semelhanças morfológicas, há também diversas características funcionais semelhantes entre os dois tipos teciduais. Entre essas características encontra-se a similaridade entre as fibras colágenas, membrana basal e outras microestruturas relacionadas a composição dérmica. No entanto, a derme humana apresenta uma superfície mais frouxa em comparação com a derme suína, o que sugere que a pele humana possui uma camada dérmica menos densa que a suína. A aparência morfológica de fibroblastos presentes na superfície da matriz dérmica dos dois tipos de pele também são similares, diferem somente no seu tempo de proliferação, sendo um pouco mais rápida sob a derme humana, já que está é menos espessa que a derme porcina.

De acordo com um estudo realizado por Armour e colaboradores (2006), não foram encontradas diferenças entre uma matriz dérmica suína e a placa de cultivo (simulando o organismo humano), em relação a adesão de fibroblastos, após 24 horas de cultivo, confirmando somente que o crescimento foi mais rápido na placa de cultivo do que sobre a matriz dérmica.

4.2.3 *Microscopia Confocal*

A análise da organização das fibras colágenas da matriz dérmica (figura 21) comprova que as fibras de colágeno se arranjam de forma irregular como emaranhado de fibras em diferentes direções.

Pesquisas como a de Zuijlen e colaboradores (2002) demonstraram por meio da análise de matriz dérmica com microscopia confocal a organização das fibras colágenas presentes na matriz dérmica e sua disposição, o que auxilia na proliferação e crescimento celular.

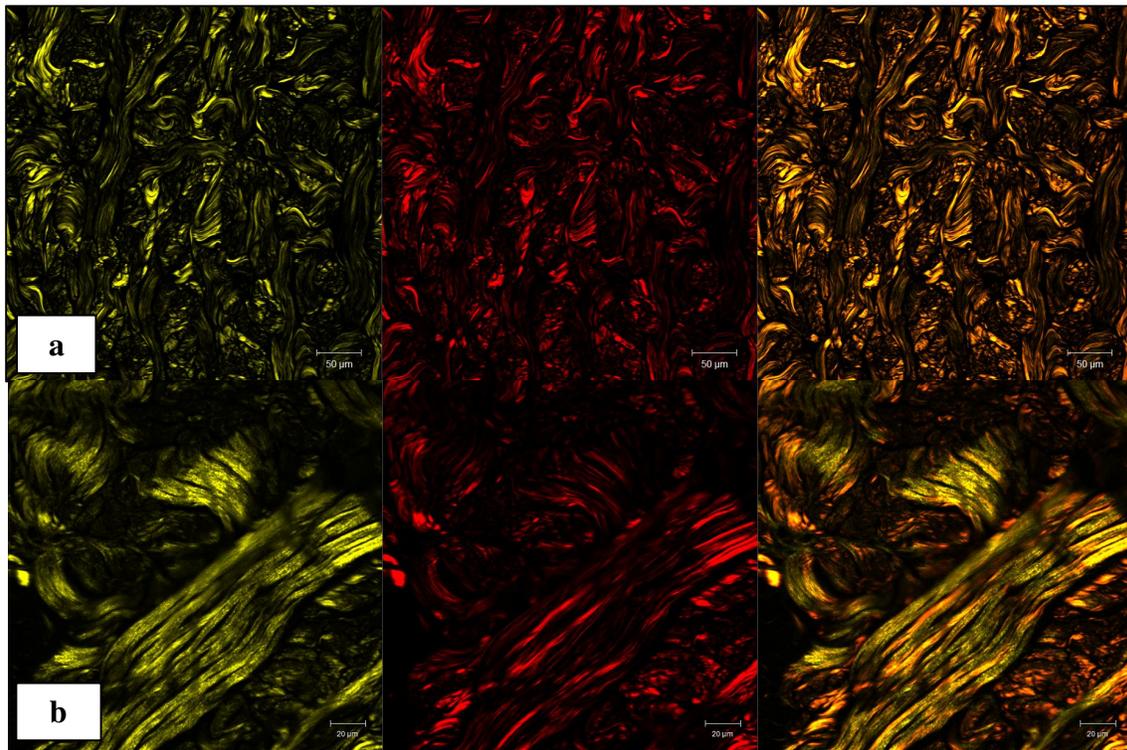


Figura 21. Imagens a partir de microscopia confocal evidenciando as fibras colágenas do dispositivo bifásico antes do cultivo celular.

4.3 Caracterização do dispositivo completo (derme+ PLLA-TCS) após exposição às células VERO

A caracterização do dispositivo dérmico completo após o cultivo de células fibroblásticas foi realizada por meio de ensaios de microscopia eletrônica de varredura e viabilidade celular.

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A figura 22 mostra micrografias do dispositivo de matriz dérmica em associação com a membrana de PLLA-TCS antes da exposição às células fibroblásticas. É possível observar os prolongamentos das fibras de colágenos que compõe a matriz dérmica e a estrutura do suporte polimérico, com alto grau de porosidade. Além de comprovar a associação entre os dois componentes para a formação do dispositivo bifásico, podendo assim, ser utilizado como um substituto dérmico.

Segundo Lee e colaboradores (2006) dependendo da concentração do polímero e da adição de aditivos, membranas de PLLA podem ser consideradas um ótimo modelo para reparação dérmica, principalmente em associação a matrizes biológicas, como membranas colágenas.

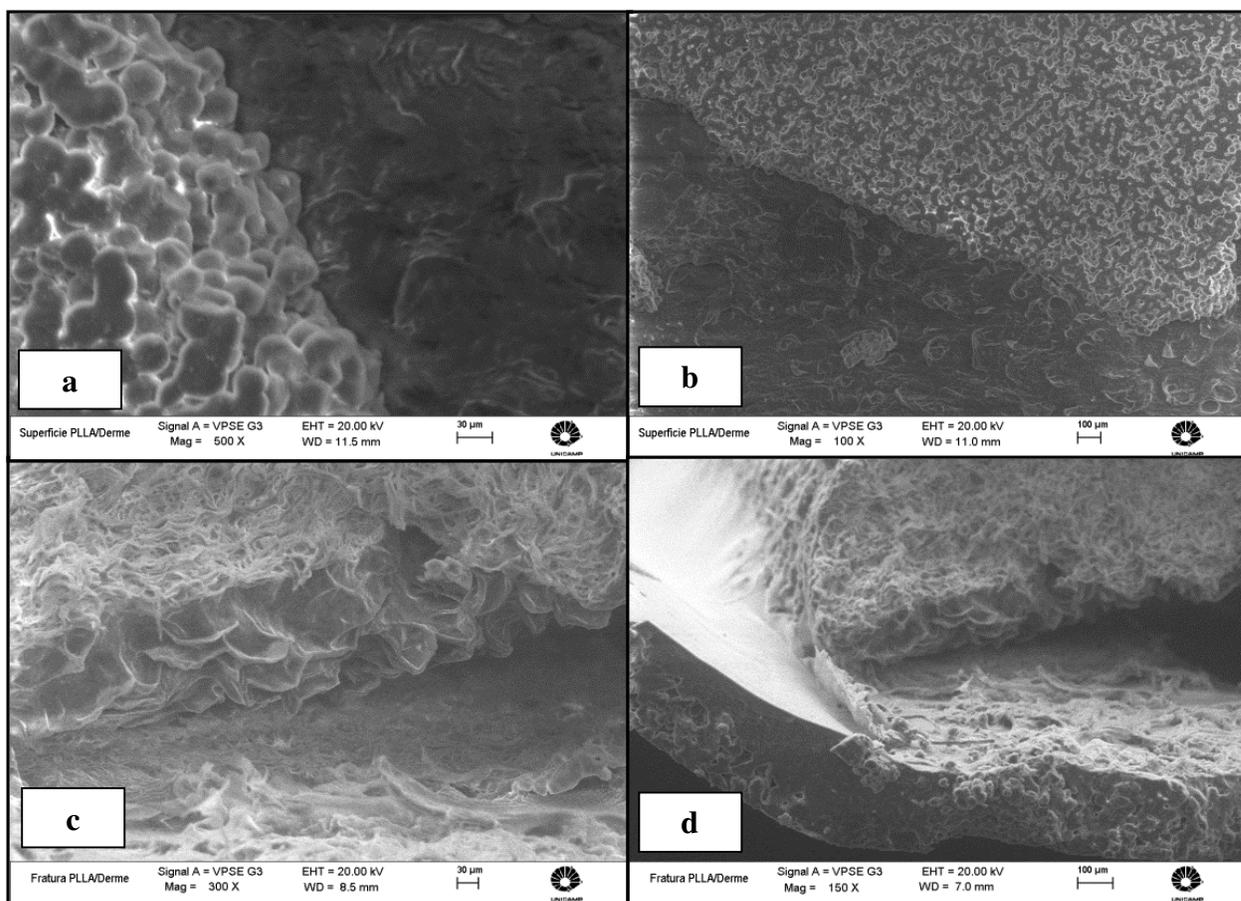


Figura 22. Imagens obtidas por MEV do dispositivo composto por derme em associação com PLLA-TCS antes de sua exposição às células fibroblásticas (VERO). Superfície do dispositivo (a) e (b). Superfície de fratura do dispositivo (c) e (d).

A figura 23 mostra micrografias de superfície e superfície de fratura da estrutura do dispositivo derme + PLLA - TCS sob o cultivo de células fibroblásticas (VERO). Observa-se que houve crescimento e adesão celular entre as interconexões dos poros e ao seu redor.

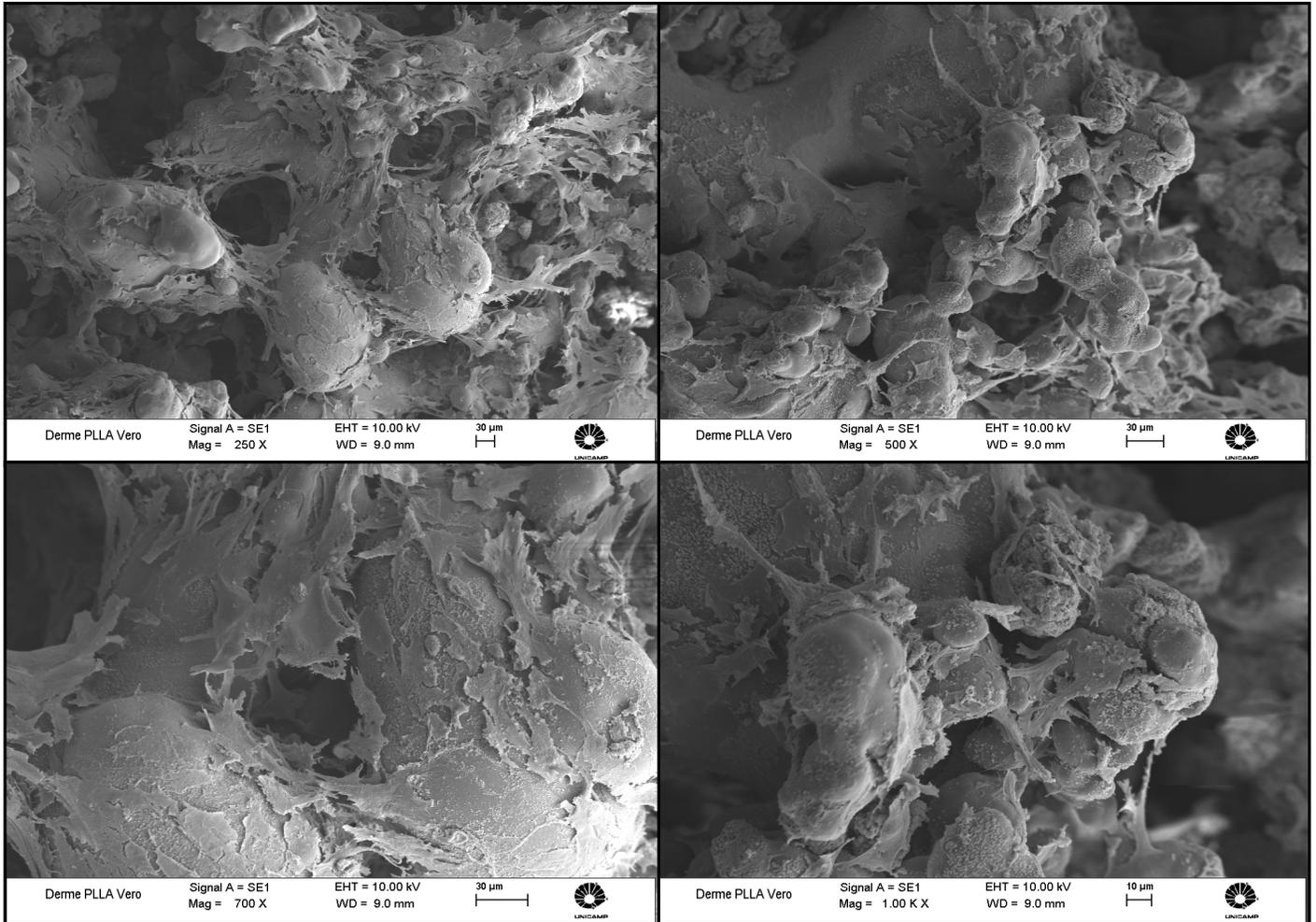


Figura 23. Micrografias do dispositivo composto por derme em associação com PLLA-TCS após a exposição às células fibroblásticas (VERO). Imagens da superfície do dispositivo em diferentes aumentos.

A porosidade foi um fator que se apresentou variável, tanto em relação ao tamanho quanto a distribuição, como relatado anteriormente. Além disso, é possível ver poros com interconexões e poros de fundo cego.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram a morfologia irregular dos fibroblastos, tanto de forma arredondada como espreada, presentes na superfície da matriz dérmica, sendo possível encontrar prolongamentos celulares.

Santos Jr e colaboradores (2004) observaram resultados semelhantes em suas pesquisas, mostrando uma morfologia arredondada de células VERO sob suportes de PLLA e espriamento

de filamentos citoplasmáticos em sua superfície polimérica. As características apresentadas por cada material polimérico promovem variação no comportamento celular, principalmente ao variar-se seu grau de porosidade.

O mesmo resultado foi obtido por Zoppi (1999) ao desenvolver filmes de PLLA sob cultivo de VERO após um período de incubação de 120 horas. As análises e observação da adesão celular mostraram rápidas mudanças morfológicas dos fibroblastos, desde formatos arredondados como alongados, comprovando que esse tipo celular adere muito bem à superfície de substratos como o desenvolvido por esse trabalho.

4.3.2 Viabilidade Celular

Após o período de 2 e 24 horas para adesão e citotoxicidade, respectivamente, a avaliação da viabilidade celular foi medida por meio de comparação com seus respectivos controles.

A análise de adesão celular mostrou que o material bifásico analisado apresentou adesão estatisticamente superior, em comparação ao seu controle (placa de poliestireno). Assim, constatou-se que as amostras possuem maior capacidade de estimular a adesão celular do que a placa de poliestireno (figura 24).

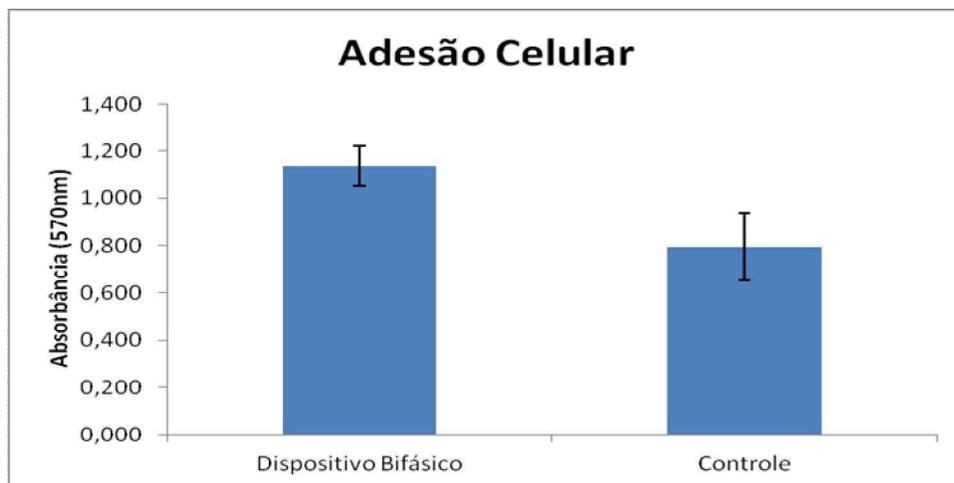


Figura 24. Ensaio de viabilidade celular para adesão, após 2 horas de cultivo. As amostras de derme+PLLA-TCS mostraram taxa de adesão superior ($p < 0,005$) em comparação com o controle (placa de poliestireno), sendo estatisticamente diferentes.

O estudo e análise *in vitro* da adesão celular é de grande importância à ciência dos biomateriais e engenharia de tecidos, por permitir avaliar a interação polímero – célula. Somente depois de aderidas, as células iniciam seu processo de proliferação, espreado e produção de uma nova matriz extracelular.

Sabe-se que adesão celular é consequência de uma complexa rede de interações físico-químicas que proporcionam adsorção de proteínas ao substrato. Além disso, recentemente, alguns autores, como Santos Jr e colaboradores (2007), têm reconhecido a forte influência das proteínas presentes no meio de cultura e a forma como as mesmas interagem com a superfície do biomaterial, e como podem ou não viabilizar a interação suporte – célula. No presente estudo, uma provável explicação para a alta capacidade de adesão celular das células fibroblásticas sobre suportes de Derme + PLLA – TCS seria a forte interação suporte – células – nutrientes (meio de cultura).

No ensaio de citotoxicidade, figura 25, observou-se que o dispositivo bifásico derme + PLLA – TCS apresentou-se atóxico às células fibroblásticas.

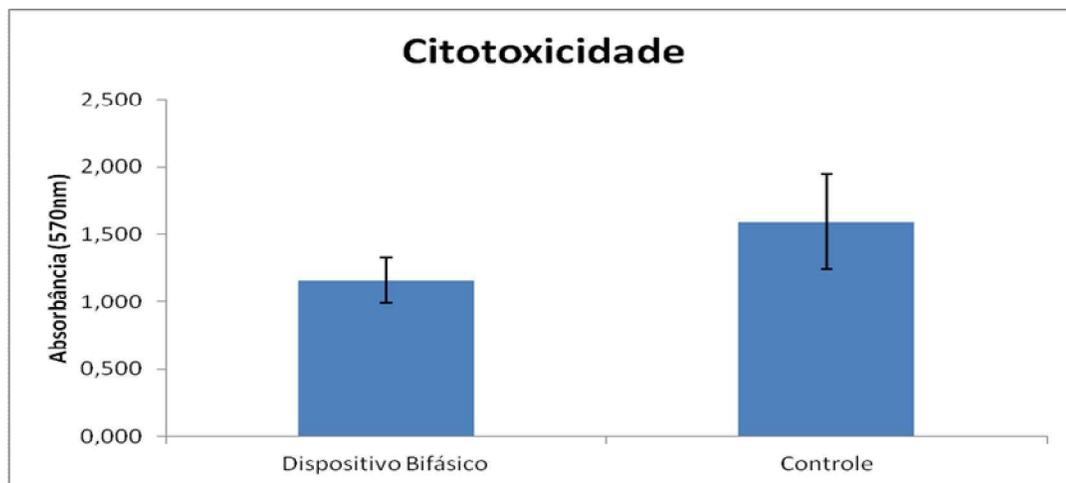


Figura 25. Ensaio de viabilidade celular para citotoxicidade das amostras, após 24 horas de cultivo. As amostras de derme+PLLA-TCS mostraram-se inferiores ao controle (placa de poliestireno), mas são estatisticamente semelhantes ($p > 0,005$).

Considera-se que polímeros biodegradáveis apresentam comportamento variável em diferentes ambientes biológicos em razão de diversas propriedades tais como, massa molecular, hidrofobicidade, monômeros residuais e pH dos produtos de degradação. Embora uma substância tóxica presente no material polimérico não afete sua estrutura molecular, pode comprometer sim várias funções celulares (LUCCHESI *et al.* 2006). Segundo Lucchesi e colaboradores (2006) considera-se que a imediata medição da atividade mitocondrial pode ser o suficiente para validar a viabilidade das células para ensaios de toxicidade.

Estudos como o de Lombello e colaboradores (2002) afirmam que para ensaios de citotoxicidade células VERO são consideradas ideais devido a sua ótima interação com o substrato e afirmam, em pesquisa realizada com membranas porosas de PLLA sob cultivo de células fibroblásticas VERO, que houve boa interação polímero-célula.

Essa interação suporte-célula também foi comprovada por Lee e colaboradores (2005) em um estudo em que foram preparados arcabouços de colágeno extraídos da pele de suínos sob o cultivo de células fibroblásticas de derme humana. Comparou-se então, a adesão e crescimento entre dois sistemas: placa – células e arcabouço – células, onde observou-se que a interação arcabouço – células apresentou maior viabilidade celular, e sendo ambos atóxicos para as células cultivadas.

Assim, os resultados obtidos comprovam que a viabilidade celular do material estudado é superior à placa de poliestireno, sendo este ótimo substrato para a proliferação e diferenciação celular.

5 CONCLUSÕES

Os resultados relativos às análises através da MEV mostraram que o TCS promoveu porosidade as membranas poliméricas, sendo este um fator fundamental para essa aplicação. Em relação aos ensaios de caracterização, a adição do plastificante trietil citrato de sódio aumentou sua capacidade de deformação, devido à maior mobilidade entre as cadeias poliméricas, verificado pelas análises térmicas, o que mostrou ser um fator importante no desenvolvimento do dispositivo bifásico para que possa acompanhar, como um futuro substituto dérmico, as movimentações e flexibilidade natural presente no tecido cutâneo.

Os resultados obtidos a partir dos ensaios biológicos confirmam que a matriz dérmica, devido a sua alta afinidade celular, aumentou a interação entre o suporte e as células cultivadas em sua superfície, e que a porosidade da membrana associada a essa matriz colágena é essencial para aumentar o crescimento e a migração celular para o interior do dispositivo. Além disso, a membrana polimérica de PLLA-TCS que compõe o dispositivo bifásico, após implante, atua como barreira imprescindível contra agentes externos protegendo o local lesionado. Por essa razão, conciliar as propriedades mecânicas aferidas ao material polimérico com aditivo, a uma matriz dérmica biológica, torna o dispositivo mais viável a aplicação em lesões cutâneas provocadas por queimaduras, por promover maior resistência mecânica ao tecido.

Por fim, o ensaio de viabilidade celular comprovou que o cultivo de células fibroblásticas da linhagem VERO, sobre a matriz dérmica que compõe o dispositivo bifásico, é um importante fator para avaliar a funcionalidade do dispositivo estudado, por ser um padrão para as análises de viabilidade e por apresentar rápida adesão ao substrato.

6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Realizar de ensaios *in vivo* para acompanhar o crescimento celular e avaliar se há estratificação do tecido cutâneo;
- Utilizar tipos celulares específicos do tecido cutâneo para analisar seu comportamento *in vitro* sobre o dispositivo bifásico e comparar se há uma regeneração mais rápida do local lesionado após a implantação;
- Comparar por meio de ensaios *in vivo* a regeneração de lesões utilizando-se matriz porcina e matriz humana, afim de confirmar a similaridade entre os dois tipos de pele;
- Ou utilizar o colágeno derivado da matriz dérmica para que ele possa penetrar no interior da membrana porosa de PLLA e produzir um dispositivo menos espesso para implantação.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A.S. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poli(L-lactídeo) e nanopartículas de argila sódica, argilas organofílicas e óxidos de sílica.** 2010. Dissertação (Mestrado): Instituto de Macromoléculas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

AMANI H, DOUGHERTY WR, BLOME-EBERWEIN S. Use of Transcyte and dermabrasion to treat burns reduces length of stay in burns of all size and etiology. **Burns**, vol. 32, n. 7, pp. 828-32, 2006.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, vol. 21, no. 7, pp. 667-681, 2000.

ARAUJO, A.M. **Monitoramento de processos em tempo real via espectrofotometria no infravermelho próximo.** 2007. Dissertação (Mestrado): Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes – Unit, Aracaju-SE.

ARMOUR, A.D.; FISH, J.S.; WOODHOUSE, K.A. P.; SEMPLE, J.L. A Comparison of Human and Porcine Acellularized Dermis: Interactions with Human Fibroblasts In Vitro. **Plastic and Reconstructive Surgery**, vol 117, n. 3, pp. 845-856, 2006.

ARVELO, F. Ingeniería de tejidos y producción de piel huma na in vitro. **Invest Clin**, v. 48, n.3, p. 367 – 375, 2007.

ASKARI, M.; COHEN, M. J.; GROSSMAN, P. H.; KULBER, D. A. The use of acellular dermal matrix in release of burn contracture scars in the hand. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.127, n.4, 2011.

AUGER, F.A.; LACROIX, D.; GERMAIN, L. Skin substitutes and wound healing. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 22, pp.94–102, 2009.

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, ELIANA A. R. Bioresorbable polymers in tissue engineering. **Polímeros**, v. 15, n.1, p. 13-21, 2005.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; VARGAS, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, v. 24, n.1, p.131-137, 2003.

BOCCACCINI, A. R., BLAKER, J. J., MAQUET, V., DAY, R. M., JÉRÔME, R. Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering.**, v. 25, p. 23-31, 2005.

BOHLMANN, G.M. General characteristics, processability, industrial applications and market evolution of biodegradable polymers. In: BASTIOLI, C. **Handbook of biodegradable polymers**. Shawbury: Rapra Technology, 2005, cap.6, p. 191-2/289.

BRAZIULIS E, BIEDERMANN T, HARTMANN-FRITSCH F, SCHIESTL C, PONTIGGIA L, BÖTTCHER-HABERZETH S, REICHMANN E, MEULI M. Skin Engineering I: engineering porcine dermo-epidermal skin analogues for autologous transplantation in a large animal model. **Pediatr Surg Int**, vol. 27, n. 3, pp. 241-247, 2011.

BRONZINO, J.D. **Tissue engineering and artificial organs**. New York: CRC Press, 2006, cap.75, p. 752-4.

CAMPBELL, K.T.; BURNS, N.K.; RIOS, C.N.; MATHUR, A.B.; BUTLER, C.E. Human versus non – cross-linked porcine acellular dermal matrix used for ventral hernia repair: Comparison of *in vivo* fibrovascular remodeling and mechanical repair strength. **Plast Reconst Surg**, v.127, n.6, p. 2321-2332, 2011.

CATENA, F.; ANSALONI, L.; GAZZOTTI, F.; GAGLIARDI, S.; DI SAVERIO, S.; D'ALESSANDRO, L.; PINNA, A.D. Use of porcine dermal collagen graft (Permacol) for hernia repair in contaminated fields. **Hernia**, v. 11, n. 1, p.57–60, 2007.

CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Hybrid biomaterials for tissue engineering: A preparative method for PLA or PLGA–collagen hybrid sponges. **Advanced Materials**, vol. 12, n. 6, pp. 455–457, 2000.

CLARK, R.A.F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M.G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. **J Invest Dermatol**, v.127, n.5, p.1018-1029, 2007.

COOLEN, N.A.; ULRICH, M.M.W.; MIDDELKOOP, E. Future perspectives of tissue engineered skin: Xenobiotic-free culture systems. **Advances in wound care**, vol. 1, 2010.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003, p. 75-80.

CUADRA, A.; CORREA, G.; ROA, R.; PIÑEROS, J.L.; NORAMBUENA, H.; SEARLE, S.; HERAS, R.L.; CALDERÓN, W. Functional results of burned hands treated with Integra®. **J Plast Reconstr Aesthet Surg.**, vol. 65, n.2, pp. 228-34, 2012.

DAMANHURI, M.; BOYLE, J.; ENOCH, S. Advances in tissue-engineering skin substitutes. **Wounds International**, vol 2, n. 1, 2011.

DAS, M.K.; AHMED, A.B. Skin permeation enhancement effects of ascorbic acid and triethyl citrate on rofecoxib. **Malaysian J Pharmac Sci**, vol.6, n.1. p. 69-86, 2008.

DASSIE, L.T.D.; ALVES, E.O.N.M. **Centro de tratamento de queimados: Perfil epidemiológico de crianças internadas em um hospital escola**. Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Queimaduras, vol. 10, n. 1, 2011.

DIECKMANN, C.; RENNER, R.; MILKOVA, L.; SIMON, J. JOHN WILEY; SONS, A.S. Regenerative medicine in dermatology: Biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. **Exp Dermatol**, vol. 19, n.8, p. 697-706, 2010.

DUARTE, M.A.T. **Influencia da concentração de PCL-T em membranas de PLDLA: Estudo in vitro e in vivo**. 2009. Dissertação (Doutorado): Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP.

DRUMOND W.S.; WANG, S. H. Síntese e Caracterização do copolímero Poli (ácido láctico-B-glicol etilênico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 14, n. 2, p. 74-79, 2004.

FELISBERTI, M.I ; CASSU, S.N. Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas. **Quim. Nova**, vol. 28, n. 2, pp. 255-263, 2005.

FIGUS A, LEON-VILLAPALOS J, PHILP B, DZIEWULSKI P. Severe multiple extensive postburn contractures: a simultaneous approach with total scar tissue excision and resurfacing with dermal regeneration template. **J Burn Care Res.**, vol. 28, n.6, pp.913-7, 2007.

FRANCO, R.A.; MIN, Y.K., YANG, H.M.; LEE, B.T. Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. **J. Biomater. Appl.**, vol. 9, pp. 1-11, 2011.

GALLAGHER, W.M; LYNCH, I.; ALLEN, L.T.; MILLER, I.; PENNEY, S.C.; O'CONNOR, D.P.; PENNINGTON, S.; KEENAN, A.K.; DAWSON, K.A. Molecular basis of cell–biomaterial interaction: Insights gained from transcriptomic and proteomic studies. **Biomaterials**, vol. 27, no. 35, pp. 5871- 82, 2006.

GARTINER, L. P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003, p. 69-83.

GIBSON, A. L.; SCHURR, M. J.; SCHLOSSER, S. J.; COMER, A. R.; ALLEN-HOFFMAN, L. Comparison of therapeutic antibiotic treatments on tissue-engineered human skin substitutes. **Tissue Engineering**, vol.14, n.5, 2008.

GREENWOOD, J.E; DEARMAN, B.L. Comparison of a sealed, polymer foam biodegradable temporizing matrix against Integra dermal regeneration template in a porcine wound model. **J Burn Care Res.**, vol. 33, n. 1, pp. 163-73, 2012.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterial. **Acta Mater.**, vol. 48, n.1, p. 263-77, 2000.

GROEBER, F.; HOLEITER, M.; HAMPEL, M.; HINDERER, S.; SCHENKE-LAYLAND, K. Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. **Adv Drug Deliv Rev.**, vol. 63, no. 4-5, pp.352-66, 2011.

HANSEN, S.L; VOIGT, D.W; WIEBELHAUS, P.; PAUL, C.N. Using skin replacement products to treat burns and wounds. **Adv Skin wound Care**, vol. 14, n.1, p. 37–44, 2001.

HILTUNEN, K.; HARKONEN, M., SEPPALA, J.V.; VANANEN, T. Synthesis and characterization of lactic acid based telechelic prepolymers. **Macromolecules**, vol. 29, p.8677, 1996.

HODGKINSON, T; BAYAT, A. Dermal substitute-assisted healing: Enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design. **Arch Dermatol Res**, v.303, n.5, p.301–15, 2011.

HORCH, R.E.; KOPP, J.; KNESER, U.; BEIER, J.; BACH, A.D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. **J Cell Mol Med**, vol. 9, n.3, p. 592-608, 2005.

HUBIK DJ, WASIAK J, PAUL E, CLELAND H. Biobrane: A retrospective analysis of outcomes at a specialist adult burns centre. **Burns**, vol. 37, n. 4, pp.594-600, 2011.

IGNÁCIO, C. **Desenvolvimento de curativos para cicatrização de feridas por segunda intenção baseados em biomateriais capazes de promoverem resposta celular controlada via estímulo externo**. 2009. Dissertação (Doutorado): Faculdade de Engenharia Metalúrgica e de minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

International Organization for Standardization. **ISO 10993-5E** – Biological evaluation for medical devices: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 3rd edition. Suíça, 2009.

JANSSOM, K.; HAEGERSTRAND, A; KRATZ, G. A biodegradable bovine collagen membrane as a dermal template for human *in vivo* wound healing. **Seand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, vol. 35, n.4, p. 369-75, 2001.

JONES, J.R. Artificial Organs. In: JONES, J.R.; HENCH, L.L. **Biomaterials, artificial organs and tissue engineering**. New York: CRC Press, 2005, cap.14 e 22, p.146; 243.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004, p. 136-38.

KASAJ, A.; REICHERT, H.G.; RÖHRING, B.; SMEETS, R. WILLERSHAUSEN, B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head & Face Medicine**; vol. 4, n. 22, 2008.

KE, T.; SUN, X.S. Thermal and mechanical properties of poly(lactic acid)/starch/methylenediphenyl diisocyanate blending with triethyl citrate. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 88, n. 13, 2003.

KELLOUCHE, S.; MARTIN, C.; KORB,G.; REZZONICO, R.; BOUARD, D.; BENBUNAN, MARC; DUBERTRET, L.; SOLER, C.; LEGRAND, C.; DOSQUET, C. Tissue engineering for full-thickness burns: A dermal substitute from bench to bedside. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 363, n. 3, pp. 472–478, 2007.

KREMER, M; LANGE, E.; BERGER, A.C. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycana matrix (integratm artificial skin). **Br J Plast Surg**; vol. 53, n.6, p.459-65, 2000.

KRICHELDORF, H.R.; SUMBÉL, M.V. Makromolek. **Chem**, vol. 189, p.317, 1988.

LAZIC T, FALANGA V. Bioengineered Skin Constructs and Their Use in Wound Healing. **Plast Reconstr Surg.**, vol. 127, no. 1, pp. 75S-90S, 2011.

LAZZERI, L.; CASCONI, M.G.; DANTI, S.; SERINO, L.P.; MOSCATO, S.; BERNARDINI, N. Gelatine/PLLA sponge – like scaffolds:morphological and biological characterization. **J Mater Sci:Mater Med**, vol. 17, n. 12, pp.1211–1217, 2006.

LEE, A.R.C. Enhancing dermal matrix regeneration and biomechanical properties of 2nd degree-burn wounds by EGF-impregnated collagen sponge dressing. **Arch Pharm Res**, vol. 28, n. 11, pp. 1311-1316, 2005.

LESHER, A.P.; CURRY, R.H.; EVANS, J.; SMITH, V.A.; FITZGERALD, M.T.; CINA, R.A.; STRECK, C.J.; HEBRA, A.V. Effectiveness of Biobrane for treatment of partial-thickness burns in children. **J Pediatr Surg.**, vol. 46, n. 9, pp.1759-63, 2011.

LÍMOVÁ, M. Active wound coverings: Bioengineered skin and dermal substitutes. **Surg Clin North Am**, vol. 90, n. 6, p. 1237-1255, 2010.

LIU, Y.; CHEN, J.Y.; SHANG, H.T.; LIU, C.; WANG, Y.; NIU, R.; WU, J.; WEI, H. Light microscopic, electron microscopic, and immunohistochemical comparison of bama minipig (*Sus scrofa domestica*) and human skin. **Comp. Med.**, vol. 60, n. 2, pp. 142–148, 2010.

LOMBELLO, C.B.; SANTOS JR, A.R.; MALMONGE, S.M.; BARBANTI, S.H.; WADA, M.L.; DUEK, E.A. Adhesion and morphology of fibroblastic cells cultured on different polymeric biomaterials. **J Mater Sci Mater Med.**, v.13, n.9, p.867-74, 2002.

LUCCHESI, C. **Cultura de células vero sobre membranas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) tratadas por plasma gasoso.** 2006. Dissertação (Mestrado): Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo.

LUCIANO, R.M. **Síntese, caracterização e degradação de membranas de Poli (ácido láctico), um polímero biorreabsorvível.** 1997. Dissertação (Mestrado): Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo.

LUCIANO, R.M. . **Efeito da concentração de plastificante em membranas de Poli (ácido láctico) para implantes.** 2001. Dissertação (Doutorado): Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo.

LUCIANO, R.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R.; RINCON, M.C.A. Synthesis and characterization of poly(L-lactic acid) membranes: Studies in vivo and in vitro. **J Mater Sci Mater Med.**, vol. 14, n. 1, pp. 87-94, 2003.

MACLEOD, T.M.; SARATHCHANDRA, P.; WILLIAMS, G.; SANDERS, R.; GREEN, C.J. Evaluation of a porcine origin acellular dermal matrix and small intestinal submucosa as

dermal replacements in preventing secondary skin graft contraction. **Burns**, vol. 30, n. 5, pp.431-7, 2004.

MACNEIL, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. **Materials today**, vol. 11, n. 5, 2008.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: Current concepts and auxiliary resources - Part I. **An.Bras. Dermatol**, vol. 78, n. 4, 2003.

MANSBRIDGE, J. Commercial considerations in tissue engineering. **J Anat**, vol. 209, n.4, p. 527-32, 2006.

MARGULIS, A.; ZHANG, W.; GARLICK, J. A. *In vitro* fabrication of engineered human skin. **Methods Mol Biol**, vol. 289, p. 61-70, 2005.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M.W.J. Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **J. R. Soc Interface**, vol.4, n.14, p. 413-37, 2007.

MINUTH, W.W; STREHL, R.; SCHUMACHER, K. **Tissue engineering: Essentials for daily laboratory work**. Weinheim: Wiley-VGH, 2005, cap.5, p.159-164.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTA, A.C.; DUEK, E.A.R. Síntese, caracterização e degradação *in vitro* do poli (L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, vol. 32, p. 762-798, 2007.

NAMPOOTHIRI, K.M.; NAIR, N.R.; JOHN, R.P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Biores. Technol.**, vol. 101, p. 8493-8501, 2010.

OH, S.J.; KIM, Y. Combined AlloDerm and thin skin grafting for the treatment of postburn dyspigmented scar contracture of the upper extremity. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, vol. 64, n. 2, pp.229-233, 2011.

PALSSON, B.Ø.; BHATA, S.N. **Tissue engineering**. New Jersey: Pearson Education, 2004, cap.15, p. 267-9.

PAPA, G.; PANGOS, M.; RENZI, N.; RAMELLA, V.; PANIZZO, N.; MARIJ, Z.A. Five years of experience using a dermal substitute: indications, histologic studies, and first results using a new single-layer tool. **Dermatologic Surgery**, vol. 37, n. 11, pp. 1631–1637, 2011.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; CLICHÉ, S.; GARIÉPY, C.; GERMAIN, L.; BERTHOD, F. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. **Acta Biomater.**, vol. 7, n. 10, pp. 3757-65, 2011.

PARK, S.N.; JANG, H.J.; CHOI, J.M.C.; SON, S.Y.; HAN, S.H.; KIM, J.H.; LEE, W.J.; SUH, H. Preparation and characterization of biodegradable anti-adhesive membrane for peritoneal wound healing. **J Mater Sci: Mater Med**, vol. 18, n. 3, p. 475-482, 2007.

PAVIA, F.C.; CARRUBBA, V.L.; BRUCATO, V.; GHERSI, G. Tailoring PLLA scaffolds for tissue engineering applications: Morphologies for 2d and 3d cell cultures. **Int J Mater Form**, vol. 2, n. 1, pp.717–720, 2009.

PERAMO, A.; MARCELO, C. Bioengineering the skin-implant interface: The use of regenerative therapies in implanted devices. **Annals Biomedical Engineering**, vol. 38, n. 6, 2010.

PEREIRA, M. C. **Efeito da mitomicina C tópica sobre os depósitos de colágeno total na submucosa das pregas vocais íntegras de suínos**. 2006. Dissertação (Mestrado): Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Paraná.

PÉRTILE, R. A. N. **Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. 2007.

Dissertação (Mestrado): Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

PILLIN, I.; MONTRELAY, N.; GROHENS, Y. Thermo-mechanical characterization of plasticized PLA: Is the miscibility the only significant factor? **Polymer**. v.47, n.13, p. 4676-4682, 2006.

PHAM, C., GREENWOOD, J.; CLELAND, H., WOODRUFF, P., MADDERN, G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: A systematic review. **Burns**, vol. 33, n.8, p. 946–57, 2007.

PLACE, E.S.; EVANS, N.D.; STEVENS, M.M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature Materials**, vol. 8, 2009.

PRASERTSUNG, I.; KANOKPANONT, S.; BUNAPRASERT, T.; THANAKIT, V.; DAMRONGSAKKUL, S. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. **J. Biomed Mater Researc**, vol. 85B, n.1, p. 210-219, 2007.

PRIAY, S.G.; JUNGVID, H.; KUMAR, A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. **Tissue Engineering**, part B, vol. 14, n.1, 2008.

REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER J.J., BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, vol. 27, n.18, p. 3413-31, 2006.

RODAS, A.C.D. **Desenvolvimento de membranas como compósitos dermo-epidérmicos**. 2004. Dissertação (Doutorado): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade São Paulo, São Paulo.

RHEINWALD, J.G; GREEN, H. Formation of keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from teratoma. **Cells**, vol.6, n.3, p. 317- 330, 1975 a.

RHEINWALD, J.G; GREEN, H. Serial cultivation of human epidermal keratinizing colonies from sigle cells. **Cells**, vol.6, n.3, p. 331-334, 1975 b.

SALTZMAN, W.M. **Tissue engineering: Principles for the design of replacement organs and tissue**. New York: Oxford, 2004, cap.14, p. 441-2.

SANTOS JR., A. R.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R.; DOLDER, H.; WADA, R. S.; WADA, M. L. F. Differentiation Patter of Vero Cells Cultured on Poly(L-lactic acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Blends. **Artificial Organs**, vol. 28, n. 4, p. 381-389, 2004.

SANTOS Jr., A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 17, n. 4, pp. 308-317, 2007.

SCAPIN, S.M.N; SILVA, D.R.M.; JOAZEIRO, P.P.; ALBERTO-RINCON, M.C; LUCIANO, R.M.; DUEK, E.A.R. Use of triethylcitrate plasticizer in the production of poly-L-lactic acid implants with different degradation times. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 14, n. 7, p.635-640, 2003.

SCHULTZ 3rd, J.T.; TOMPKINS, R.G.; BURKE, J.F. Artificial skin. **Annu Rev Med**, vol. 51, p. 231- 44, 2000.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering**, vol. 34, n.4, p. 147-230, 2001.

SEARS, J.K.; DARBY, J.R. **The technology of plasticizers**. New York: Wiley, 1982, 1166p.

SHERIDAN, R. Closure of the excised burn wound: Autografts, semipermanent skin substitutes, and permanent skin substitutes. **Clin Plastic Surg**, vol. 36, p. 643 – 651, 2009.

SHEVCHENKO, R.V.; JAMES, S.L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **J. R. Soc. Interface**, vol. 7, pp. 229–258, 2010.

SHEVCHENKO, R.V.; SIBBONS, P.D.; SHARPE, J.R.; JAMES, E. Use of a novel porcine collagen paste as a dermal substitute in full-thickness wounds. **Wound Repair Regen.**, vol. 16, n. 2, pp. 198-207, 2008.

SILVA,D.R.M; SCAPIN,S.M.N.; JOAZEIRO,P.P.; ALBERTO-RINCON, M.C.; LUCIANO, R.M.; DUEK, E.A.R. In vivo interaction of cells on poly L-(lactic acid) membranes containing plasticizer. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 13, n. 3, pp. 327-332, 2002.

SOUTO, L. R. M. **Modelo de pele humana (derme+epiderme) reconstruída *in vitro***. 2005. Dissertação (Mestrado): Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo.

SOUTO, L. R. M.; REHDER, J.; VASSALLO, J.; CINTRA, M. L.; KRAEMER, M. H. & PUZZI, M. B. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **São Paulo Med J.**, São Paulo, vol. 124, n. 2, p. 71-6, 2006.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: Current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, v.52, p.443-451. 2001.

STYNES, G.; KIROFF, G. K.; MORRISON, W. A. J. & KIRKLAND, M. A. Tissue compatibility of biomaterials: Benefits and problems of skin biointegration. **ANZ J Surg.**, vol. 78, n. 8, p. 654-59, 2008.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S.I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Arch. Pathol.**, vol. 78, pp. 69-72, 1964.

TANG, B.; ZHU, B.; LIANG, Y.Y.; BI, L.K.; CHEN, B.; HU, Z.C.; ZHANG, K.; ZHU, J.Y. Early escharectomy and concurrent composite skin grafting over human acellular dermal matrix scaffold for covering deep facial burns. **Plast Reconstr Surg**, vol. 127, n. 4, pp. 1533-8, 2011.

TENENHAUS M, BHAVSAR D, RENNEKAMPFF HO. Treatment of deep partial thickness and indeterminate depth facial burn wounds with water-jet debridement and a biosynthetic dressing. **Injury**, vol. 38, n. 5, pp.39-45, 2007.

VALE, E.C.S. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **An Bras Dermatol.**, vol. 80, n. 1, pp. 9-19, 2005.

VAN SLIEDREGT, A.; VAN LOON, J.A.; VAN DER BRINK, J.; DE GROOT, K.; VAN BLITERSWIJK, C.A. Evaluation of polylactide monomers in an *in vitro* biocompatibility assay. **Biomaterials**, vol. 15, n. 4, pp. 251-6, 1994.

VAN ZUIJLEN, P.P.M.; LAMME, E.N.; VAN GALEN, M.J.M; VAN MARLE, J.; KREIS, R.W.; MIDDELKOOP, E. Long-term results of a clinical trial on dermal substitution. A light microscopy and Fourier analysis based evaluation. **Burns**, vol. 28, n. 2, pp. 151–160, 2002

VERT, M. Poly(Lactic acids). In: WNEK, G.E.; BOWLIN, G.L. **Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering**. New York: Informa, 2006, vol. 3, p.2249-2258.

VERT, M.; LI, M. S.; SPENLEHAUER, G.; GUERIN, P. Bioreabsorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **J Mater Sci**, vol. 3, n. 1, 432p., 1992.

WANG, W.; ZHANG, M.; LU, W.; ZHANG, X.; MA, D.; RONG, X.; YU, C.; JIN, Y. Cross-linked collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid imitating extracellular matrix as scaffold for dermal tissue engineering. **Tissue Engineering: Part C**, vol. 15, n. 00, 2009.

WILSON, C.J.; CLEGG, R.E.; LEAVESLEY, D.I. PEARCY, M.J. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A review. **Tissue Engineering**, vol. 11, no. 1/2, 2005.

Win-Win Chemical CO Limited. China; c2007-2011 (acesso em 24 ago. 2011). Disponível em: www.win-winchemical.com.

WOO, S. I.; KIM, B.O.; JUN, H.S.; CHANG, H.N. Polymerization of aqueous lactic acid to prepare high molecular weight poly(lactic acid) by chain-extending with hexamethylene diisocyanate. **Polymer Bulletin**, vol. 35, p.415-421, 1995.

WUNDERLICH, B. In: **Thermal Characterization of Polymer Materials**. Turi, E. A. 2nd.ed., Academic Press Inc.: New York, 1997, vol. 1, p. 305.

YANNAS, I.V.; ORGILL, D.P.; BURKE, J.F. Template for Skin Regeneration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, vol.127, n. 1S, pp. 60S-70S, 2011.

YANNAS, Y & BURKE, J.F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. **Journal of Biomaterials Research**, vol.15, n. 1 pp.65-81, 1980.

YIM H, CHO YS, SEO CH, LEE BC, KO JH, KIM D, HUR J, CHUN W, KIM JH. The use of AlloDerm on major burn patients: AlloDerm prevents post-burn joint contracture. **Burns**, vol. 36, n. 3, pp.322-8, 2010.

Yoshihiro Takami, Ryo Yamaguchi, Yasushi Matsuda. Method of preparing isolated cell-free skin, cell-free dermal matrix, and method producing the same and composite cultured skin with the use of the cell-free dermal matrix. US7723108, 25 May 2010.

ZOPPI, R. A.; CONTANT, S.; DUEK, E. A. R.; MARQUES, F. R.; WADA, M. L. F.; NUNES, S. P. Porous poly(L-lactide) films obtained by immersion precipitation process: morphology, phase separation and culture of VERO cells. **Polymer**, vol. 40, p. 3275-89, 1999.

ZHANG X, DENG Z, WANG H, YANG Z, GUO W, LI Y, MA D, YU C, ZHANG Y, JIN Y. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration. **Biomaterials**, vol. 30, n. 14, pp. 2666-74, 2009.

ZHANG, X.; YANG, J.; LI, Y.; LIU, S.; LONG, K.; ZHAO, Q.; ZHANG, Y.; DENG, Z.; JIN, Y. Functional neovascularization in tissue engineering with porcine acellular dermal matrix and human umbilical vein endothelial cells. **Tissue Engineering**, vol. 17, n. 4, p. 423-433, 2011.