

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR Christiane Laranjo
Salgado E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 29.10.2009
Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
ORIENTADOR

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

Desenvolvimento de Matrizes Tridimensionais Poliméricas para Aplicação em Engenharia de Tecido Ósseo

Autora: Christiane Laranjo Salgado
Orientadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Co-orientadora: Elisabete Maria Saraiva Sanchez

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS E PROCESSAMENTO**

Desenvolvimento de Matrizes Tridimensionais Poliméricas para Aplicação em Engenharia de Tecido Ósseo

Autora: Christiane Laranjo Salgado
Orientadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Co-orientadora: Elisabete Maria Saraiva Sanchez

Curso: Engenharia Mecânica
Área de Concentração: Materiais e Processamento

Tese de doutorado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Campinas, 29 de julho de 2009
S.P . – Brasil

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

Sa32d Salgado, Christiane Laranjo
Desenvolvimento de matrizes tridimensionais
poliméricas para aplicação em engenharia de tecido
ósseo / Christiane Laranjo Salgado. --Campinas, SP:
[s.n.], 2009.

Orientadores: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia,
Elisabete Maria Saraiva Sanchez.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Polimeros - Biodegradação. I. Zavaglia, Cecília
Amélia de Carvalho. II. Sanchez, Elisabete Maria
Saraiva. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Título em Inglês: Development of threedimensional polymer matrices for bone
tissue engineering

Palavras-chave em Inglês: Biodegradable polymers

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Maria Clara Filippini Ierardi, Ângela Maria Moraes,
Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Data da defesa: 29/07/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

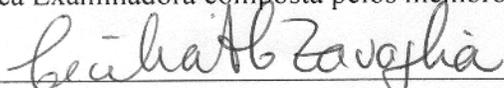
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS E PROCESSAMENTO

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento de Matrizes Tridimensionais
Poliméricas para Aplicação em Engenharia de
Tecido Ósseo**

Autora: Christiane Laranjo Salgado
Orientadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Co-orientadora: Elisabete Maria Saraiva Sanchez

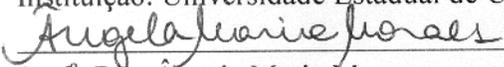
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:



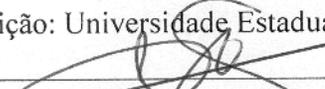
Prof.^a. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, presidente
Instituição: Universidade Estadual de Campinas



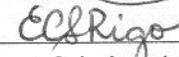
Prof.^a. Dra. Maria Clara Filippini Ierardi
Instituição: Universidade Estadual de Campinas



Prof.^a. Dra. Ângela Maria Moraes
Instituição: Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior
Instituição: Universidade Federal do ABC



Prof.^a. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo
Instituição: Universidade de São Paulo

Campinas, 29 de julho de 2009

Dedicatória:

Dedico este trabalho aos meus queridos pais e a minha irmã.

Agradecimentos

Este trabalho não poderia ser terminado sem a ajuda de diversas pessoas às quais presto minha homenagem:

Ao meu marido pelo apoio e pela compreensão nos períodos de ausência.

À Prof^a. Dr^a. Cecília Zavaglia e Dr^a. Elisabete Sanchez pela constante orientação e confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Granja pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório.

Ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e de estágio de doutorado, respectivamente. À FINEP por proporcionar recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos do LABIOMECC pelo esforço de trabalho em equipe e disponibilidade para auxílio no laboratório.

Aos professores e alunos do INEB pelo auxílio prestado durante um ano de convivência e pela colaboração com os meus resultados. Especialmente à Sílvia Bidarra e Suzana Guerreiro pelo apoio e palavras de incentivo.

À Claudinete da FEM/UNICAMP e Daniela do CEMUP/UP pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

À Ana Beatriz da SOBRAPAR pela ajuda nos ensaios *in vivo* e Rosana da FCM pela confecção das lâminas histológicas.

Ao Adilson da FCM pela oportunidade de utilizar o laboratório de imagens.

Ao Dr. Cícero Naelcim da NAELCIM e Dr. Augusto pela colaboração na elaboração da patente gerada por este trabalho.

Às meninas da república do Léo pelos momentos de descontração. Aos amigos de Campinas, prefiro não citar nomes para não esquecer ninguém, pela convivência e aprendizado mútuo.

A todos os funcionários da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) que de maneira direta ou indireta, colaboraram com a realização desta tese.

“Nunca se afaste dos seus sonhos. Sem eles você vive, mas não existe.”
Mark Twain

Resumo

SALGADO, Christiane Laranjo. *Desenvolvimento de Matrizes Tridimensionais Poliméricas para Aplicação em Engenharia de Tecido Ósseo*; Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 164 p. Tese (Doutorado).

A engenharia tecidual é um campo emergente na biomedicina moderna, que promete um novo caminho de esperança para o transplante biológico, criando substitutos viáveis para órgãos e tecidos danificados. O objetivo primordial de várias das estratégias desta terapia que está sendo desenvolvida é regenerar estrutural e funcionalmente, os tecidos lesionados ou perdidos utilizando células em combinação com matrizes sintéticas. Pensando nesta problemática, foi desenvolvido um biomaterial, na forma de arcabouço porosa obtida por evaporação do solvente orgânico. Este material foi utilizado nas primeiras avaliações da blenda polimérica e a seguir foi desenvolvida semelhante matriz como gel, com o intuito de possibilitar a introdução do biomaterial ao organismo humano por meio de uma seringa de injeção comum. Foi utilizada uma policaprolactona (PCL) de alta massa molecular combinada com um polímero natural, ácido sebácico (AS), derivado do óleo de rícino, com baixa massa molecular, para acelerar o tempo de degradação. Os materiais foram caracterizados termicamente (DSC, TGA e DMA), mecanicamente (ensaio de tração) e microscopicamente (MEV e OPM). Foi também analisada sua degradação em solução salina (PBS). Como resultados, foram verificados que o material (PCL/AS) mantém as mesmas propriedades térmicas do polímero puro, sendo elas alteradas à medida que se aumenta a percentagem de AS (10 e 20 %), no entanto o tempo de degradação é relativamente menor. A biocompatibilidade foi analisada por protocolos conhecidos e padronizados (ASTM e ISO) e podemos concluir que o material é compatível com cultura de células. O biomaterial em forma de gel favoreceu a diferenciação de células mesenquimais (medida pela atividade de ALP). Em avaliações *in vivo* (implantes subcutâneos) utilizando ratos Wistar, tanto a arcabouço quanto o gel promoveram regeneração do tecido no qual o material foi implantado e reações adversas não foram observadas.

Palavras chave: Gel, arcabouços, policaprolactona, ácido sebácico, engenharia tecidual.

Abstract

SALGADO, Christiane Laranjo. Development of Threedimensional Polymer Matrices for Bone Tissue Engineering Application: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 164 p. Tese (Doutorado).

Tissue engineering, a new emerging field in modern biomedical sciences, promises a new ray of hope for transplantation biology by creating viable substitutes for such failing organs or tissues. The ability to manipulate and reconstitute tissue function has tremendous clinical implications and is likely to play a key role in cell and gene therapies in the coming years. Thinking about this problem, we developed a biomaterial, either in form of a membrane (casting) or as a gel. The last one could be injected on the human body with a common syringe. For this purpose it was prepared with high molecular weight polycaprolactone (PCL) and a natural polymer, sebacic acid (SA), a part of castor oil with low molecular weight to accelerate the degradation rate. Thermal analyses were carried out to characterize the materials (DSC, TGA e DMA). The material's mechanical resistance was evaluated, as well as its surface by microscopy (SEM and OPM). The hydrological degradation was evaluated through exposure to saline solution (PBS). We used well known protocols (ASTM and ISO) to evaluate the material's biocompatibility and the degradation rate. The results allowed us to conclude that the gel is biocompatible, promote the differentiation of MSC's and presented a degradation rate adequate to be used in bone tissue engineering. Wistar's rats were used for *in vivo* evaluation. Both membrane and gel blends promoted tissue regeneration and adverse reactions were not observed on subcutaneous implants.

Key words: Gel, membrane, polycaprolactone, sebacic acid, Tissue Engineering.

Contribuições em Congressos

Salgado, C.L.; Zavaglia, C.A.C. Polymeric Threedimensional Matrixes Used in Osteo Tissue Engineering. In: Porto, Portugal, 2006. Anais em CD: 7th Advanced Summer Course in Cell-Materials Interactions, 2006

Salgado, C.L.; Sanchez, E.M.S.; Zavaglia, C.A.C. Evaluation of Polycaprolactone and Sebacic Acid Blends Fused for Bone Tissue Engineering. In: Euromat 2007, Nuremberg, Alemanha. Anais em CD: European Conference in Materials, 2007.

Salgado, C.L.; Sanchez, E.M.S.; Oliveira, M.F; Maia, I.A.; Silva, J.V.; Zavaglia, C.A.C. Evaluation of Bioabsorbable Polycaprolactone Used in Rapid Prototyping. In: Virtual and Rapid Manufacturing: Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping, Londres, Taylor and Francis, 2007. VR@AP 2007, Leiria, Portugal, 2007.

Salgado, C.L.; Sanchez, E.M.S.; Granja, P.L.; Zavaglia, C.A.C. Injectable Polymeric Matrices for Bone Tissue Engineering. In: 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, Holanda. Anais em CD: World Biomaterials Congress, 2008.

Salgado, C.L.; Sanchez, E.M.S.; Zavaglia, C.A.C. Evaluation of Polycaprolactone and Sebacic Acid Blends Scaffolds for Bone Tissue Engineering. 5^o COLAOB, Ouro Preto, MG. Anais em CD: 5^o Congresso de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008.

Salgado, C.L.; Solomão, Z.; Silva, P.B.; Sanchez, E.M.S.; Zavaglia, C.A.C. Biocompatibility and osteo-differentiation of Poly(e-caprolactone)and b-tricalcium Composite Membranes. In: Key Engineering Materials, v. 396, p.399-402, 2008. Bioceramics 21, 2008, Búzios, RJ, 2008.

Salgado, C.L.; Sanchez, E.M.S.; Zavaglia, C.A.C. Thermal Analyses of Polycaprolactone and Sebacic Acid Gel with Hydrolytic Degradation. In: 19^o CBECIMAT 2008, Porto de Galinhas, PE. Anais em CD: Congresso Brasileiro de Ciências dos Materiais, 2008.

Sumário

| | |
|--|--------------|
| Lista de Figuras | xvi |
| Lista de Tabelas | xx |
| Nomenclatura | xxiii |
| 1 Introdução | 1 |
| 2 Revisão de Literatura | 6 |
| 2.1 Engenharia Tecidual | 6 |
| 2.1.1 Biocompatibilidade | 7 |
| 2.1.2 Cicatrização | 8 |
| 2.2 Tecido Ósseo | 11 |
| 2.2.1 Anatomia Óssea | 11 |
| 2.2.2 Matriz Óssea | 12 |
| 2.3 Matrizes Extracelulares (MECs) | 12 |
| 2.3.1 MECs Sintéticas | 12 |
| 2.3.2 Materiais para MECs | 13 |
| 2.4 Polímeros Biodegradáveis | 14 |
| 2.4.1 Policaprolactona | 18 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.4.2 | Ácido Sebácico | 19 |
| 2.5 | Célula-tronco Mesenquimal de Medula Óssea | 20 |
| 2.6 | Materiais Injetáveis | 21 |
| 2.7 | Metodologias Empregadas na Caracterização e Análise de Desempenho de Biomateriais | 22 |
| 2.7.1 | Análise por Microscopia | 23 |
| 2.7.2 | Análise Térmica | 24 |
| 2.7.3 | Ensaio de Resistência Mecânica à Tração | 25 |
| 2.7.4 | Avaliações de Citotoxicidade e Bioatividade | 26 |
| 3 | Objetivos | 30 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 30 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 30 |
| 4 | Materiais e Métodos | 33 |
| 4.1 | Materiais | 33 |
| 4.2 | Preparo de Arcabouços Poliméricos Porosos | 34 |
| 4.2.1 | Preparação de Ácido Sebácico | 34 |
| 4.2.2 | Confeccionar Arcabouços Densos de PCL/AS por Evaporação do Solvente | |
| 4.2.3 | Lixiviação do Sal das Amostras | 35 |
| 4.3 | Gel Injetável de Blenda Polimérica | 35 |
| 4.4 | Caracterização Físico-química e Estrutural | 35 |
| 4.4.1 | Microscopia Ótica Diferencial (OPM) | 36 |
| 4.4.2 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 36 |
| 4.4.3 | Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) | 36 |
| 4.4.4 | Análises Termogravimétricas (TGA) | 37 |
| 4.4.5 | Avaliação da Resistência Mecânica à Tração | 37 |
| 4.4.6 | Medida de Ângulo de Contato | 37 |
| 4.5 | Análises de Biodegradação | 38 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.5.1 | Degradação <i>in vitro</i> em Tampão Fosfato (PBS - pH 7,4) | 39 |
| 4.5.2 | Tratamento de Superfície dos Arcabouços com Solução Alcalina (NaOH) | 39 |
| 4.6 | Avaliação <i>in vitro</i> dos Biomateriais | 39 |
| 4.6.1 | Cultura de Células | 39 |
| 4.6.2 | Análise de Citotoxicidade e Densidade | 39 |
| 4.6.3 | Avaliação da Morfologia Celular | 40 |
| 4.6.4 | Diferenciação Celular (Métodos de ALP e Von Kossa) | 43 |
| 4.7 | Avaliação <i>in vivo</i> dos Biomateriais | 44 |
| 4.7.1 | Implante Subcutâneo em Ratos Wistar (Arcabouço e Gel) | 46 |
| 4.7.2 | Implante em Tíbia de Ratos Wistar (Gel) | 47 |
| 5 | Resultados e Discussão | 50 |
| 5.1 | Arcabouços da Blenda de PCL/AS | 50 |
| 5.1.1 | Morfologia de Superfície Avaliada por Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura | 53 |
| 5.1.2 | Caracterização das Propriedades Térmicas | 58 |
| 5.1.3 | Análise das Propriedades Mecânicas | 59 |
| 5.1.4 | Tratamento de Superfície do Biomaterial | 60 |
| 5.1.5 | Biodegradação | 61 |
| 5.1.6 | Citotoxicidade do Arcabouço da Blenda | 64 |
| 5.1.8 | Avaliação Morfologia e Proliferação Celular (MEV e Confocal) | 66 |
| 5.1.9 | Histologia de Ratos Wistar com Implantes Subcutâneos | 68 |
| 5.2 | Gel da blenda de PCL/AS | 73 |
| 5.2.1 | Morfologia de Superfície Avaliada por Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura | 74 |
| 5.2.2 | Caracterização das Propriedades Térmica e Dinâmico-Mecânica | 75 |
| 5.2.3 | Hidrofilicidade do Biomaterial | 77 |
| 5.2.4 | Biodegradação | 77 |
| 5.2.5 | Morfologia de Superfície após Degradação <i>in vitro</i> (MEV) | 82 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.6 Avaliações de Citotoxicidade | 84 |
| 5.2.6.1 Ensaio de Contato Direto e Indireto | 84 |
| 5.2.6.2: Análise da Apoptose por Citometria de Fluxo | 88 |
| 5.2.7 Avaliação da Morfologia e Proliferação Celular (MEV e Confocal) | 89 |
| 5.2.8 Avaliação da Atividade de Fosfatase Alcalina | 92 |
| 5.2.9 Avaliação de Calcificação de Matriz Extracelular (Von Kossa) | 94 |
| 5.2.10 Avaliação <i>in vivo</i> de Implante Subcutâneo em Ratos Wistar | 95 |
| 5.2.11 Avaliação <i>in vivo</i> do Gel de PCL/AS em Tíbia de Ratos Wistar | 100 |
| 6 Conclusões | 105 |
| 7 Referências Bibliográficas | 108 |
| 8 Anexos | 123 |
| 8.1 Resultados de DSC dos Arcabouços de PCL/AS | 123 |
| 8.2 Resultados de MEV dos Géis de PCL/AS | 123 |
| 8.3 Resultados de Análise de Ângulo de Contato dos Arcabouços de PCL/AS | 124 |
| 8.4 Resultados de Citotoxicidade por Contato Direto dos Arcabouços de PCL/AS | 124 |
| 8.5 Resultados de Citometria de Fluxo | 125 |
| 8.6 Resultados de MEV de Cultura de MG63 em Arcabouços de PCL/AS | 125 |
| 8.7 Projeto Aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade de Biologia da UNICAMP | 126 |

Lista de Figuras

- Figura 1: Técnica de engenharia tecidual. (a) Remoção de fragmento de tecido do paciente, (b) cultura celular *in vitro*, (c) dissociação do tecido em células para cultura, (d) expansão da cultura celular, (e) cultura de células com o biomaterial, (f) diferenciação celular com o biomaterial, (i e g) controle dos parâmetros de cultura celular do biorreator pelo computador, (h e j) técnico que avalia e ajusta os parâmetros de cultura celular no biorreator. (j) Implante do biomaterial depois da fase *in vitro* no paciente. (Hench, 2006) 6
- Figura 2: Desenho representativo de etapas de cicatrização observadas na superfície de um biomaterial (Muschler *et al.*, 2004) 8
- Figura 3: Representação de resposta tissular à presença de biomateriais (Anderson *et al.*, 1996)..9
- Figura 4: À esquerda, imagem de sistema de suporte sintético utilizado na Engenharia Civil para construção de paredes em edifícios. À direita, imagem de sistema de poros de matriz extracelular sintética (Microscopia eletrônica de varredura - MEV) 12
- Figura 5: Degradação/erosão de polímeros bioreabsorvíveis. A redução do preto para cinza até o branco demonstra a quebra das cadeias poliméricas e a perda de material pela degradação (Burkersroda *et al.*, 2002). 16

| | |
|--|----|
| Figura 6: Estrutura química expandida de policaprolactona..... | 17 |
| Figura 7: Estrutura química expandida de ácido sebácico..... | 18 |
| Figura 8: Fotografia de planta (<i>Ricinus communis</i>) e semente de rícino (http://www.flickr.com/photos)..... | 19 |
| Figura 9 – Curva de tensão por deformação de material ensaiado por tração (Manrich, 2005) | 25 |
| Figura 10: Fórmula química do (3- (4,5 – dimetiazol -2-yl) brometo-2,5-difeniltetrazol) – MTT | 26 |
| Figura 11: Esquema de metabolização do azul de Alamar (resazurina)..... | 27 |
| Figura 12 – Esquema geral dos ensaios que serão realizados durante o desenvolvimento do projeto | 33 |
| Figura 13: (A) Amostra de gel de PCL/AS. (B) A foto destaca a fluidez do gel. (C) Após 1 h, o gel se torna estável e não apresenta fluidez..... | 35 |
| Figura 14: Imagem do programa de computador utilizado para a medida do ângulo de contato de uma gota de água e a superfície dos arcabouços estudados..... | 37 |
| Figura 15: Diagrama que estabelece a sequência de processos biológicos associados com a cicatrização dos implantes..... | 46 |
| Figura 16: (A) Fotografia de cirurgia em tíbia de rato para implante de gel de PCL/AS (orifício de 3 mm). (B) Desenho esquemático da área da pata do animal onde foi feito o defeito na tíbia | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 17: (A) Arcabouço de PCL observada por microscopia óptica polarizada (Ampliação - 10x). (B) Arcabouço de PCL/AS (90:10 – % m/m) (Ampliação - 4x)..... | 51 |
| Figura 18: Micrografias dos arcabouços poliméricas (MEV). (A) PCL puro. (B) PCL/AS 90:10 (% m/m), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m)..... | 51 |
| Figura 19: Micrografias dos arcabouços poliméricos porosos (MEV). (A) PCL puro. (B) PCL/AS 90:10 (% m/m), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m)..... | 52 |
| Figura 20: Curvas de TGA dos arcabouços de PCL e de PCL/AS de diferentes composições. | 53 |
| Figura 21: (A) Curvas de TGA do arcabouço de PCL. (B) Curva de perda de massa e da derivada de arcabouço de PCL/AS 90:10 (% m/m)..... | 53 |
| Figura 22: (A) Curvas de DSC do arcabouço de policaprolactona e ácido sebácico. (B) PCL/AS nas proporções 90:10 e 80:20 (% m/m) | 55 |
| Figura 23: (A) Módulo de armazenamento (E') na análise de DMA com polímero puro de PCL e dos arcabouços das blendas com diferentes concentrações de AS (90:10 e 80:20 - % m/m) (E'). (B) Curvas de módulo de perda (E'') das mesmas amostras..... | 56 |
| Figura 24: Micrografias dos arcabouços poliméricos tratados com solução de NaOH (0,1 M). (A) PCL puro. (B) PCL/AS 90:10 (% m/m), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m)..... | 59 |
| Figura 25: Curvas de perda de massa dos arcabouços da blenda de PCL/AS incubadas em solução salina (PBS) por diferentes períodos de tempo. Análise estatística <i>t student</i> $p < 0,05$ | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 26: Arcabouços de PCL/AS (80:20, % m/m) após 30, 90 e 120 dias de degradação em PBS a 37°C (A, C e E). Degradação (30, 90 e 120 dias) do arcabouço da blenda de PCL/AS (90:10, % m/m) em PBS a 37°C (B, D e F)..... | 62 |
| Figura 27: Viabilidade celular do arcabouço de PCL-AS em osteoblastos humanos (MG63) em ensaio de metabolismo celular (MTT) por 72 h. Análise estatística <i>t student</i> $p < 0,05$ | 63 |
| Figura 28: Viabilidade celular e atividade de ALP (fosfatase alcalina) de células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) em contato com diferentes concentrações das arcabouços de PCL/AS por 15 dias. Análise estatística <i>t student</i> $p < 0,05$ | 64 |
| Figura 29: Micrografias dos arcabouços porosas poliméricas incubadas com osteoblastos (MG63) por 7 dias. (A) Arcabouço de PCL puro (500x). (B) PCL/AS 90:10 (% m/m) (200x), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m) (500x). (D) Ampliação de osteoblasto para visualizar aderência na superfície do arcabouço de PCL/AS 90:10 (% m/m)..... | 66 |
| Figura 30: Microscopia confocal dos arcabouços de PCL puro, PCL/AS 90:10 e 80:20 (% m/m) (A, B e C, respectivamente) incubado com osteoblastos humanos (MG63) por 10 dias. Ampliação e detalhes da morfologia celular..... | 66 |
| Figura 31: Fotografias de implantes subcutâneos dos arcabouços porosos da blenda de PCL/AS após 30 e 60 dias. (A e D) PCL puro. (B e E) PCL/AS 90:10 (% m/m). (C e F) Blenda 80:20 (% m/m). | 68 |
| Figura 32: Implantes dos arcabouços após 30 dias. Tecido processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) PCL puro (10x). (B) PCL/AS 80:20 (% m/m) (10x). (C) PCL/AS 90:10 (% m/m) (10x). As setas azuis apontam a cápsula fibrosa (CF) e as setas pretas mostram as células gigantes (CG). O espaço vazio nas imagens refere-se a presença do material que é removido durante o processamento..... | 69 |

Figura 33: Implantes dos arcabouços após 60 dias. Tecido processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) PCL puro (10x). (B) PCL/AS 80:20 (% m/m) (10x). (C) PCL/AS 90:10 (% m/m) (10x). As setas azuis apontam a cápsula fibrosa (CF) e as setas pretas mostram as células gigantes (CG). O espaço vazio nas imagens refere-se a presença do material que é removido durante o processamento..... 70

Figura 34: Desenho esquemático de sequência de eventos após a implantação de materiais em tecido subcutâneo..... 71

Figura 35: (A) Microscopia óptica do arcabouço de PCL puro. (B) Microscopia óptica do gel da blenda de PCL/AS 95:05 (% m/m)..... 74

Figura 36: (A) Microscopia da superfície do gel de PCL/AS (95:05 % m/m) seco em temperatura ambiente por 24 h. (B) Linhas de conformação do gel após ser injetado por uma seringa comum. (C) Linhas de fluxo do material após injeção..... 74

Figura 37: (A) Curvas de DSC de policaprolactona (PCL) e do ácido sebáico (AS). (B) Gel da blenda de PCL/AS 95:05 (% m/m)..... 104

Figura 38: (A) Curvas de DMA com PCL puro e do gel da blenda de PCL/AS (95:05 - % m/m), módulo de armazenamento (E'). (B) Módulo de perda (E'') de ambos os materiais..... 76

Figura 39: (A) Curvas de DMA do gel de PCL/AS 95:05 antes e depois da degradação em solução de fosfato (PBS). Módulo de armazenamento (E') nos tempos de degradação 30, 60, 90 e 120 dias. (B) PCL puro em PBS por 0, 30, 60, 90 e 120 dias. (C) PCL/AS 95:05 antes e depois da degradação (Módulo de perda – E'') (D) PCL antes e depois da degradação (E'')..... 77

| | |
|--|----|
| Figura 40: Amostras de PCL/AS (95:05, % m/m) gel com 30 e 60 dias de degradação (A e B, respectivamente) fotografados no MEV..... | 80 |
| Figura 41: Amostras de PCL/AS (95:05, % m/m) gel com 90 e 120 dias de degradação fotografados no MEV..... | 82 |
| Figura 42: Curvas de perda de massa dos arcabouços da blenda de PCL/AS incubadas em solução salina (PBS) por diferentes períodos de tempo. Análise estatística <i>t student</i> $p < 0,05$ | 82 |
| Figura 43: Medida de viabilidade celular indireta do gel de PCL/AS com MG63 por metabolismo do MTT. Controle negativo representado pela linha em 100 %. Análise estatística <i>t student</i> $p < 0,05$ | 83 |
| Figura 44: Medida de viabilidade celular indireta do gel de PCL/AS com hMSC por método de azul de Alamar. Controle negativo representado pela linha em 100 %. Análise estatística <i>t student</i> $p < 0,05$ | 84 |
| Figura 45: Fotografia de ensaio de teste do contato direto da blenda PCL/AS 95:05 (% m/m) com osteoblastos (MG63). (B) Imagem de microscopia óptica (100x) das células dentro da área de contato..... | 85 |
| Figura 46: (A) Blenda PCL/AS 95:05 (% m/m) com osteoblastos (MG63) marcados com calceína (verde) e iodeto de propídeo (vermelho) (24 h) (10x). (B) Micrografia da superfície do material..... | 86 |
| Figura 47: (A) Imagem de imunofluorescência da blenda PCL/AS 95:05 (% m/m) com osteoblastos (MG63) (10x). (B) Células marcadas com iodeto de propídeo com 48 h de incubação em meio de cultura (α -MEM e 10% SBF) (10x)..... | 86 |

Figura 48: Micrografias do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m) incubados com osteoblastos (MG63) por 3, 7 e 10 dias (A, B e C, respectivamente) (200x)..... 89

Figura 49: Micrografias do gel incubadas com osteoblastos (MG63) por 10 dias. (A) Gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), (B) Ampliação da imagem para visualizar a aderência das células na superfície da amostra..... 90

Figura 50: Micrografias do gel com células tronco de medula óssea humana (hMSC) por 10 dias. (A) Gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), (B) Ampliação da imagem para visualizar a aderência das células na superfície da amostra 90

Figura 51: (A) Atividade de ALP (fosfatase alcalina) por células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) em contato com gel de PCL/AS. (B) Citotoxicidade direta do gel de PCL/AS em hMSC no ensaio de metabolismo celular (azul de Alamar). Análise estatística *t student* $p < 0,05$ 92

Figura 52: (A) Fotografia de microscópio de fluorescência de cultura de hMSC corado para Von Kossa (Círculos) após 10 dias. (B) 15 dias de incubação com gel de PCL/AS.....93

Figura 53: Fotografias dos implantes subcutâneos de gel de PCL/AS após 30, 60 e 90 dias (A, B, C, respectivamente)..... 94

Figura 54: Implantes do gel de PCL/SA após 30 dias. O tecido foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). As fotografias foram obtidas por microscopia óptica (Ampliação – 10 e 100x). As setas indicam as partículas de gel..... 95

Figura 55: Implantes do gel de PCL/SA após 60 e 90 dias (A e B, respectivamente). O tecido foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). As micrografias foram obtidas por microscopia óptica (Ampliação – 10 e 100x). As setas pretas visualizam as partículas de gel. As setas azuis apontam os vasos sanguíneos neoformados (SV = vasos sanguíneos)..... 96

Figura 56: Fotografias de implantes em tíbia de rato do gel da blenda de PCL/AS. (A) 30 dias de implante. (B) 60 dias de implante. (C) 90 dias de implante. |..... 98

Figura 57: Implantes em tíbia de rato após 30 dias. O tecido ósseo foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) Micrografias do controle (sem material) (Ampliação – 10x). (B) Micrografia do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), formação de tecido ósseo abaixo do material..... 99

Figura 58: Implantes em tíbia de rato após 60 dias. O tecido ósseo foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) Micrografias do controle (sem material) (Ampliação – 10x). (B) Micrografia do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), formação de tecido ósseo abaixo do material..... 99

Figura 59: Implantes em tíbia de rato após 90 dias. O tecido ósseo foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) Micrografias do controle (sem material) (Ampliação – 10x). (B) Micrografia do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), formação de tecido ósseo abaixo do material..... 101

Figura 60: Desenho esquemático da sequência de eventos celulares e de cicatrização após a implantação de arcabouço ou gel de PCL/AS..... 102

Figura 61: Curva de DSC do arcabouço da blenda de PCL/AS 50:50 (% m/m). A faixa de temperatura utilizada foi de 25-200 °C com um aumento de 10 °C/min 121

| | |
|---|-----|
| Figura 62: Curva de DSC do arcabouço de PCL/AS 70:30 (% m/m). A faixa de temperatura utilizada foi de 25-200 °C com um aumento de 10 °C/min | 121 |
| Figura 63: Amostras de PCL/AS (70:30, % m/m) gel sem degradação (direita) e com 30 dias de degradação fotografados no MEV (50x). | 122 |
| Figura 64: Análise de ângulo de contato do arcabouço de PCL puro onde foi utilizada água destilada como solução. | 122 |
| Figura 65 (A) Análise de ângulo de contato do arcabouço de PCL/AS 80:20 onde foi utilizada água destilada como solução. (B) Análise de ângulo de contato da arcabouço de PCL/AS 80:20 tratado com NaCl 0,1M, onde foi utilizada água destilada como solução. | 122 |
| Figura 66 Análise de ângulo de contato do arcabouço de PCL/AS 90:10 onde foi utilizada água destilada como solução. | 123 |
| Figura 67 Fotografias de ensaio de teste do contato direto do arcabouço da blenda PCL/AS 70:30 (% m/m) com osteoblastos (MG63). À esquerda ampliação de 10x da placa, a área demarcada corresponde aos limites do material. À direita imagem de microscopia óptica com aumento de 100x das células da área de contato. | 123 |
| Figura 68 Fotografias de ensaio de teste do contato direto da blenda PCL/AS 50:50 (% m/m) com osteoblastos (MG63). À esquerda ampliação de 10x da placa, a área demarcada corresponde aos limites do material. À direita imagem de microscopia óptica com aumento de 100x das células da área de contato. | 123 |
| Figura 69 Controle de citometria de fluxo de células MG63 incubadas por 24H (esquerda). Citometria de fluxo de células MG63 incubadas por 24H com gel de PCL/AS 95:05 (% m/m). | 124 |

Figura 70: Micrografias dos arcabouços porosas poliméricas incubadas com osteoblastos (MG63) por 7 dias. (A) Arcabouço de PCL/AS 70:30 (% m/m) (500x), (B) PCL/AS 50/50 (% m/m) (500x). 124

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Reações celulares na presença de biomateriais adaptado de Anderson e colaboradores (1996) | 7 |
| Tabela 2: Índice morte celular por análise de Contato Direto segundo a ISO 10993-5..... | 40 |
| Tabela 3: Índice de zona de contato das células com o material por análise de contato direto segundo a ISO 10993-5..... | 40 |
| Tabela 4: Metodologia de classificação celular pelo método de citometria de fluxo. | 42 |
| Tabela 5: Forma de análises dos dados histológicos de implantes de arcabouços e de gel em tecido subcutâneo (ratos Wistar)..... | 47 |
| Tabela 6: Forma de análises dos dados histológicos de implantes de gel em tecido ósseo (tíbia de rato Wistar)..... | 48 |
| Tabela 7: Resultados de análises de TGA dos arcabouços da blenda de PCL/AS com diferentes composições..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Tabela 8: Análises de DSC e DMA dos arcabouços de PCL/AS com diferentes composições..... | 55 |
| Tabela 9: Avaliação da resistência mecânica de PCL puro e arcabouços de diferentes composições da blenda com AS..... | 56 |
| Tabela 10: Propriedades biomecânicas do osso (Murugan e Ramakrishna, 2005)..... | 57 |
| Tabela 11: Resultados de análise de ângulo de contato dos arcabouços de diferentes composições da blenda com e sem tratamento com NaOH por 24 h..... | 58 |
| Tabela 12: Análise de contato direto de células MG63 incubadas com arcabouços de PCL/AS de diferentes composições..... | 59 |
| Tabela 13: Resultados histopatológicos dos implantes dos arcabouços de PCL/AS..... | 70 |
| Tabela 14: Análises de DSC e DMA do gel da blenda de PCL/AS com diferentes composições..... | 75 |
| Tabela 15: Avaliação da perda de água do gel de PCL/AS 95:05 (m/m%)..... | 77 |
| Tabela 16: Avaliação de absorção de água pelo gel de PCL/AS 95:05 (m/m%)..... | 78 |
| Tabela 17: Resultados da análise de ângulo de contato do gel da blenda..... | 78 |
| Tabela 18: Análises de DSC e DMA de PCL e gel da blenda com diferentes composições após degradação hidrolítica em PBS..... | 79 |
| Tabela 19: Análise de contato direto com células MG63 incubadas com gel de PCL/AS..... | 85 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 20: Avaliação de citotoxicidade direta com MG63 por citometria de fluxo..... | 87 |
| Tabela 21: Resultados histopatológicos dos implantes do gel de PCL/AS | 97 |
| Tabela 22: Resultados histopatológicos dos implantes do gel de PCL/AS | 101 |

Nomenclatura

Abreviaturas

ABNT = Associação Brasileira de Normas e Terminologias

ALP = Atividade de Fosfatase Alcalina

AS = ácido sebáico

ASTM = *American National Standards Institute*

ATV = tripsina bovina

BMP = proteínas morfo-genéticas

β -TCP = beta fosfato tricálcio

DMA = Análise Dinâmico-mecânica

α -MEM = meio de cultura celular MEM

DMSO = dimetilsulfóxido

DSC = Calorimetria Diferencial de Varredura

EGF = fator de crescimento epidermal

FCM/UNICAMP = Faculdade de Ciências Médica da Universidade Estadual de Campinas

HA = hidroxiapatita

hMSC = Linhagem de células mesenquimais de medula óssea humana

IF- γ = Interferon gama

IL-1 = Interleucina um

ISO = *International Organization for Standardization*

MEC = Matriz Extracelular

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

MG63 = Linhagem de osteoblasto de osteossarcoma humano
m/m = massa/massa
MOP = microscópio óptica com luz polarizada
MSC = células-tronco mesenquimais
MSCGM = meio de cultura celular para células mesenquimais de medula humana
MTT = (3- (4,5 – dimetiazol -2-yl) brometo-2,5-difeniltetrazol)
PCL = policaprolactona
PCL/AS = blenda de policaprolactona e ácido sebácico
PBS = Tampão fosfato salino
PGA = poli(ácido glicólico)
PLA – poli(ácido láctico)
PLGA = poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVA = polivinil ácido
SBF = soro fetal bovino
TGA = Análise Termogravimétrica
TGF- β = Fator de crescimento fibroblástico beta
UV = raios ultravioleta

Elementos e Fórmulas Químicas

AgNO₃ = nitrato de prata
Ca = íon cálcio
CO₂ = dióxido de carbono
H₂O = molécula de água
Mg = íon magnésio
Na = íon sódio
NaOH = hidróxido de sódio
OH = grupo hidroxila
P = íon fósforo
PO₄ = fosfato

Símbolos

ΔH_f = entalpia de fusão

H_m = entalpia de fusão

mW = massa molecular

m/V = massa/volume

T_c = temperatura de cristalização

T_g = temperatura de transição vítrea

T_m = temperatura de fusão

Capítulo 1

Introdução

Com o avanço da medicina, temos hoje um aumento sistemático da expectativa de vida. Devido ao envelhecimento da população, observa-se uma redução das atividades teciduais e dos órgãos e de suas propriedades. Dentre as alternativas disponíveis nos últimos anos na medicina cirúrgica, ligadas à reconstrução de tecidos e órgãos, podem ser citadas: enxertos autógenos (retirada de tecido local para ser reimplantado na área danificada), enxertos homogêneos (utiliza-se de tecido ou órgão da mesma espécie para repor o danificado, podendo haver alguns problemas de rejeição), enxertos heterogêneos (utiliza-se tecido de outras espécies para substituir o tecido ou órgão perdido, mas há a possibilidade de transmissão de doenças de outras espécies para o ser humano) e biomateriais (neste tratamento existe uma gama variada de materiais, e o seu uso depende da aplicação e das propriedades mecânicas e biológicas solicitadas) (Ratner *et al.*, 1995).

A engenharia tecidual tem sido desenvolvida para substituir, reparar ou reconstruir tecidos ou órgãos danificados por acidentes ou doenças debilitantes (Langer, 2000). A complexidade deste processo demanda uma interação entre cientistas de diversas áreas, como a engenharia, medicina, biologia e farmácia. Muitas terapias atuais podem ser melhoradas com esta estratégia *in vitro*, o que representaria uma redução significativa nos custos do tratamento (Hench *et al.*,

2006). Visando à utilização dessa tecnologia, existem pesquisas para desenvolver novos materiais como implantes cirúrgicos e dispositivos médicos-odontológicos. Muito do trabalho de pesquisa realizado em diversos países é estimulado devido às limitações da utilização de enxerto autógeno. Com isso, vêm sendo pesquisados novos materiais sintéticos como uma alternativa de tratamento de lesões. Para o tratamento de lesões de tecido ósseo, há uma gama de materiais de diversos tipos: cerâmicos, poliméricos, metálicos e compósitos. São estudados com o objetivo de criar uma estrutura de suporte sintético para o crescimento tecidual (Hench, 1998).

Atualmente, espera-se que os implantes promovam pelo menos três importantes eventos no tecido vivo: a habilidade de se auto-reparar, a manutenção do suprimento sanguíneo e a alteração da sua estrutura em resposta a fatores ambientais. Como os implantes humanos possuem uma limitada expectativa de vida, espera-se que a combinação de técnicas de biologia e engenharia favoreça o uso de biomateriais como substituintes de tecido ósseo e promova um reparo tecidual (Hench & Polak, 2002). Vários materiais já foram desenvolvidos, mas alguns grupos ainda vêm sendo aperfeiçoados, tais como polímeros (polimetacrilato de metila, etc.), cerâmicas (hidroxiapatita) e vidros bioativos (Bioglass®).

Os biomateriais para aplicação na regeneração óssea na técnica de engenharia tecidual devem possuir algumas características tais como:

- Biocompatibilidade: o material é atóxico, não promove reação de inflamação aguda ou crônica, tem uma favorece a regeneração tecidual e, portanto, não promove rejeição do hospedeiro,
- Bioabsorção: o material possui degradabilidade que irá acompanhar a formação de um novo tecido,

- Porosidade: deve ter uma densidade de poros de 75 % com tamanhos médios de 200-400 μm de diâmetro e interconectados, possuindo uma grande área superficial, para favorecer a adesão protéica e aumentar a formação de colágeno,
- Osteocondução: ocorrem liberação e controle de proteína osteocondutiva, com liberação de agentes osteoindutivos, bioquimicamente inertes à proteína osteocondutiva, promovendo o crescimento ósseo, favorecido pela estrutura de poros,
- Quimiotaxia: atrai células mesenquimais e fornece meios de adesão celular, facilitando a proliferação e a diferenciação celulares,
- Angiogênese: promove vascularização, sendo hidrofílico, para absorver fluido sanguíneo e reforçar a coagulação inicial após a implantação,
- Baixo custo: não pode exceder o valor do autoenxerto, deve possuir materiais constituintes em abundância e de esterilização eficiente (Coelho *et al.*, 2002, Valério *et al.*, 2004).

Várias estratégias devem ser observadas para o desenvolvimento de matrizes sintéticas porosas. Primeiramente, os materiais que serão utilizados na técnica de engenharia tecidual devem, além de suportar a deposição e crescimento celular, possuir uma taxa de degradação controlada para suportar as duas fases de desenvolvimento tecidual, a *in vitro* e a *in vivo*, porém sem perder as propriedades mecânicas necessárias para substituir o tecido perdido. Outro fator que deve ser observado é a taxa de degradação do material, que deve acontecer de tal forma a prover espaço suficiente para o tecido se desenvolver, à medida que o material é reabsorvido. Este processo é fundamental na técnica de ET, na fase aplicação do biomaterial *in vivo* durante a regeneração do tecido (Ratner, 1993).

Outro grande problema enfrentado na engenharia tecidual é a possibilidade de rejeição do implante, quando colocado em contato com o tecido humano. Para aplicação desses materiais, são feitos testes preliminares de biocompatibilidade, para avaliar o seu potencial para aplicações clínicas (Anderson *et al.*, 2004). Quando em contato com o tecido, ocorre uma bioreabsorção do material e precipitação de proteínas na sua superfície. Os produtos de degradação liberados poderiam reagir com as células circunvizinhas, rearranjando estruturalmente a interface tecido-material. Nesse momento, inicia-se uma atividade celular que promove a deposição de fases mineral e orgânica, com integração da superfície do biomaterial ao tecido circundante ao implante. Com isso, há uma quimiotaxia de células para a superfície do biomaterial, as quais irão aderir, proliferar e se diferenciar, depositando a matriz extracelular que levará à formação do tecido perdido (Anderson *et al.*, 1996).

Essas etapas são as fases desejáveis para integração do implante ao organismo vivo; porém a presença do material pode desencadear processos indesejáveis para a interação do material com o tecido. O implante pode estimular uma resposta inflamatória aguda indesejável, levando a uma agressão no local da implantação. No processo inflamatório, a resposta do hospedeiro ao agressor promove a liberação de mediadores químicos que desencadearão a liberação de fatores iniciadores da inflamação, dentre eles a histamina que promove a vasodilatação. Com o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquido intravascular, vários mediadores químicos seriam liberados e eles ativariam células vizinhas e outros vasos sanguíneos, o que levaria a um recrutamento de células de defesa do sangue (macrófagos e neutrófilos) (Anderson, 1996). A inflamação aguda pode evoluir para um processo crônico, com a permanência do estímulo, promovendo a migração de novas células (como os linfócitos e plasmócitos) e a ativação e diferenciação de fibroblastos. Estas células iriam promover o início do processo de reparo (cicatrização) ou a remodelagem do tecido inflamado (Bayley, 1988). Os fibroblastos também podem formar um depósito de tecido conjuntivo denso e colagenoso ao redor do material, encapsulando e isolando o implante do tecido circunvizinho. Esse tipo de reação não permite a integração do tecido com o material, sendo uma resposta negativa à sua presença no organismo e à sua função de proliferação celular (Ratner, 1993).

Uma alternativa para reduzir as reações adversas após a implantação do material seria a combinação com células, que são elementos fundamentais durante o reparo e a regeneração. Utilizando uma linhagem celular apropriada, poder-se-ia prever as respostas celulares com técnicas de proliferação e diferenciação (Hench & Polak, 2002). Atualmente, a engenharia tecidual vem permitindo a utilização de células do próprio paciente, de doadores ou células-tronco adultas, cultivadas em arcabouços sintéticos de materiais compatíveis com o organismo. Essa metodologia tem grandes perspectivas na aplicação médica pelo benefício que traz ao paciente, uma vez que é necessário um pequeno número de células, estas serão expandidas na cultura *in vitro*. O biomaterial coberto pela camada celular poderia minimizar a rejeição desses implantes (Kellomaki & Tormala, 2004).

Assim, seriam adotadas maneiras de criar novos tecidos *in vitro*, utilizando células-tronco isoladas do próprio paciente. Porém, haveria limitações, como dificuldade das células de se manterem indiferenciadas em cultura. A cultura de tecidos inteiros *in vitro* (como a pele) possui as mesmas dificuldades e desvantagens de uma cultura de células mesenquimais (Bruder *et al.*, 1997).

Outra possibilidade seria a utilização de matrizes poliméricas contendo células; essas matrizes seriam incorporadas aos tecidos (Li *et al.*, 2005). Segundo estudos recentes do grupo de engenharia tecidual da *Imperial College* (Londres, UK), existe um controle genético de resposta celular a materiais bioativos, tais como o Bioglass®. Foi identificada a expressão de sete famílias de genes quando osteoblastos primários humanos foram expostos a produtos de dissolução do material, sendo que a expressão genética rápida (dentro de 48 h) e aumentada (cerca de 200 %). Entre esses genes estão os fatores de transcrição do ciclo celular, moléculas de transdução de sinais, fatores de crescimento e citocinas, receptores de superfície para identificação de antígenos, componentes da matriz extracelular e reguladores de apoptose (Hench, 2006)

No presente estudo, foram utilizadas células-tronco adultas de medula óssea, por possuírem uma alta capacidade de renovação e um grande potencial de diferenciação em tipos celulares com características morfológicas e funcionais específicas. Essas células são

fundamentais para a homeostase do organismo, assim como para substituir células mortas por injúria ou doença (Hench, 2000). A medula óssea é um tecido rico em capilares sinusóides, bem organizado, composto por diversos tipos celulares. As células podem ser encontradas na cavidade medular de ossos longos e em porções esponjosas de ossos vertebrais. Em experimentos anteriores (Ogawa *et al.*, 2004a e b), foi demonstrado que as células mesenquimais podem se diferenciar rapidamente em linhagens do tipo conjuntivo, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Por isso, a medula óssea é um compartimento que preserva células no estado indiferenciado.

Novos biomateriais são necessários para atender novos padrões de sucesso que estão diretamente relacionados com o envelhecimento da população e a sua necessidade de uma qualidade de vida melhor. Portanto, esses materiais deverão ser capazes de guiar processos de restauração da funcionalidade dos tecidos afetados, além de não conduzir processos inflamatórios e imunológicos, assim, viabilizariam a regeneração em termos morfológicos e a atividade tecidual. À medida que o tecido é formado, não haveria, então, a necessidade da presença do material, que pode ser removido ou degradado. Esta idéia de conduzir o processo de regeneração do tecido levou ao estabelecimento da engenharia tecidual, que por sua vez, força o estabelecimento de novas estratégias de criação de novos biomateriais (Hench, 2006).

Um arcabouço ideal deverá mimetizar a matriz extracelular do tecido a ser substituído, de tal forma que possa agir como um molde em três dimensões, onde as células aderem, migram, diferenciam e proliferam (Hutmacher, 2000). No próximo capítulo, serão detalhadas as características dos biomateriais e descritos os critérios de seu desenvolvimento para aplicação em engenharia de tecidos ósseos.

Capítulo 2

Revisão de Literatura

2.1 Engenharia Tecidual

A ET consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos através do recrutamento de tecidos do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivados sobre suportes biológicos ou sintéticos (também conhecidos como matrizes extracelulares sintéticas) para então serem reinseridos no paciente. A Figura 1 ilustra a sequência de etapas para engenharia tecidual. Na cultura *in vitro* as células são obtidas pela remoção de tecido do paciente, e são colocadas em contato com os biomateriais em um biorreator. Os parâmetros de cultura devem ser controlados por computador e um técnico responsável. Quando o material possuir uma quantidade suficiente de células aderidas e diferenciadas, o conjunto é implantado no paciente por um médico-cirurgião. Os materiais empregados na engenharia tecidual são denominados biomateriais e provêm uma superfície para proliferação celular, regenerando tecidos vivos perdidos (Roether *et al.*, 2002). Como a engenharia tecidual é uma ciência multidisciplinar, os trabalhos envolvem conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde, de engenharia e ciência dos materiais (Langer, 1993). A necessidade da interação entre células e matriz sintética se deve à limitada capacidade de reestruturação do tecido danificado. Este limite é intrínseco ao tipo de organização do tecido e sua necessidade de uma regeneração guiada. O transplante tecidual também não pode ser efetuado em grande quantidade, pois a proporção entre o tamanho do tecido e a quantidade de

vasos sanguíneos seria desequilibrada. O aporte sanguíneo em menor proporção pode limitar a difusão de nutrientes, gases e a eliminação de produtos tóxicos. Com isso, pode haver morte celular e necrose do tecido formado e uma provável rejeição do material implantado (Ratner *et al.*, 1995).

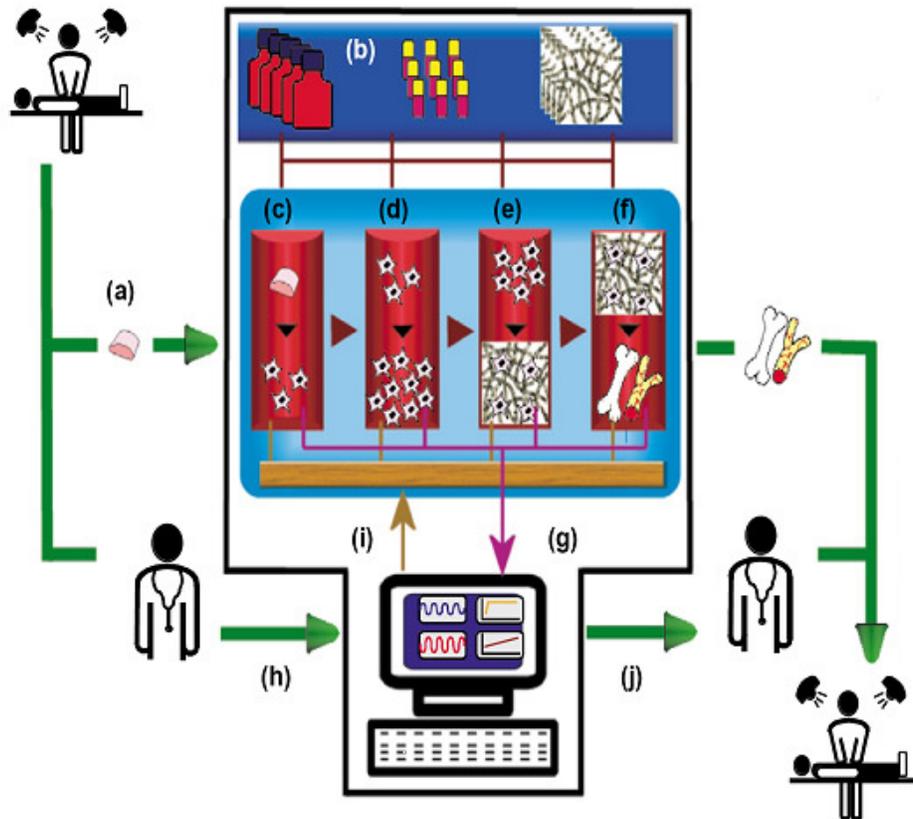
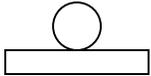


Figura 1: Técnica de engenharia tecidual. (a) Remoção de fragmento de tecido do paciente, (b) cultura celular *in vitro*, (c) dissociação do tecido em células para cultura, (d) expansão da cultura celular, (e) cultura de células com o biomaterial, (f) diferenciação celular com o biomaterial, (i e g) controle dos parâmetros de cultura celular do biorreator pelo computador, (h e j) técnico que avalia e ajusta os parâmetros de cultura celular no biorreator. (j) Implante do biomaterial depois da fase *in vitro* no paciente. (Hench, 2006).

2.1.1 Biocompatibilidade

É um conjunto de características que um biomaterial, para aplicação em regeneração tecidual, na técnica de engenharia de tecidos, deve possuir, como: ser atóxico, não promover reação de inflamação aguda ou crônica, não promover rejeição do hospedeiro, mas induzir a formação de uma interface entre o tecido e o material implantado, além de possuir um coeficiente de degradação suficiente para favorecer a formação de um novo tecido (Muschler *et al.*, 2004). A biocompatibilidade de materiais pode ser determinada em experimentos *in vitro* utilizando células de linhagens estabelecidas. A escolha da linhagem deve ser realizada de acordo com a aplicação do biomaterial estudado (ISO10993-5, 1999). De acordo com a Tabela 1, alguns aspectos da cultura celular podem ser observados para determinar a sua biocompatibilidade, porém este ensaio observa apenas fatores qualitativos, sendo também necessários alguns experimentos quantitativos para melhor determinar a toxicidade de um material.

Tabela 1: Reações celulares na presença de biomateriais adaptado de Anderson e colaboradores (1996).

| Comportamento celular | Grau de adesão célula-superfície do biomaterial | | |
|--|---|---|---|
| | Baixo | Médio | Elevado |
| Morfologia celular |  |  |  |
| Possível método de alteração da morfologia | Biomaterial com baixa concentração de fibronectina adsorvida | Biomaterial com mediana concentração de fibronectina adsorvida | Biomaterial com elevada concentração de fibronectina adsorvida |
| Efeitos na atividade e morte celular | Apoptose elevada, atividade celular baixa, baixa probabilidade de proliferação celular. | Apoptose mediana, atividade celular mediana, mediana probabilidade de proliferação celular. | Apoptose reduzida, atividade celular elevada, alta probabilidade de proliferação celular. |

2.1.2 Cicatrização

Quando o biomaterial entra em contato com o tecido, ocorre hidratação e a precipitação de proteínas na sua superfície. As proteínas aderidas podem reagir com as células circunvizinhas, rearranjando estruturalmente a interface tecido-implante. Nesse momento, inicia-se uma atividade celular que promove a integração da superfície do biomaterial com o tecido. Portanto, haverá uma quimiotaxia de células para a superfície do material, que na sequência irão aderir, proliferar e se diferenciar, formar uma matriz extracelular e constituir um novo tecido (Fig. 2). Essas etapas são as fases desejáveis para integração do implante ao organismo vivo; porém a própria presença do material pode desencadear processos indesejáveis a essa interação. O implante pode estimular uma resposta inflamatória, levando a uma agressão local, que pode culminar com a rejeição do implante (Anderson, *et al.*, 1996).

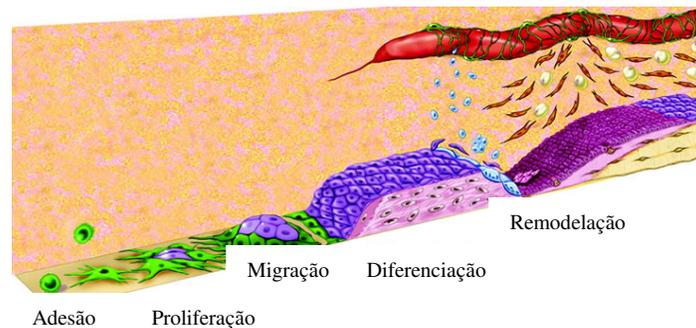


Figura 2: Desenho representativo de etapas de cicatrização observadas na superfície de um biomaterial (Muschler, *et al.*, 2004).

Diferentes graus de resposta inflamatória podem ser observados, dependendo da forma e tamanho em que se encontrem os implantes (pó ou particulado *versus* filme, por exemplo) ou seus produtos de degradação. Partículas pequenas acarretariam a fagocitose por macrófagos, havendo um reconhecimento pelas células inflamatórias, levando à produção de anticorpos específicos e maximizando a resposta inflamatória. A inflamação aguda pode evoluir para um processo crônico, com a permanência do estímulo, desencadeando a liberação de outros

mediadores químicos, tais como FGF (fator de crescimento de fibroblastos), EGF (fator de crescimento epidermal), interleucina-1 (IL-1) e interferon- γ (IF- γ). A inflamação crônica é caracterizada por um aumento no número de macrófagos, monócitos e linfócitos, com a proliferação de vasos sanguíneos e tecido conectivo, levando ao início do processo de reparo e remodelagem do tecido (Anderson *et al.*, 1996). Nessa última etapa, devido à liberação de fatores de crescimento, há uma ativação e proliferação celular de células variadas, inclusive fibroblastos, que participam da formação de um depósito de tecido conjuntivo denso e colagenoso ao redor do material, encapsulando e isolando o implante do tecido circunvizinho (Muschler, *et al.*, 2004). A reação, quando exacerbada, não permite a integração do tecido com o material, sendo uma resposta negativa a presença deste no organismo. Um fenômeno que pode ocorrer é o aumento acelerado da degradação do material, através do processo de biodegradação oxidativa que acontece de acordo com a resposta do organismo. A Figura 3 representa as possibilidades de interação do implante com o tecido circunvizinho após um processo inflamatório que ocorre logo após a cirurgia. De acordo com as características de cada material podem ocorrer diferentes integrações do implante com o tecido, caso ele seja não degradável, pode-se observar uma fixação biológica ou bioativa. Se o material for inerte pode ocorrer a formação de uma cápsula fibrosa ao seu redor e se for biodegradável o implante é absorvido a medida que o tecido se forma no lugar onde estava o implante. No caso de haver uma resposta de inflamação crônica do organismo o material promove uma reação de formação de granuloma e o implante é perdido (Fig. 3). Após a implantação do material no organismo vivo, este libera moléculas que promovem ou potencializam o processo oxidativo. Essas moléculas são liberadas por células de defesa do organismo, tais como macrófagos e neutrófilos (células fagocíticas), que reagem à injúria causada pela cirurgia e pelas propriedades do material. Estas células metabolizam oxigênio, gerando ânions superóxidos que intermediariam a formação de agentes oxidantes capazes de iniciar reações homolíticas nos polímeros. Outro tipo de resposta celular que pode ocorrer com a permanência crônica do implante é a formação de células gigantes (união de várias células fagocitárias). Tais células estimulariam a produção de fibras colágenas que formariam uma cápsula ao redor do material, isolando-o do restante do organismo e gerando um tecido inflamatório chamado granuloma (Ratner *et al.*, 1995).

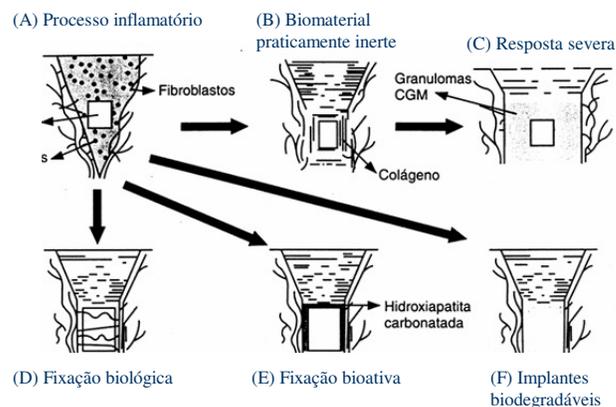


Figura 3: Representação de resposta tissular à presença de biomateriais (Anderson *et al.*, 1996).

2.2 Tecido Ósseo

2.2.1 Anatomia Óssea

O tecido ósseo tem como função a manutenção dos sistemas do corpo. Protege órgãos vitais e garantem suporte e apoio para adesão dos músculos na função motora, além de gerar células sanguíneas que imunoprotegem e oxigenam outros tecidos. O osso é a maior fonte de cálcio, fosfato e outros íons importantes. Esse tecido é constantemente renovado, tanto por células (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) quanto por fatores gerados por sinais mecânicos externos (Junqueira & Carneiro, 2004).

O esqueleto adulto é constituído de 80 % de osso cortical (compacto) e 20 % de osso trabecular (medular). Este possui resistência mecânica mais baixa que o cortical, por possuir constituição semelhante à de uma esponja, com 50 a 90 % de poros. O tecido ósseo maduro é constituído por um sistema harvesiano constituído de anéis circunferenciais, chamados de lamelas, organizados de forma concêntrica. Cada lamela está povoada por osteócitos interligados por canais transversais. A dependência vascular óssea é feita por um conjunto de sistemas de canais linfo-vasculares que penetram na estrutura do tecido e mantém a difusão de sinalizadores

solúveis como hormônios ou fatores de crescimento que promovem respostas funcionais e fisiológicas (Murugan & Ramakrishna, 2006).

Das células presentes no tecido ósseo, os osteoblastos são células secretoras e metabolicamente ativas que expressam fatores de sinalização (BMP, TGF- β , etc). O principal produto de secreção desta célula é o colágeno tipo I. Outro tipo celular que regula o crescimento e a remodelação óssea são os osteoclastos. Estes são células multinucleadas e derivadas de macrófagos. Estas células aderem ao osso através de proteínas (adesinas); neste local haverá um microambiente que possibilita a secreção de enzimas que solubilizam a matriz inorgânica (baixo pH), expondo-a as enzimas proteolíticas, formando cavidades reabsorvidas no tecido (Junqueira & Carneiro, 2005).

Do peso seco do osso, 30 a 40 % são de matriz orgânica, que tem como constituinte principal o colágeno tipo I (90 %). Nos outros 10 % podem-se encontrar proteoglicanos (ou glicosaminoglicanos) que modulam a adesão celular e regulam a calcificação da matriz orgânica. A matriz inorgânica constitui 60 a 70 % do peso ósseo seco e é formada por cristais de carbonatos e formações amorfas de fosfato de cálcio (respondem por 99 % de Ca e 85 % de P do corpo humano) (Junqueira & Carneiro, 2004).

2.2.2 Matriz Óssea

O tecido ósseo é um compósito natural que consiste primordialmente de matriz orgânica colagenosa e uma fase mineral composta de hidroxiapatita (HA). A dureza do osso pode ser atribuída à deposição de substâncias minerais complexas compreendendo Ca^{+2} , PO_4^{-2} , Na^+ , Mg^{+2} , F, dentre outros íons. Já a matriz orgânica é a responsável pela rigidez e viscoelasticidade do tecido ósseo. O tecido é classificado como estruturado, devido principalmente à sua porosidade, à composição polímero-cerâmico, à sua estrutura de lamelas e devido à organização da matriz fibrosa. As propriedades mecânicas dependem diretamente da combinação das características do tecido, de sua organização e função (Junqueira & Carneiro, 2004).

2.3 Matrizes Extracelulares (MECs)

2.3.1 MECs Sintéticas

Matrizes extracelulares sintéticas são suportes biológicos ou sintéticos que possuem uma estrutura em 3D de tamanho e quantidades de poros determinadas para favorecer o crescimento de células ou tecido no seu interior. O material deve ter uma densidade de poros aproximadamente de 75-90 %, com tamanhos médios entre 200-400 μm de diâmetro e interconectados (Fig. 4). Deve possuir uma grande área superficial para favorecer a deposição de proteínas e a formação de colágeno. Esta camada protéica sobre o biomaterial favorecerá a adesão, migração, proliferação e diferenciação das células. A deposição de proteínas no implante poderá definir o tipo de célula que será aderida na sua superfície, determinando a formação de tecidos na região danificada do órgão. Variações no desenho da matriz, na sua arquitetura tridimensional e na estrutura química do material poderão determinar a taxa de degradação do biomaterial a ser utilizado em engenharia tecidual (Muschler, *et al.*, 2004).

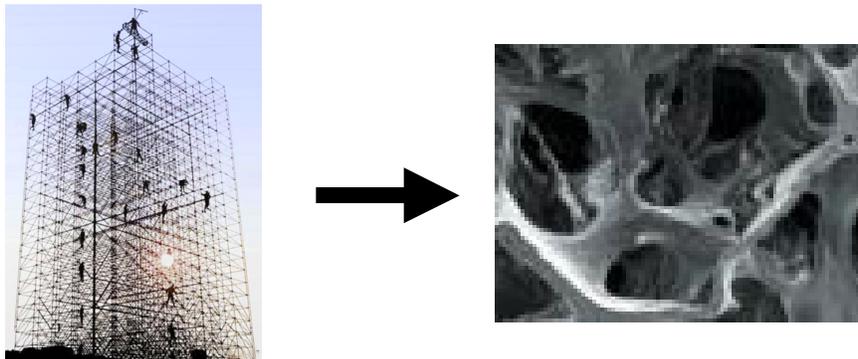


Figura 4: À esquerda, imagem de sistema de *scaffold* utilizado na Engenharia Civil para construção de paredes em edifícios. À direita, imagem de sistema de poros de matriz extracelular sintética (Microscopia eletrônica de varredura - MEV).

2.3.2 Materiais para MECs

As considerações para o desenho da matriz extracelular são complexas e incluem desde a composição do material, arquitetura, estrutura mecânica, propriedades de superfície, até a taxa de degradação e os subprodutos de degradação (Hutmacher, 2000). A utilização de materiais

sintéticos parece adequada como alternativa no caso do implante para substituir o tecido ósseo. Esses materiais podem ser aplicados na área médica-odontológica, promovendo uma intervenção específica e com resultados mais satisfatórios (Xynos *et al.*, 2000). Materiais de indução de regeneração óssea têm sido amplamente estudados, com o objetivo de formar um suporte para o crescimento e diferenciação deste tecido.

Inúmeros tipos de materiais para aplicação em engenharia tecidual têm sido pesquisados, dentre eles estão os polímeros (polivinil, polimetilmetacrilato, etc.), os cerâmicos (hidroxiapatita, α e β -TCP) e vidros bioativos (Bioglass[®]). Atualmente, espera-se que os biomateriais promovam a regeneração do tecido perdido, recriem um suprimento sangüíneo e sofram deformações mecânicas em resposta a fatores ambientais, sem prejudicar a adesão e proliferação celular. Como os implantes humanos possuem uma limitada expectativa de vida, espera-se que, a combinação de técnicas de cultura celular e o desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis promovam integração tecidual e possibilitem a permanência do implante por um período de tempo suficiente para permitir a regeneração de tecidos e órgãos (Hench & Polak, 2002).

Um dos maiores desafios no desenho do suporte sintético para engenharia tecidual é a taxa de degradação do material em relação à taxa de crescimento do tecido. Dependendo da aplicação da matriz extracelular, o polímero pode ser solicitado mecanicamente por dias, semanas ou meses. Os materiais que serão utilizados para reconstrução óssea ilustram esta aplicação. Uma perda prematura do biomaterial pode interferir no processo de reparo e cicatrização. Este novo paradigma requer da matriz extracelular um balanço temporário de resistência mecânica com a formação tecidual. Este equilíbrio está ligado a uma arquitetura de poros precisa do suporte sintético (Hollister, 2005). A aplicação futura das matrizes sintéticas para engenharia tecidual tem como objetivo revolucionar o processo de envelhecimento, trauma e doença relacionado à perda funcional de tecidos, possibilitando o seu tratamento (Hutmacher, 2000).

2.4 Polímeros Biodegradáveis

A primeira etapa na engenharia tecidual é o desenvolvimento, seleção e processamento dos suportes. O uso de polímeros bioreabsorvíveis como suporte para a cultura de células vem tendo destaque nesta técnica (Kellomäki *et al.*, 2004). As palavras *biodegradação*, *bioerosão*, *bioabsorção* e *biorreabsorção* têm definições distintas. Frequentemente usados na técnica *in vitro*, devido à falta de padronização para os termos, foi utilizado neste trabalho a definição fornecida por Michel Vert, químico e diretor do Centro de Pesquisas em Biopolímeros Artificiais, da Universidade de Montpellier I, França, um dos pioneiros e líderes mundiais no estudo de materiais poliméricos biorreabsorvíveis.

Segundo Vert *et al.* (1992) *biodegradável* é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos, que devido à degradação macromolecular, sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos, de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo.

- *Bioerodíveis* são materiais e dispositivos poliméricos que apresentam perda de massa durante o processo de degradação, sendo os produtos e subprodutos reabsorvidos pelo organismo.

- *Biorreabsorvíveis* são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que apresentam degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, ou seja, materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo.

- *Biorreabsorção* é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. O uso da palavra “biorreabsorção” é adequado quando a eliminação é total.

- *Bioabsorvível* são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular (Vert *et al.*, 1992).

Este é o caso, por exemplo, da lenta dissolução de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas. Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis e biorreabsorvíveis encontram-se os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, da qual fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e seus copolímeros. Outros materiais, como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) também são descritos como materiais biodegradáveis e biorreabsorvíveis. Originalmente usados como fios de sutura (Vicryl®, Maxon®, etc.), atualmente os poli(α -hidróxi ácidos) podem ser encontrados em diversos produtos comerciais de fixação óssea, também aprovados pelo FDA (Biofix®, Neofix®, etc.) (Sung *et al.*, 2004).

O processo de biodegradação e biorreabsorção dos poli(α -hidróxi ácidos) é descrito na literatura como uma sucessão de eventos. Exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média (mW) e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão (Li *et al.*, 1999).

O mecanismo da degradação e erosão *in vitro* dos polímeros biorreabsorvíveis tem sido avaliado desde a década de 1980 e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. A degradação/erosão é classificada em dois grupos, denominados de bioerosão superficial e bioerosão interna (Tamada *et al.*, 1993) (Figura 5). Na busca por um modelo teórico para a degradação/erosão *in vitro*, o grupo de pesquisa em polímeros biorreabsorvíveis da Universidade de Regensburg, Alemanha, liderado pelo Prof. Achim Göpferich, descreve que o processo depende fundamentalmente da capacidade de difusão da água no material, da concentração de ligações ésteres hidrolisáveis, da velocidade de hidrólise e também da geometria e morfologia do material (Burkersroda *et al.*, 2002).

A hidrólise das ligações ésteres produz terminais ácidos que podem, ou não, serem difundidos para o meio de degradação. Inicialmente, o processo de degradação é considerado homogêneo, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Se a difusão e solubilização desses produtos forem efetivas, o material sofrerá, preferencialmente, uma erosão superficial. Se a taxa de difusão dos produtos e subprodutos ácidos presentes na matriz é baixa, há um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentem uma degradação mais acentuada no centro (Tamada *et al.*, 1993, e Burkersroda *et al.*, 2002). É o chamado efeito autocatalítico (Li *et al.*, 1999). A Figura 5 ilustra o mecanismo de degradação/erosão dos polímeros biorreabsorvíveis.

A biorreabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação geram produtos e subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo de Krebs. Após a hidrólise do material, a degradação segue o processo de oxidação de ácido láctico (para o PLA) e conversão das unidades de PGA em glicina, que por sua vez são convertidas em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A, ocorre à liberação de CO₂ e, conseqüentemente, a decomposição em citrato. O citrato é então incorporado no Ciclo de Krebs, resultando em CO₂ e H₂O, e sua eliminação pode ser feita através da urina e da respiração. Dessa forma, o material é reabsorvido e metabolizado (Ali *et al.*, 1993).

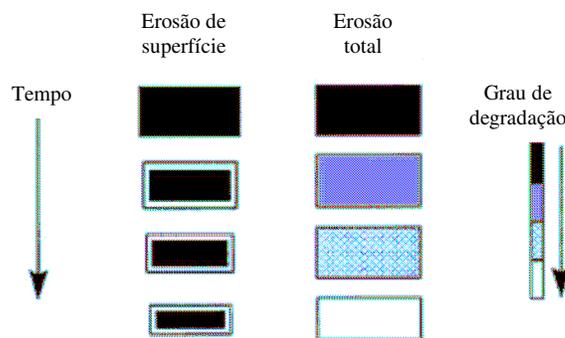


Figura 5: Degradação/erosão de polímeros biorreabsorvíveis. A redução do preto para cinza até o branco demonstra a quebra das cadeias poliméricas e a perda de material pela degradação (Burkersroda *et al.*, 2002).

Em estudos *in vivo*, os processos de biodegradação e biorreabsorção são um mecanismo complexo de eventos celulares e bioquímicos. Com o implante do material sintético, o organismo promove uma típica resposta a uma reação inflamatória de corpo estranho. A influência na degradação pela presença de peróxidos, enzimas e células fagocitárias representa ainda hoje um importante enfoque nas pesquisas dos polímeros biorreabsorvíveis (Chu, 1999 e Sung *et al.*, 2004).

A degradação *in vitro* do material mostra-se como uma boa alternativa quando comparada aos estudos *in vivo*, fundamentais e necessários na avaliação de polímeros biorreabsorvíveis como suporte na engenharia tecidual. Os custos são menores, o processo pode ser acelerado e as condições do ensaio, como temperatura, pH, produtos e subprodutos de degradação, podem ser quantificadas e monitoradas (Luciano *et al.*, 2003; Laine *et al.*, 2004).

2.4.1 Policaprolactona

O termo lactona refere-se a ésteres cíclicos formados a partir de ácidos carboxílicos. Este polímero é por definição um produto de condensação de um grupo hidroxílico e um carboxílico dentro da mesma molécula. A primeira síntese descrita foi realizada por Natta (1958), em que observou a auto-esterificação do ácido ϵ -hidroxicapróico quando sujeito a uma faixa de temperatura de 150 a 200 °C, originando a ϵ -caprolactona. Esta molécula é polimerizada pela abertura do anel adicionando carbonato de potássio a 150 °C por 5 h, sintetizando a primeira policaprolactona (Fig. 6). Esta consiste em um poliéster alifático linear semicristalino e é reconhecida como um polímero bioabsorvível (Huang *et al.*, 2006). Esta degradação ocorre em três etapas sucessivas. Na primeira fase, o material sofre um processo de degradação não enzimática que resulta na susceptibilidade da ligação éster à hidrólise (Kweon, 2003). Na segunda etapa, formam-se oligômeros de cadeia curta no material, diminuindo a massa molar. Na última fase, o PCL de baixo peso molecular é fagocitado por macrófagos e rapidamente degradado em ϵ -hidroxicapróico que é metabolizado, entrando no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e eliminado pela excreção renal (Kweong, 2003).

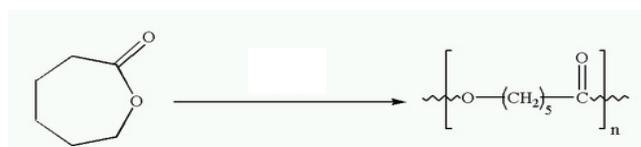


Figura 6: Reação de polimerização da policaprolactona.

Após extensos estudos realizados com a policaprolactona incluindo testes de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso deste material para fins médicos e farmacêuticos (Khor, 2002). Podemos dizer que a policaprolactona é reconhecida por sua biocompatibilidade com tecidos moles e duros, por ser promissora como material de liberação controlada de fármacos e matrizes de suporte de crescimento tecidual, que pode ser uma aplicação na área de engenharia tecidual (Serrano, 2004; Kim, 2004; Willians, 2005).

2.4.2 Ácido Sebácico

O ácido sebácico (AS) é um ácido dicarboxílico de estrutura química $(\text{HOOC})(\text{CH}_2)_8(\text{COOH})$ (Fig. 7) (Sliviniak & Domb, 2002; Gryglewics, 2003; Modi *et al.*, 2006). O AS é um pó branco cristalino, solúvel em etanol, éter e semi-solúvel em água. O seu nome vem do Latim *sebaceus* ou *sebum*, em referência ao seu uso na fabricação de velas. Também é um dos constituintes de um óleo vegetal chamado óleo de rícino. Este é mundialmente conhecido como *castor oil*, é um óleo natural, obtido de sementes da planta do rícino. Quimicamente, o óleo de rícino consiste em um triglicerídeo (derivado da molécula do glicerol) de ácidos graxos, cuja composição é variável. No entanto, cerca de 90 % do conteúdo deste óleo é de ácido ricinoléico. Apesar da planta de onde se extrai o óleo de rícino encontrar-se espalhada pelo mundo, a sua principal exploração situa-se no Brasil e na Índia. Porém, a China detém a maior produção de óleo e exporta cerca de 200.000 toneladas cúbicas, representando 90 % de toda a produção mundial (Fig. 8).

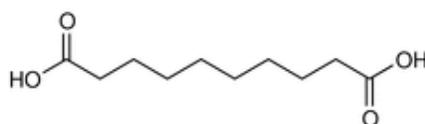


Figura 7: Estrutura química expandida de ácido sebácico.

A figura 8 apresenta imagens da planta de rícino (*Ricinus communis*) e a semente de onde é extraído o óleo.



Figura 8: Fotografia de planta (*Ricinus communis*) e semente de rícino (<http://www.flickr.com/photos>).

2.5 Célula-tronco Mesenquimal de Medula Óssea

As células são os elementos fundamentais durante o reparo e a regeneração. Assim, o sucesso da engenharia tecidual depende da utilização das células apropriadas, da capacidade de prever a resposta celular e das técnicas de cultura para proliferação e diferenciação em tipos celulares específicos. Atualmente, as aplicações da engenharia tecidual vêm permitindo entre outras, a utilização de células do próprio paciente (Parenteau, 2002). Essa técnica vem sendo utilizada ultimamente com a agregação de células-tronco adultas diferenciadas ou progenitoras para o tecido que se deseja regenerar. A fonte celular pode ser obtida do próprio indivíduo, por meio das diversas áreas doadoras de células-tronco adultas.

As células-tronco mesenquimais (MSC) da medula óssea têm a capacidade de se renovar e se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular. Essas células foram descritas primeiramente por Friedenstein e colaboradores (1974), os quais descobriram que as MSCs aderem a placas de cultura, assemelham-se a fibroblastos *in vitro*, e formam colônias. Recentemente, as MSCs têm

atraído a atenção de vários pesquisadores, pois são de grande interesse no tratamento de diversas doenças humanas.

Muitos estudos têm isolado as MSCs e têm controlado, em cultura, a sua diferenciação em tecido cartilaginoso e osso, por meio da utilização de fatores de crescimento específicos, com o objetivo de usar esta nova tecnologia no reparo de tecidos de origem mesenquimal lesados (Friedenstein *et al.*, 1974 a e b).

2.6 Materiais Injetáveis

A engenharia tecidual procura criar partes biológicas do corpo humano como uma alternativa ao transplante de tecidos e órgãos (Hench, 1998). Para esta aplicação, materiais para suportes sintéticos são um fator crítico de regulação da adesão, diferenciação e proliferação celular (Hench & Polak, 2002). Uma alternativa para maior conforto e menor risco para o paciente seriam materiais injetáveis para utilização como matrizes extracelulares sintéticas.

A área de materiais injetáveis tem sido muito pesquisada recentemente e possui como objetivos a utilização de materiais tanto para liberação controlada de fármacos, quanto na engenharia tecidual. Sistemas de liberação controlada de fármacos podem ser usados tanto por via parenteral, quanto por meio de injeção local em uma área afetada. Para o paciente, o uso de sistemas injetáveis de liberação pode oferecer vantagens como a não utilização de procedimentos cirúrgicos e a redução de complicações pós-cirúrgicas após o implante do material. Outra vantagem é que na liberação de fármacos por longos períodos, não há a necessidade de repetidas consultas médicas de manutenção. Materiais usados na constituição de dispositivos de liberação controlada também podem ser utilizados como matrizes injetáveis (Kretlow *et al.*, 2007). Elas têm a característica de preencher cavidades de qualquer geometria (irregulares). Outro fator favorável ao uso desses materiais é a fácil incorporação de agentes ativos solúveis (proteínas ou peptídeos) durante a mistura dos polímeros, antes da injeção do material. Com isso, podem ser solucionados problemas como adesão celular e liberação de fatores moleculares de bioativos do material polimérico (Paynea *et al.*, 2002).

Uma análise de sistemas injetáveis tanto para liberação controlada de fármacos quanto para engenharia tecidual é preocupante, devido a uma revisão de características necessárias de suportes sintéticos para a técnica de cultivo *in vitro*. Existem propriedades que o material deve preencher no que concerne à sua utilização em cultura celular; a característica mais importante é a biocompatibilidade. Esta não é aplicada ao material por si só, mas aos possíveis produtos de degradação dos componentes no caso de materiais biodegradáveis (Uludag *et al.*, 1994).

Outro parâmetro que deve ser considerado no design de matrizes sintéticas é a porosidade. O espaço interno da matriz extracelular sintética é necessário para permitir o crescimento tecidual e a difusão de nutrientes, bem como produtos metabólicos de células. Além disso, a porosidade total e o tamanho de poros e sua interconectividade são variáveis importantes do biomaterial (Zielinski *et al.*, 1997). Idealmente, o suporte sintético deve ser bioativo, bem como promover e guiar a proliferação e diferenciação celular e, portanto, o crescimento tecidual. Isto pode ser conseguido com a adição de fatores de crescimento e funcionalização do material com proteínas ou com a adesão específica de sequência de peptídeos que mimetizam a matriz extracelular e podem promover uma sinalização celular apropriada, um exemplo prático são as proteínas morfogenéticas (BMP). Dois fatores adicionais também devem ser adaptados para uma aplicação tecidual específica. São eles a resistência mecânica e a biodegradação da matriz sintética. Para a utilização do biomaterial como substituto de um tecido perdido ou danificado, o suporte deve possuir uma resistência mecânica adequada para suportar o crescimento celular durante os estágios primordiais de proliferação tecidual. O material deve, ainda, degradar-se em uma taxa que idealmente deve ser a mesma de formação do tecido. A rápida bioabsorção do material pode levar a uma alta liberação de agentes bioativos e à formação e deposição de matriz extracelular, o que é desejável em alguns casos. Porém, outras aplicações requerem uma taxa de degradação mais lenta que pode manter uma estrutura com propriedades mecânicas ideais por um período mais longo de tempo (Paynea *et al.*, 2002).

2.7 Metodologias Empregadas na Caracterização e Análise de Desempenho de Biomateriais

Várias técnicas de caracterização de materiais podem ser utilizadas para avaliar as suas propriedades e o seu desempenho em ensaios que simulariam a resposta do organismo. As

características químicas podem ser analisadas por espectroscopia de infravermelho, o tamanho e a distribuição das cadeias poliméricas podem ser verificados por GPC, as características térmicas dos materiais podem ser obtidas por TGA, DSC, DMA ou DMTA, a morfologia de superfície das amostras pode ser caracterizada por microscopia ótica ou MEV, ensaios de degradação para simular a perda do material no organismo *in vitro* podem ser realizados por hidrólise (devagar) ou enzimático (rápido). A viabilidade da cultura de células na presença do biomaterial pode ser analisada por métodos diretos e indiretos, pelo metabolismo de MTT ou azul de Alamar nas mitocôndrias das células. A apoptose celular pode ser avaliado por citometria de fluxo ou ensaio tipo túnel. Para avaliar a integração de materiais com o organismo vivo podem ser realizados ensaios *in vivo* com camundongos, ratos, coelhos ou cães, onde as amostras podem ser implantadas no tecido a ser reparado. Dentre os inúmeros ensaios de caracterização e análise de biomateriais alguns foram realizados neste trabalho e estão resumidos a seguir.

2.7.1 Análise por Microscopia

Microscopia Ótica Diferencial

O fenômeno mais comum da morfologia de polímeros semicristalinos é a formação de uma estrutura esferulítica. Os esferulitos são arranjos esféricos, birrefringentes, de cristais interligados com regiões amorfas, e que apresentam a forma de uma cruz de Malta quando observados em microscópios óticos com luz transmitida e polarizada. A morfologia de um esferulito é função de parâmetros químicos, como estrutura e massa molecular, e propriedades físicas como: condições de cristalização, parâmetro de rede cristalina, dentre outras (Raimo, 2007). A análise por microscopia ótica permite a observação das diferenças entre os processos de nucleação da blenda (Canevarolo, 2004).

Na imagem gerada pelo microscópio ótico pode ser observada a formação dos esferulitos que seria o arranjo de cristalitos dispostos ordenadamente em relação a um núcleo. Entre os cristalitos existe a região amorfa, formando assim uma fase contínua das cadeias poliméricas. O crescimento destes esferulitos é tridimensional, e forma uma esfera perfeita, porém, se uma esfera entra em contato com outra, forma-se uma interface plana entre elas (aparece como uma linha achatada ao microscópio). Os agentes nucleantes que formam as estruturas esferóides podem ser

partículas sólidas, impurezas, iniciadores, agentes nucleantes, ou até mesmo regiões organizadas da macromolécula, neste caso a formação dos esferulitos pode ser heterogênea. As propriedades do material são diretamente influenciadas pelo tamanho dos cristais e a sua distribuição, além do grau de cristalinidade do polímero. As propriedades afetadas são o módulo de elasticidade, a temperatura de transição vítrea (Tg), a solubilidade, as propriedades óticas e o tempo de relaxação (Manrich, 2005).

Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) forma uma imagem tridimensional de alta resolução das células, tecidos e materiais através de tubo de raios catodos que move um feixe de elétrons sobre a amostra. Os elétrons espalhados e secundários são detectados por sensores e formam a imagem. A técnica é usada principalmente para estudo topográfico de materiais sólidos. Podem ser observadas aglomerações de partículas, vazias e diferenças de fase do material. Em materiais não condutores de elétrons, as amostras são cobertas com uma fina camada de ouro ou carbono para serem analisadas ao microscópio (Barrias *et al.*, 2005).

Microscopia Confocal

A microscopia confocal oferece várias vantagens sobre a microscopia ótica comum, incluindo a possibilidade de se obter imagens em profundidade na amostra, sendo também possível coletar seções óticas em amostras finas. Na ciência biomédica, a maior aplicação da microscopia confocal envolve a imagem de células e tecidos tanto fixados em formol quanto vivos. Uma enorme gama de fluorocromos pode ser utilizada de acordo com as estruturas a serem visualizadas. Para delinear o citoplasma pode ser utilizado o fluorocromo Alexa Flúor 488 que possui alta afinidade com a F-actina e emite uma fluorescência verde. Para marcar o núcleo das células pode ser usado o iodeto de propídeo, que possui alta afinidade com o DNA e emite fluorescência vermelha. Para a marcação e observação a cultura de células deve estar fixada em formaldeído (4 %) permitindo a passagem dos marcadores pela membrana plasmática celular.

2.7.2 Análise Térmica

A análise termogravimétrica (TGA) é usada para determinar variações de massa de uma amostra como resultado da transformação química, em função da temperatura. A partir desta técnica são obtidas informações sobre a estabilidade térmica, decomposição da amostra, pureza, etc. (Sibilia, 1998)

A análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) fornece informações quantitativas a respeito de mudanças físicas ou químicas da amostra, que são acompanhadas por ganho ou perda de calor em função da temperatura. Algumas aplicações podem ser citadas como a caracterização de polímeros, de materiais orgânicos ou inorgânicos e materiais amorfos. Também podem ser avaliadas as temperaturas de transição de fase, como a temperatura de transição vítrea, fusão, cristalização, decomposição, crescimento dos cristais, dentre outros (Sibilia, 1998).

A análise dinâmico-mecânica (DMA) fornece informações sobre as mudanças nas propriedades viscoelásticas de materiais em função da temperatura, com uma frequência oscilatória constante. A técnica detecta as mudanças no estado de movimento molecular em função da temperatura e frequência. É uma técnica mais sensível para o estudo de morfologia de fases e das propriedades físicas de um material. O método detecta relaxações moleculares com sensibilidade 1000 superior às técnicas de DSC.

Quando uma tensão senoidal é aplicada a um sólido perfeitamente elástico, a deformação ocorre exatamente em fase com a tensão. O componente de armazenamento do módulo dinâmico de Young (E') reflete a energia mecânica que é armazenada pela amostra de forma elástica. O componente de perda (E'') reflete a energia mecânica que é convertida em calor através dos diferentes processos de relaxação que a amostra pode sofrer. O fator de perda $\tan \delta$ é a razão entre a energia perdida (dissipada como calor por ciclo) e a armazenada (E''/E') (Wetton, 1986).

2.6.3 Ensaios de Resistência Mecânica à Tração

Os ensaios de resistência mecânica são considerados de grande importância na caracterização de materiais para aplicação em engenharia tecidual. O comportamento do material ao longo do ensaio passa normalmente pelas etapas representadas na Figura 9.

Quando a tensão é interrompida na região linear da curva (antes do ponto P), o polímero volta à sua conformação inicial, sendo a deformação chamada de elástica (Fig. 9). Neste caso, a tensão e a deformação são linearmente proporcionais e seguem a Lei de Hook (Equação 1):

$$\sigma = E.\varepsilon \quad (1)$$

onde: σ é a tensão, E é a constante de proporcionalidade e ε é a deformação.

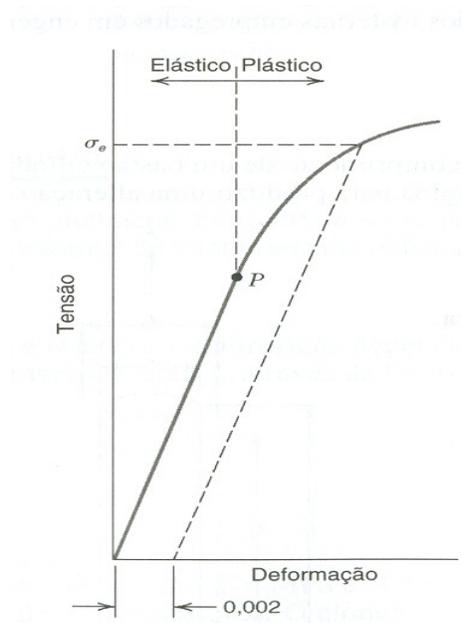


Figura 9 – Curva de tensão por deformação de material ensaiado por tração (Manrich, 2005).

A fase elástica é seguida pela fase plástica, na qual as deformações sofridas pelos materiais são permanentes. Aumentando a tração, chega-se à ruptura do material. Em geral, materiais frágeis apresentam ruptura antes mesmo de se deformarem plasticamente, sofrendo praticamente apenas deformação elástica (Manrich, 2005).

2.6.4 Avaliações de Citotoxicidade e Bioatividade

Teste de Viabilidade Celular pela Metabolização do MTT (3- (4,5 – dimetiazol -2-yl) brometo-2,5-difeniltetrazol)

A análise de citotoxicidade do material produzido foi realizada por meio de teste *in vitro*, cuja Norma Técnica reguladora é a ISO (*International Organization of Standardization*) 10993-5: *Tests for Cytotoxicity – In Vitro Methods*. Dentre as possibilidades de testes, de acordo com esta Norma, foi selecionado o teste de viabilidade celular pela metabolização do MTT, cuja estrutura é mostrada na Figura 10. Este ensaio, definido na literatura como apropriado para estimativa de citotoxicidade (Hansen *et al.*, 1989; Schweikl & Schmalz, 1996), baseia-se na capacidade que a enzima succinato desidrogenase (presente nas mitocôndrias de células viáveis) tem de converter o sal de tetrazolium (dimetiliazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazana, que são de cor azul escura. Esta capacidade que somente células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (Sletten & Dahl, 2003; Costa *et al.*, 2003).

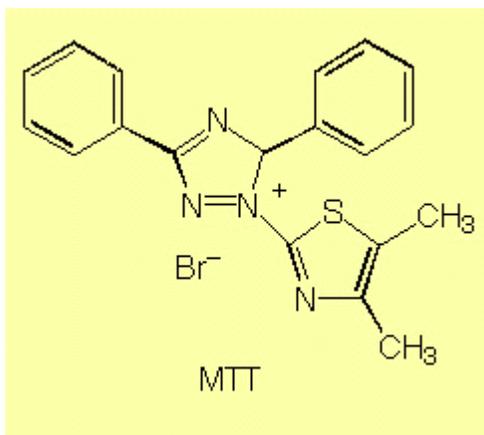


Figura 10: Fórmula química do (3- (4,5 – dimetiazol -2-yl) brometo-2,5-difeniltetrazol) – MTT.

Ensaio de Citotoxicidade Utilizando o Azul de Alamar (Resazurina)

O azul de Alamar é um método homogêneo e fluorimétrico que tem como objetivo estimar a viabilidade das células na cultura *in vitro*. Neste método utiliza-se a resazurina para marcar a capacidade metabólica das células. Semelhante ao ensaio utilizando o MTT, as células

viáveis reduzem a resazurina (azul) em resorufina (rosa) que possui uma alta fluorescência ($579_{EX}/584_{EM}$) (Fig. 11). As células mortas não reduzem o marcador e, portanto não emitem fluorescência (Goeckner *et al.*, 2001).

O ensaio normalmente é utilizado em culturas de longo período de crescimento celular uma vez que o sobrenadante é removido para medida de viabilidade e a monocamada celular pode ser mantida, portanto, a análise do crescimento das células pode ser contínua.

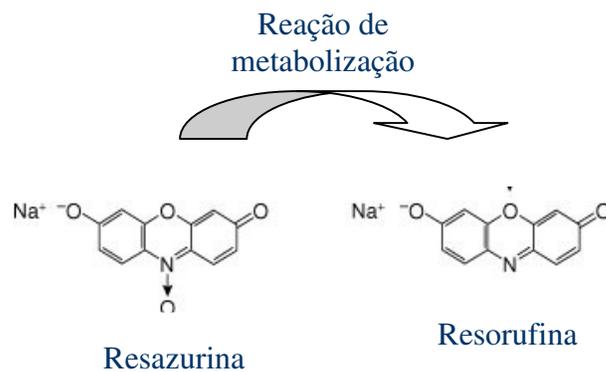


Figura 11: Reação de metabolização do azul de Alamar (resazurina) no interior das mitocôndrias das células viáveis.

Atividade de Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é em geral utilizada para descrever fosfomonoesterases não-específicas, que hidrolisam fosfatos de ésteres em pH alcalino. Esta enzima está presente em todos os tecidos, e em altas concentrações em alguns órgãos, como o osso e o fígado. Existem vários tipos de fosfatases alcalinas, chamadas isozimas, estas possuem poucas diferenças e estão localizadas em diferentes tecidos. A ALP é uma enzima presente no arcabouço citoplasmático que atua como um agente nucleador no primeiro estágio de mineralização do tecido ósseo. A expressão desta enzima está associada à presença de células ósseas e a maturação da matriz extracelular, antes da deposição de minerais em sua estrutura. A ALP é um marcador celular mais utilizado bioquimicamente para osteoblastos, é uma enzima padrão e a sua presença está ligada a calcificação da matriz. A quantificação de ALP é feita por um ensaio colorimétrico onde a enzima, quando presente, hidrolisa o substrato (fosfato de p-nitrofenil) em p-nitrofenol e fosfato

inorgânico. Quando o pH da solução está alcalino, o produto é convertido em um complexo amarelo que pode ser lido em espectrofotômetro na faixa de 400-420 nm. A intensidade da cor é proporcional à atividade da fosfatase (Ashton *et al.*, 1985).

Simultaneamente ao ensaio do ALP, pode ser realizada a medida da concentração total de proteínas, empregando o ácido bicinconínico (BCA) que permite a detecção colorimétrica através de cátions de cobre (Cu^+). Este ensaio é compatível ao detergente utilizado para remover e homogeneizar as células (Triton X-100). O produto da reação do teste com o cobre produz um sobrenadante de coloração arroxeada pela redução deste íon (Cu) por duas proteínas. O complexo formado é solúvel em água e sua detecção é feita no comprimento de onda de 520 nm. O método de detecção por BCA não é específico e, portanto, estão presentes estruturas macromoleculares protéicas complexas, e também quatro aminoácidos em particular (cistina, cisteína, triptofano e tirosina) (Smith *et al.* 1985).

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do presente trabalho foi desenvolver arcabouços compostos de policaprolactona e ácido sebácico em conjunto, para utilização em engenharia tecidual. Neste projeto, foi analisada a influência da porcentagem relativa dos polímeros (95:05, 90:10, 80:20, 70:30 e 50:50 % massa/massa) e realizado um estudo de degradação *in vitro*. Também foi feita a avaliação do material frente a culturas de células com ou sem diferenciação óssea, observando a biocompatibilidade dos arcabouços sintéticos porosos. Para comparar os estudos *in vitro*, foram realizados experimentos *in vivo* (ratos Wistar) subcutâneos e intra-ósseos. Um caráter inédito do projeto foi o processamento da blenda como polímero injetável para aplicação no preenchimento de cavidades irregulares. Após a realização da sua caracterização, o material foi patentado no Brasil (PI 018080059526).

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a influência das diferentes proporções de PCL e AS (95:05, 90:10, 80:20, 70:30 e 50:50 %m/m).

- Verificar a morfologia da superfície dos arcabouços confeccionados (microscopia ótica e eletrônica de varredura).
- Avaliar as características térmicas dos materiais por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TGA). Também analisar as propriedades dinâmico-mecânicas (DMA) e de resistência mecânica por tração dos arcabouços.
- Estudar a degradação dos arcabouços das blendas *in vitro* com solução salina à base de fosfato (PBS) (30, 60, 90 e 120 dias).
- Verificar o efeito da utilização de agente porogênico (citrato de sódio) na matriz sintética das blendas por método de lixiviação de sal.
- Preparar material a base de PCL/AS em forma de gel injetável.
- Verificar a biocompatibilidade dos arcabouços frente à cultura de células osteoblásticas (MG63) (teste do contato direto e da metabolização do MTT). Avaliar a morfologia e proliferação celular desta linhagem (microscopia confocal e eletrônica de varredura).
- Analisar a viabilidade das células mesenquimais de medula óssea (hMSC) em suportes porosos de PCL/AS. Avaliar a diferenciação celular (atividade de fosfatase alcalina) e avaliar a mineralização da matriz extracelular (Von Kossa).
- Verificar a apoptose de osteoblastos cultivados com arcabouços de PCL/AS (citometria de fluxo).
- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* (ratos Wistar) de implantes de arcabouços de PCL e PCL/AS subcutâneos por 30 e 60 dias.

- Avaliar a biocompatibilidade do gel PCL/AS *in vivo* (ratos Wistar) por implantes subcutâneos e em tibia por 30, 60 e 90 dias.

Foram comparados todos os resultados da interação do material com as linhagens utilizadas, avaliando-se a viabilidade e diferenciação das células, quando submetidas a diferentes concentrações do arcabouço poroso ou gel da blenda polimérica. Neste trabalho, foi possível aprofundar-se no estudo *in vitro* e *in vivo* sobre interação entre biomateriais e tecidos biológicos.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

A Figura 12 ilustra o esquema geral dos ensaios que se realizou, e a descrição da metodologia experimental é apresentada em seguida.

4.1 Materiais

Suportes de polímeros biorreabsorvíveis foram preparados utilizando-se ácido sebácico (mW 30.000 g/mol) fornecido pela Merck (Groningen, Holanda), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (mW 80.000 g/mol) fornecido pela Sigma (St. Louis, EUA), PCL diol (CAPA 6023 – 250 g/mol) fornecido pela Solvay Caprolactones (Londres, UK) e pré-polímero de ácido sebácico (Merck). Diclorometano (Merck), Citrato de sódio (Synth - Brasil), ácido acético PA (Synth), PBS (solução salina à base de fosfato) em tabletes (Sigma), dimetilsulfóxido (Merck), éter etílico (Synth) e éter de petróleo (Synth).

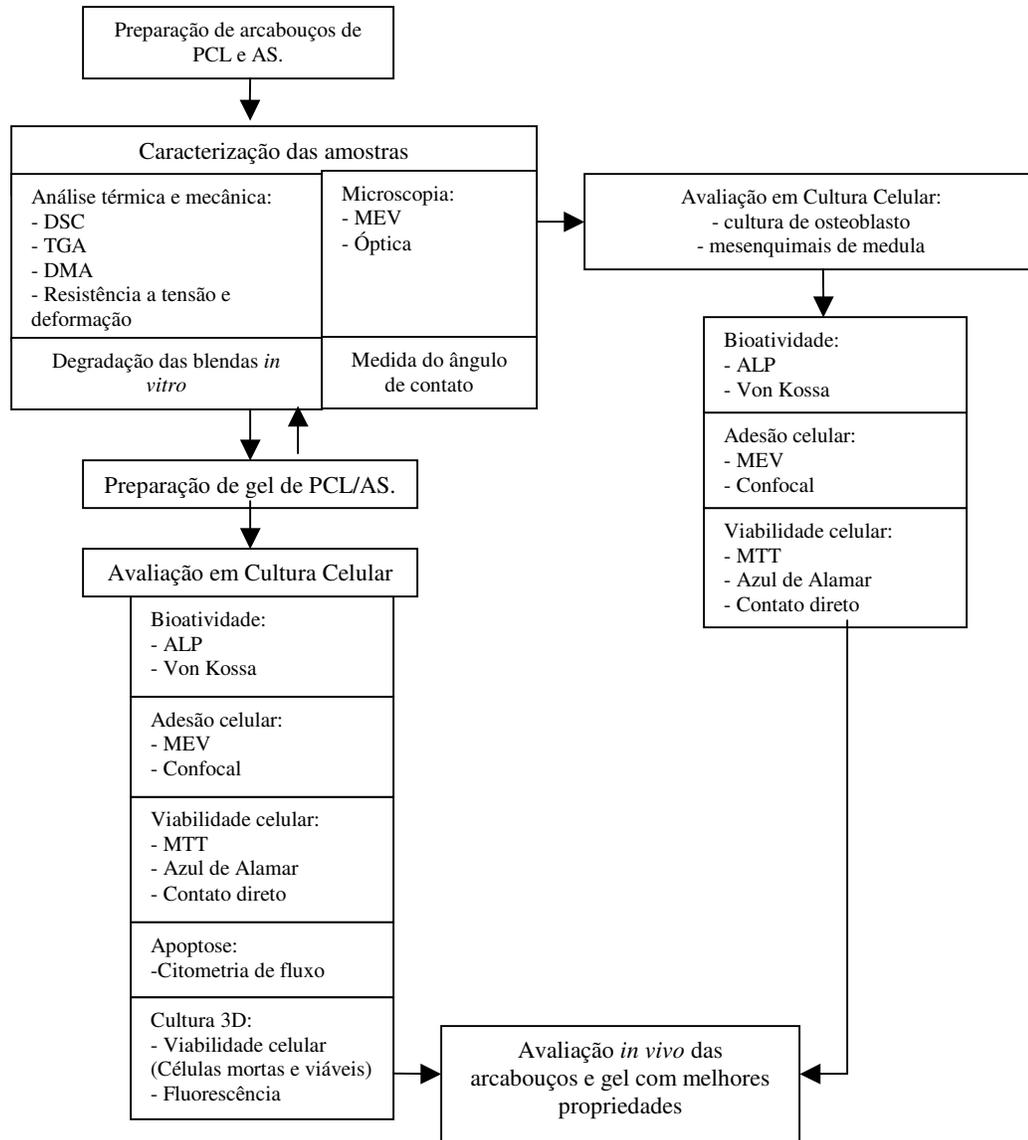


Figura 12 – Esquema geral dos ensaios que serão realizados durante o desenvolvimento do projeto.

4.2 Preparo de Arcabouços Poliméricos Porosos

4.2.1 Preparação de Ácido Sebácico

Para síntese do ácido sebácico, foi utilizado o pré-polímero diluído em ácido acético PA na proporção de 10 g em 10 mL por 30 min a 140 °C. Ao se obter um líquido claro de pouco volume, foi acrescentado o mesmo volume de diclorometano e o polímero foi precipitado.

Colocou-se o mesmo volume de solução de éter etílico e éter de petróleo em uma proporção de 1:1 (5 mL de cada). Após a mistura, a suspensão do pó do polímero foi filtrada em papel filtro (celulose) e deixada secar por 24 h. Depois, o pó foi pesado e armazenado em tubos de polietileno.

4.2.2 Confeccionar Arcabouços Densos de PCL/AS por Evaporação do Solvente

Foram preparados suportes densos e porosos pelo processo de evaporação de solvente (*casting*), adicionando 15 mL de diclorometano a 5 g de macromolécula de PCL. Após 30 min, foi adicionados o ácido sebácico (500 e 1000 mg, para 10 e 20 % respectivamente) dissolvido em 2 mL em ácido acético, a solução foi homogeneizada por agitador magnético a 140 °C. Ambos os polímeros foram misturados em agitação magnética por 3 min e o líquido viscoso transparente foi vertido em placa de Petri de vidro, deixando-se evaporar os solventes em cuba de vidro saturada com vapor de diclorometano por 24 h.

4.2.3 Lixiviação do Sal das Amostras

Para suportes porosos, adicionou-se 5 g de ácido cítrico (100 a 500 µm) ao líquido viscoso obtido pela mistura de PCL e AS, antes da secagem descrita na etapa anterior. Após a evaporação do solvente, a arcabouço foi lavada em água destilada em ultra-som por 30 h, com 6 trocas de solução. O material foi deixado secar a temperatura ambiente por 24 h e os arcabouços foram armazenadas em cuba com sílica.

4.3 Gel Injetável de Blenda Polimérica

Foi utilizado PCL macromolécula (800.000 mW), ácido sebácico (AS) sintetizado como descrito anteriormente e PCL diol (250 mW) que são cadeias curtas de PCL com grupos hidroxila nas pontas terminais e foi fornecido em forma líquida. Para a síntese de gel injetável foram utilizados 1,5 g de macromolécula de PCL dissolvidos em 5 mL de diclorometano sob agitação magnética. Em outro frasco, dissolveu-se o ácido sebácico (200 e 400 mg, para 10 e 20%, respectivamente) em 3,5 mL de PCL diol a 140 °C. Após a obtenção dos líquidos viscosos, estes

foram misturados sob agitação magnética até estarem homogêneos e foram adicionados 20 mL de solução de CaCl_2 (1 M) (Synth). A solução foi agitada por 10 min a uma temperatura de 60 °C. O líquido foi removido sendo adicionados 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 10 min. Para lavagem e remoção dos solventes orgânicos, foi adicionado 200 mL de solução de PBS aquecida (60 °C) e a solução foi trocada 4x, de 30 em 30 min. Depois da lavagem, foram adicionados 50 mL de meio de cultura estéril (α -MEM, Sigma e SBF, Cultilab) e o material foi colocado sob agitação em luz UV por 20 min (Fig. 13). A luz UV não promove qualquer reticulação nas cadeias do PCL ou do AS, sendo como único objetivo a esterilização do material.

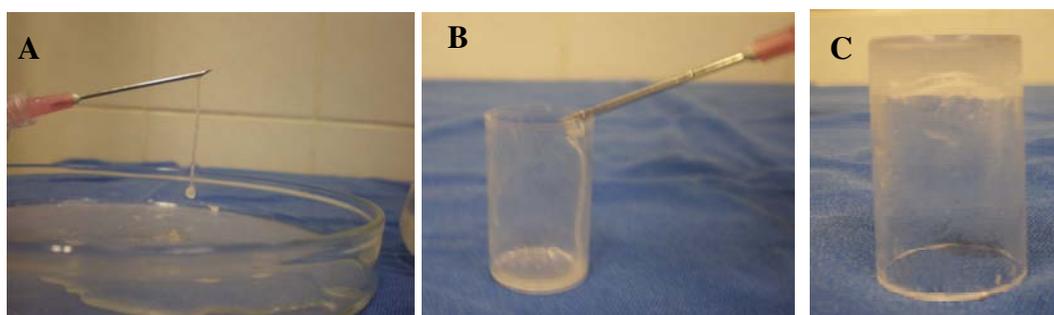


Figura 13: (A) Amostra de gel de PCL/AS. (B) A foto destaca a fluidez do gel. (C) Após 1 h, o gel se torna estável e não apresenta fluidez.

4.4 Caracterização Físico-química e Estrutural

4.4.1 Microscopia Ótica Diferencial (OPM)

Para a análise por microscopia ótica, foi utilizado o microscópio invertido modelo GX51 da Olympus. Para a obtenção das imagens utilizou-se luz polarizada e a opção por *dic*, *differential interference contrast*, um dispositivo que resalta as diferenças topográficas da amostra.

4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando-se um microscópio Jeol (JXA 840A). As amostras foram recobertas com ouro-paládio

em metalizador Sputer Coater (Bal–Tec – SCD 050), sob corrente de 40 mA durante 200 s, com tensão de recobrimento em 10 kV. Para as amostras contendo células, foi feita a fixação com 1,5 % de glutaraldeído e 0,14 M de cacodilato de sódio por 30 min. Depois, a amostra foi lavada com água destilada. Para secagem, os materiais foram desidratados com uma sequência de incubação em etanol (70 a 100 %) por 10 min e deixadas secar em temperatura ambiente por 24 h. As células foram avaliadas como descrito anteriormente.

4.4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Análises de DSC (STA 409C da Netzsch – Geratebau Gmbh Thermal Analysis) foram realizadas por meio de um primeiro aquecimento na faixa de 25 a 100 °C (taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio), para que se pudesse desconsiderar a influência térmica decorrente da etapa de preparação das amostras. Posteriormente, outra varredura no mesmo intervalo de temperatura foi realizada para avaliar o pico endotérmico da blenda polimérica. Com estes resultados, foram medidos os valores da temperatura de transição vítrea (T_g), fusão (T_m) e a variação da entalpia de fusão (ΔH_f).

A porcentagem de cristalização das amostras foi calculada a partir das curvas obtidas para a área do pico endotérmico e a entalpia de fusão do material. Estes dados foram aplicados na seguinte equação (2):

$$m \cdot \Delta H_f = K \cdot A \quad (2)$$

onde m é a massa de material utilizada na análise, ΔH_f é a entalpia de fusão, K a constante calculada a partir do ΔH_f do polímero 100 % cristalino (amostra padrão). E A é a área do pico de fusão da amostra (Lucas *et al.*, 2001).

4.4.4 Análises Termogravimétricas (TGA)

As amostras foram aquecidas de 25 a 800 °C (taxa de aquecimento de 10°C/min) sob atmosfera de nitrogênio. Foi avaliada a temperatura de início da degradação térmica (*Tonset*) das amostras utilizando-se o equipamento BP Equipamentos (Brasil).

4.4.5 Avaliação da Resistência Mecânica à Tração

Para a realização dos ensaios mecânicos, os arcabouços foram cortados em determinadas dimensões (10x1x0,1 cm), fixadas ao equipamento de tração por garras distantes entre si por uma distância específica (7 cm) e alongadas a uma taxa de deformação (velocidade) constante (50 mm/min). Destaca-se que apesar de existirem normas para a realização de tais ensaios, como a ASTM D638 e a ASTM D882, estas nem sempre são seguidas com rigor, devido à necessidade de adequação das mesmas às características específicas do material a ser avaliado. No presente trabalho foram avaliadas membranas finas de polímeros e assim foi utilizada a ASTM D882 para os ensaios mecânicos.

4.4.6 Medida de Ângulo de Contato

A medida do ângulo de contato foi realizada para avaliar a hidrofobicidade da superfície dos arcabouços poliméricos. Estas foram secas em temperatura ambiente após tratamento ou não da superfície com NaOH com objetivo de tratar a superfície e torná-la menos hidrofóbica. Foi utilizado para o ensaio o programa de análise *Knuss drop shape* (DSA), com o aparelho *Knuss G10 contact* (U.S.A.). O equipamento libera uma gota de água destilada (10 μ L, pH = 7,4) sobre a superfície e após 30 seg, a medida do ângulo formado entre a gota e a superfície foi realizada (Fig. 14). O processo foi repetido 3 vezes e a média do valor do ângulo foi calculada (Wang *et al.*, 2009).

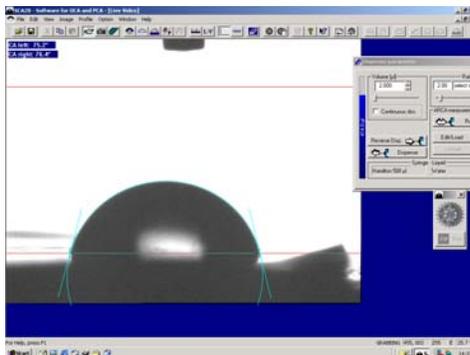


Figura 14: Imagem do programa de computador utilizado para a medida do ângulo de contato de uma gota de água e a superfície dos arcabouços estudados.

4.5 Análises de Biodegradação

4.5.1 Degradação *in vitro* em Tampão Fosfato (PBS - pH 7,4)

O estudo da degradação em tampão fosfato foi realizado com amostras de arcabouço obtidas pelo processo de evaporação do solvente orgânico e lixiviação de sal e gel de PCL/AS. Após o preparo, as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo meio de tampão fosfato (PBS) 0,1 mol/L, pH 7,4 e mantidas em estufa a $37 \pm 0,5$ °C. Após 30, 60, 90 e 120 dias de incubação, as amostras foram caracterizadas pelas técnicas de MEV, DSC e DMA.

4.5.2 Tratamento de Superfície dos Arcabouços com Solução Alcalina (NaOH)

O estudo do tratamento das superfícies em meio alcalino foi realizado com amostras dos arcabouços densos, de PCL e PCL/AS em soluções aquosas de hidróxido de sódio (NaOH). Foram utilizadas soluções com concentrações 0,1 mol/L, 0,5 mol/L e água destilada como controle. Tratando-se de uma base forte, o grau de dissociação do NaOH pode ser considerado 100 % em solução aquosa. Dessa forma, a concentração da hidroxila presente no meio pode ser calculada pela concentração de hidróxido de sódio, i.e. $[\text{NaOH}] = [\text{OH}^-]$. O acondicionamento foi feito de forma similar ao estudo com tampão fosfato, e os tubos de ensaio foram mantidos em estufa a $37 \pm 0,5$ °C. Após o período de 24h, os arcabouços foram retirados e lavados abundantemente com água destilada e posteriormente com etanol. O material foi caracterizado em cada concentração de solução pelas técnicas de MEV e ângulo de contato.

4.6 Avaliação *in vitro* dos Biomateriais

4.6.1 Cultura de Células

Para o cultivo das linhagens celulares MG63 (osteoblasto de osteosarcoma humano - ATCC), foi utilizado o meio de cultura α -MEM com 10 % de soro fetal bovino (SBF). As células mesenquimais de medula humana (hMSC) foram compradas na ATCC (E.U.A.) e cultivadas em hMSCGM (Sigma) com 10 % de SBF até a sexta passagem. Em ambos os meios de cultura foram

adicionados 0,5 % de solução contendo estreptomicina (3×10^{-4} mol/L) e penicilina (5×10^{-4} mol/L).

As células MG63 foram cultivadas em garrafas de poliestireno com capacidade para 75cm^2 em estufa umidificada a 37°C e 5 % de CO_2 . Quando a monocamada celular atingiu a confluência de 90 %, foi lavada com 3 mL de PBS e tripsinizada com 1,5 mL de tripsina bovina 0,2 % (ATV). As células foram semeadas em uma concentração de 10^6 células/poço em placas de cultura de 24 poços. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5 % de CO_2 .

As células hMSC foram cultivadas em garrafas, de maneira semelhante à descrita anteriormente, porém com o meio específico (hMSCGM e 10 % SBF). Após esse procedimento, as células foram semeadas em placas na concentração de 2×10^3 células/mL. Para a diferenciação das hMSC em osteoblastos, o meio de cultura foi trocado pelo meio osteogênico (dexametasona - 10^{-8} M, ácido ascórbico - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e glicerofosfato - 10 mM), após 24 h.

4.6.2 Análise de Citotoxicidade e Densidade

Teste do Contato Direto

Os biomateriais foram submetidos aos testes recomendados pelas normas internacionais vigentes (ISO 10993-5, 1997 e ABNT – NBRISO 10993, 1999), utilizando-se células MG63. A cultura em placas de poliestireno de 24 poços (sem qualquer material) foi utilizada como controle negativo, quando o tamanho do poço era exatamente igual ao tamanho dos discos de materiais testados, já que o poliestireno é um polímero inerte, além de ser um suporte ideal para adesão e crescimento celular, representando o material mais utilizado na produção de placas de cultura celular. A forma de análise dos índices de morte celular e de zona de contato das células com o material está explicitada nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Índice morte celular por análise de Contato Direto segundo a ISO 10993-5.

| Índice | Descrição | Classificação |
|---------------|-------------------------------------|----------------------|
| 0 | Nenhuma morte celular | Nenhum |
| 1 | Menos de 20% células afetadas | Leve |
| 2 | Entre 20 e 39% das células afetadas | Suave |
| 3 | Entre 40 e 59% das células afetadas | Moderado |
| 4 | Entre 60 e 80% das células afetadas | Severo |

Tabela 3: Índice de zona de contato das células com o material por análise de contato direto segundo a ISO 10993-5.

| Índice | Descrição | Classificação |
|---------------|--|----------------------|
| 0 | Nenhuma zona sob e ao redor da amostra. | Nenhum |
| 1 | Zona limitada sob a amostra. | Leve |
| 2 | Zona inferior a 0,5 cm ao redor da amostra. | Suave |
| 3 | Zona limitada entre 0,5 a 1 cm ao redor da amostra | Moderado |
| 4 | Zona superior a 1 cm ao redor da amostra, porém sem envolver toda a placa. | Severo |

Teste do Contato Indireto

Foi realizada a cultura de células das linhagens celulares MG63 e de hMSC, conforme descrito anteriormente. As células foram semeadas em placas de 24 poços para cultura em 3D, numa densidade de 4×10^5 células/mL. Os biomateriais foram colocados em tubos de polietileno (Corn) contendo meio de cultura sem soro, cada meio respectivo ao tipo celular estudado, os materiais foram removidos após 24 h e o meio suplementado com SBF (10 %) antes de ser colocado em contato com a cultura celular. O volume de líquido foi colocado na proporção de 1g para 1 mL de meio de cultura (eluato). Após 24 h de incubação as placas tiveram o meio trocado e o eluato foi adicionado puro e diluído 1:1 e 1:4 por meio fresco suplementado com 10 % de SBF. As placas permaneceram sem troca de meio por 72 h para avaliar a viabilidade e proliferação celular. Células com meio de cultura fresco foram avaliadas como controle negativo. Como controle positivo foi utilizada uma solução de fenol 10 % em meio de cultura e soro.

Após o tempo de incubação previsto, o meio de cultura foi aspirado e foi adicionada uma solução contendo MTT (5mg/mL em meio de cultura), por 4h. Após o tempo de incubação, aspirou-se o sobrenadante, e 100 µL de DMSO foram adicionados por placa para homogeneizar a camada de células, rompendo-as. Cada solução de cada poço teve a sua densidade ótica quantificada em espectrofotômetro a 630 nm (SLT Labinstruments – Áustria).

Como as células mesenquimais (hMSC) perdem a sua viabilidade durante a incubação com a solução de MTT, para medir a viabilidade destas células foi realizado o ensaio com resazurina (azul de Alamar) (Sigma) 0,01 mg/mL em meio de cultura. A solução foi adicionada aos poços das placas e deixada incubada como no teste de MTT (4 h). A resazurina foi reduzida, nas mitocôndrias de células viáveis, em resofurina que emite fluorescência a 590 nm. Após este período, 100 µL do sobrenadante foram adicionados à placa de 96 poços e a fluorescência medida em fluorímetro (Spectra Max Gemini XS) com $\lambda_{ex}=530$ nm e $\lambda_{em}=590$ nm.

Análise de Apoptose Celular

As células MG63 foram semeadas (10^6 células /mL) e o gel de PCL/AS (0,05 g) foi adicionado após 24 h de cultura. Como controles negativos foram utilizados os poços sem a presença de material (poliestireno). Os materiais permaneceram em cultura por 24 e 48 h. Depois do período de incubação, as células mortas, que estavam no sobrenadante, foram coletadas junto com as células aderidas a placa de cultura. Para remover a cultura da placa foi utilizada a tripsina (5 %) por 5 min. As células de cada cultura foram lavadas por centrifugação com tampão de solução de fosfato (PBS). Os pellets foram suspensos em 500 mL de iodeto de propídio (IP) (0.5 mg/mL) e solução de anexina V-FITC (100 mg/mL) a 37 °C por 30 min, na ausência de luz. Finalmente, as células foram analisadas em citometria de fluxo (EPICS XL MCL, Coulter Electronics), em que foi detectada a indução de fluorescência do iodeto de propídio (IP) e da anexina. O iodeto de propídeo possui alta afinidade ao DNA celular, porém ele não atravessa a membrana plasmática de células viáveis ou apoptóticas, servindo de marcador das células mortas. A anexina V se liga a fosfatidilserina das membranas das células apoptóticas, sendo utilizada como marcador de apoptose celular. Os resultados foram analisados de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Metodologia de classificação celular pelo método de citometria de fluxo.

| Células | Fluorescência | |
|-------------|--------------------|-----------|
| | Iodeto de Propídeo | Anexina V |
| Viáveis | - | - |
| Apoptóticas | - | + |
| Mortas | + | + |

Determinação da Densidade Celular

As células MG63 foram semeadas (2×10^5 células/mL) em gel de PCL/AS e mantidas em cultura por 24 e 48 h. As amostras foram lavadas com PBS e coradas com calceína (1 h) e iodeto de propídeo (25 mg/ml) por 5 min. A calceína emite fluorescência verde e consegue atravessar a membrana plasmática de células vivas, marcando as células viáveis. Porém o iodeto de propídeo utilizado em outros métodos se liga ao DNA celular e marca as células mortas emitindo fluorescência vermelha. Quando a visualização das células no interior da amostra não era possível, as células eram fixadas em 2 % de paraformaldeído por 20 min, e coradas com iodeto de propídeo, a observação foi feita em microscópio de fluorescência Olympus BX60 (Olympus Optical Co Ltd, Tokyo, Japan), e a imagem analisada (Seescan Symphony, Seescan, Cambridge UK).

4.6.3 Avaliação da Morfologia Celular

Uma modificação do método de Mosmann, 1983, foi utilizada. Assim, os diferentes materiais foram colocados em placas de 24 poços (Corning) e mantidos a 37 °C em meio α -MEM, por 24 h. Após esse tempo de incubação, uma quantidade de 100 μ L de suspensão de células MG63 ($2,0 \times 10^5$ células/mL) em meio α -MEM com 10 % SBF foi inoculada nos poços com as diferentes amostras. Após 2 h de incubação a 37 °C, os poços foram lavados 2 vezes com

PBS 0,1 M, pH 7,4 e receberam 100 μ L de α -MEM sem SBF e 50 μ L de MTT em PBS. Após 4 h de reação, os materiais foram fotografados e analisados por lupa com aumento de 10 vezes.

Para avaliar a morfologia celular foram utilizadas as MG63. As células foram contadas e semeadas em placas conforme descrito anteriormente. Os biomateriais foram incubados durante 3, 7 e 10 dias, juntamente com a cultura. Após o tempo de incubação determinado, o meio de cultura foi removido e lavado 3 vezes com PBS. As amostras foram incubadas em solução de paraformaldeído 4 % por 10 min. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% por 5 min, e então lavadas por 3 vezes com solução de PBS. Foram adicionados 500 μ L de solução de Alexafluor 488 em cada poço por 60 min e a placa foi protegida da luz. Este fluorocromo se liga a actina do citoplasma celular e emite fluorescência verde. Depois, cada poço foi lavado por 3x com 1 % BSA (albumina bovina – Sigma) e as células foram incubadas por 5 min com 500 μ L de iodeto de propídeo, que se liga ao DNA celular emitindo fluorescência vermelha. Após incubação, o material foi lavado com solução de 1 % de BSA e observado ao microscópio confocal. Foram observadas as células aderidas à superfície e analisadas as suas morfologias.

Para a cultura 3D de osteoblastos em gel polimérico, as células foram misturadas diretamente ao material. Para isso, utilizou-se uma suspensão de MG63 com 2×10^8 células/mL de concentração, em 5 mL de meio de cultura e 10 % de SBF. Utilizando um dispositivo com 2 seringas de 5 mL, misturou-se as células ao gel e colocou-se uma fina camada de gel (1 mm) em placa de 24 poços, sendo adicionado sobre o material o meio de cultura (1 mL). O material contendo as células foi mantida em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24 h. Após a reticulação do material, os discos de PCL/AS foram colocados em *spinner flasks* para cultura em 3D, contendo 100 mL de meio α -MEM e SBF (10 %), por 24 e 48 h.

4.6.4 Diferenciação Celular (Métodos de ALP e Von Kossa)

Para diferenciação osteogênica, foi utilizada a linhagem hMSC. Estas células foram cultivadas em MSCGM suplementado com 10 % SBF e 0,5 % de antibióticos. Após 24 h do primeiro repique, as células foram induzidas para diferenciação osteogênica pelo meio composto por MSCGM, 10 % SBF, 10^{-8} M de Dexametasona, 30 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico-2-fosfato e 10 mM glicerofosfato. Os meios de cultura foram trocados de 48-48 h. A diferenciação osteogênica foi avaliada após 3, 7 e 10 dias de cultura pela coloração de von Kossa e atividade de fosfatase alcalina.

A atividade da enzima fosfatase alcalina, foi quantificada com Alkaline Phosphatase (Sigma), as amostras em triplicata, das culturas com os arcabouços e o gel de PCL/AS e do controle negativo foram submetidas às condições para diferenciação osteogênica, e a atividade da fosfatase alcalina avaliada nos intervalos de 3, 7 e 15 dias.

As células foram lavadas com PBS e incubadas com Triton X-100 1 % por 30 min. A suspensão de cada poço da placa de cultura foi homogeneizada e foram adicionados 200 μL de substrato de ALP (p-nitrofenil fosfato) por 1 h a 37 °C. Para interromper a reação, foram adicionados 10 μL de NaOH (0,02 M). Em seguida, a absorvância foi calculada por espectrofotômetro de Elisa (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 405 nm. Para calcular a concentração real da fosfatase alcalina, foi medida a concentração total de proteínas. Este procedimento foi feito utilizando-se o mesmo lisado celular usado para quantificar o ALP. Para reação, foi utilizado o reagente de BCA (contém carbonato e bicarbonato de cálcio, tartarato de sódio, sulfato de cobre e ácido bicincônico) (Sigma) por 1 h a 37 °C e a absorvância foi medida em espectrofotômetro de placas tipo Elisa a 540 nm. A curva de calibração foi feita com concentrações crescentes de albumina bovina (BSA - Sigma).

Para avaliar a presença de cálcio na cultura celular contendo o biomaterial, as células hMSC foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^5 células/mL) e incubadas com o biomaterial em períodos de tempo de 3, 7 e 10 dias. Logo após o período de incubação, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS e adicionaram-se 400 μL de paraformaldeído 4 % por 10 min. Depois do tempo de incubação, foram lavadas 3x com H₂O destilada. As placas foram incubadas em AgNO₃ (nitrato de prata) (Sigma) 2 % por 30 min, à temperatura ambiente, em UV. Foram

lavadas 3 vezes com PBS e adicionaram-se 500 µL de tiosulfato de sódio (Sigma), deixando por 5 min, lavando-se 3 vezes com PBS e deixando secar ao ambiente. O tiosulfato de sódio iria reagir com o nitrato de prata precipitando esta nos pontos de calcificação da matriz extracelular. As células foram avaliadas em microscópio ótico.

4.7 Avaliação *in vivo* dos Biomateriais

4.7.1 Implante Subcutâneo em Ratos Wistar (Arcabouço e Gel)

Os ensaios com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade de Biologia (IB) da UNICAMP (CEEA 1534-2). Ratos Wistar (biotério UNICAMP) machos de 250 - 300 g foram anestesiados com solução de ketamina, na dose de 0,4 mL/300 g de peso de animal (*i.p.*) e xilasina na dose de 0,14 mL/300 g de peso de animal (*i.p.*). O dorso foi depilado, desinfetado com álcool 70 % e os materiais injetados subcutaneamente, com seringa comum (10 mL), no dorso (área do glúteo direito). Os animais foram mantidos em gaiolas, em grupos de 5, com alimentação e água à vontade e cada grupo permaneceu 30, 60 e 90 dias com o material implantado.

Após o período de implantação, os animais foram sacrificados, utilizando-se deslocamento cervical. O material foi removido e fixado em solução de formol 10 % por 12 h. Depois deste período de tempo, a solução de formol foi substituída por solução de etanol 70 % até o processamento histológico. A análise histopatológica foi realizada no Departamento de Patologia da FCM/UNICAMP, através de imagens geradas em microscópio ótico. A análise de cinco campos por corte de tecido foi feita e as características analisadas foram à regeneração tecidual, formação vascular e presença de células inflamatórias (Fig. 15 e Tab. 5) (ASTM, 1998). O objetivo do implante seria estabelecer a sequência de processos biológicos associada à presença do biomaterial. Devido à cirurgia espera-se uma inflamação aguda com presença de infiltrado inflamatório, coagulação sanguínea, neovascularização e síntese de colágeno. Se o material for biocompatível, possivelmente haverá formação de tecido ao redor do material e este será incorporado ao organismo. Caso o material não tiver uma resistência mecânica apropriada ao tecido a ser substituído, este irá se movimentar, promovendo uma inflamação crônica e encapsulamento do implante por fibras colágenas, isolando este material do organismo. Se

houver a formação de tecido granulomatoso, devido à inflamação crônica, ocorrerá a resposta de corpo estranho, o implante não será incorporado pelo tecido, sendo isolado por uma cápsula fibrosa, favorecendo a perda deste implante (Fig. 15).

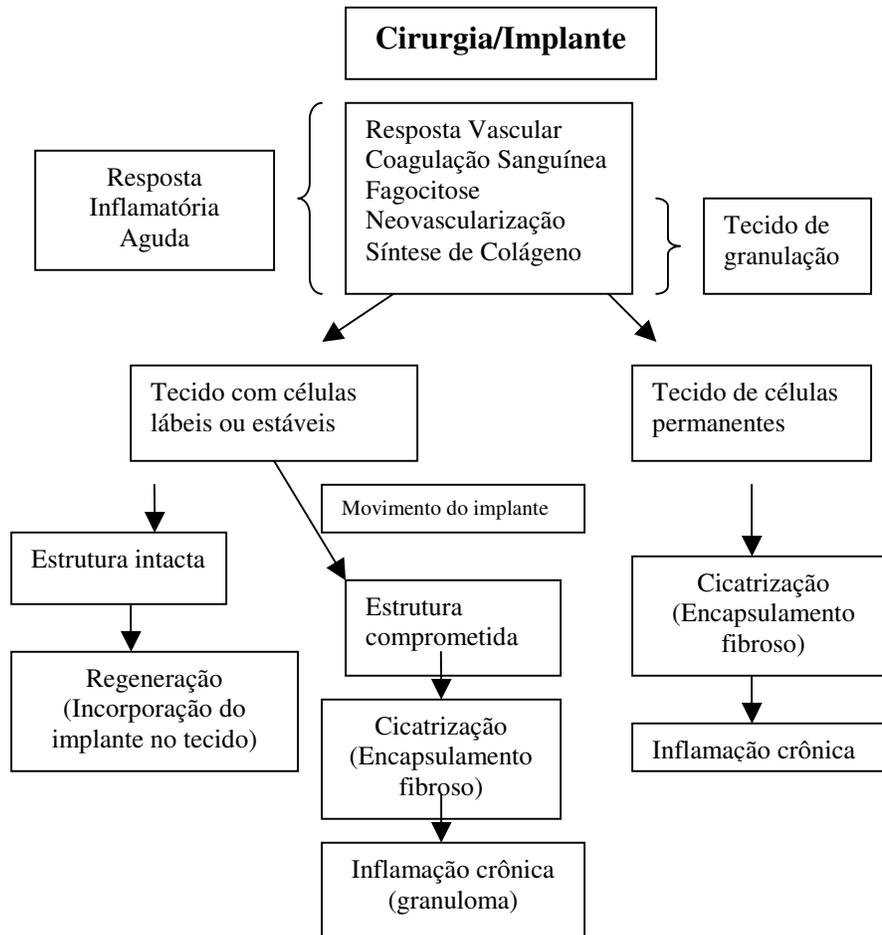


Figura 15: Diagrama que estabelece a sequência de processos biológicos associados com a cicatrização dos implantes.

4.7.2 Implante em Tíbia de Ratos Wistar (Gel)

Nesta análise, foram utilizados animais como descrito anteriormente. O material foi injetado em um orifício na lateral da tíbia direita, feito com broca de 3 mm (Fig. 16). Cada grupo permaneceu 30, 60 e 90 dias com o material implantado.

Após o período de implantação, os animais foram sacrificados utilizando-se deslocamento cervical. O material foi removido e fixado em solução de formol 10 % por 12 h. Depois deste período de tempo, a solução de formol foi substituída por solução de descalcificação (ácido clorídrico - 0,1 M, em solução salina) por 8 h. O material foi lavado com solução de água destilada e armazenado em solução de etanol 70 % até o processamento histológico. As análises foram realizadas com descrito na Tabela 6.

Tabela 5: Forma de análises dos dados histológicos de implantes de arcabouços e de gel em tecido subcutâneo (ratos Wistar).

| Evento | Nível de Resposta |
|--|--|
| Presença de tecido necrótico | 0 – Ausência. |
| | 1 – Entre 1 e 20 % do tecido apresenta alteração. |
| | 2 – Entre 20 e 50 % do tecido apresenta alteração. |
| | 3 – Acima de 50 % do tecido apresenta alteração. |
| Presença de células inflamatórias | 0 – Ausência. |
| | 1 – Presença de leve infiltrado inflamatório. |
| | 2 – Presença de intenso infiltrado inflamatório. |
| Grau de maturação do tecido | 0 - Ausência de formação tecidual. |
| | 1 – Formação de tecido conjuntivo na periferia do implante. |
| | 2 - Formação de tecido conjuntivo na periferia e no interior do implante. |
| | 3 - Maturação do tecido conjuntivo por todo o implantes com a organização das fibras colágenas, presença de vasos sanguíneos e fibroblastos. |
| Presença de células gigantes (reação inflamatória de corpo estranho) | 0 – Ausência. |
| | 1 – Presença de poucas células. |
| | 2 – Presença de muitas células. |

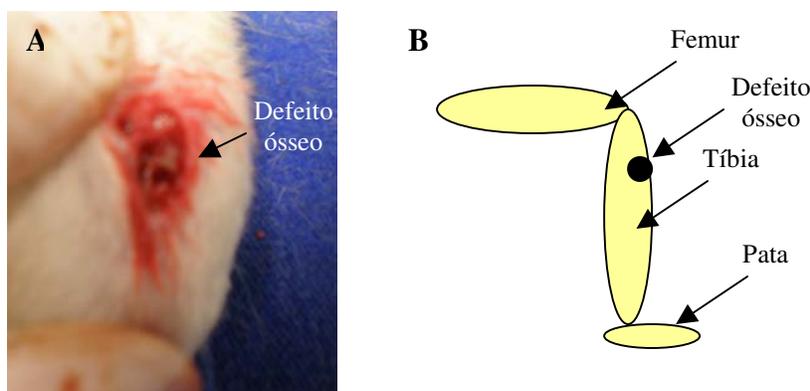


Figura 16: (A) Fotografia de cirurgia em tíbia de rato para implante de gel de PCL/AS (orifício de 3 mm). (B) Desenho esquemático da área da pata do animal onde foi feito o defeito na tíbia.

Tabela 6: Forma de análises dos dados histológicos de implantes de gel em tecido ósseo (tíbia de rato Wistar).

| Evento | Nível de Resposta |
|--|--|
| Presença de tecido necrótico | 0 – Ausência. |
| | 1 – Entre 1 e 20 % do tecido apresenta alteração. |
| | 2 – Entre 20 e 50 % do tecido apresenta alteração. |
| | 3 – Acima de 50 % do tecido apresenta alteração. |
| Presença de células inflamatórias | 0 – Ausência. |
| | 1 – Presença de leve infiltrado inflamatório. |
| | 2 – Presença de intenso infiltrado inflamatório. |
| Grau de maturação do tecido | 0 - Ausência de formação tecidual. |
| | 1 – Formação de tecido ósseo desorganizado. |
| | 2 - Formação de tecido ósseo organizado, ainda apresentando remodelação óssea. |
| | 3 - Formação de tecido ósseo organizado e com estrutura lamelar. |
| Presença de células gigantes (reação inflamatória de corpo estranho) | 0 – Ausência. |
| | 1 – Presença de poucas células. |
| | 2 – Presença de muitas células. |

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1 Arcabouços da Blenda de PCL/AS

5.1.1 Morfologia de Superfície Avaliada por Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura

Pesquisas extensas na área de medicina regenerativa estão focadas no desenvolvimento de células e biomateriais, com o propósito de restaurar a função através de engenharia tecidual, como uma parte de desenvolvimento *in vitro* de implantes. Com isso, dispositivos temporários são utilizados em casos onde o tecido foi danificado por uma doença ou trauma. Um implante biodegradável poderia oferecer suporte mecânico temporário e adequado para transferência de carga mecânica gradualmente enquanto ocorresse a degradação controlada do biomaterial (Ratner *et al.*, 2004). Um polímero biodegradável muito pesquisado é a policaprolactona (PCL) que é biocompatível, possui uma resistência mecânica adequada, porém um longo tempo de degradação. Pensando nisto, no presente trabalho, foram desenvolvidos arcabouços deste polímero com ácido sebácico (AS) em diferentes proporções com a possibilidade de viabilizar o crescimento celular, apresentando uma taxa de degradação controlável e mais rápida que o PCL puro. Para caracterizar a nova blenda foram confeccionados arcabouços por evaporação de solvente com diversas proporções para serem exaustivamente avaliadas por diversos métodos comparando as diferenças em relação aos polímeros constituintes da blenda (policaprolactona e ácido sebácico).

A princípio foram caracterizados os arcabouços com concentrações variadas de ácido sebácico (10 a 50 %) para avaliar o melhor desempenho da blenda, porém os arcabouços com 30 e 50 % de AS apresentaram propriedades térmicas e dinâmico-mecânicas (DSC e DMA) muito inferiores aos compostos com ácido sebácico a 10 e 20 %. A mistura de ambos os polímeros tornou-se dificultada, em altas proporções de AS, havendo separação de fase que, na análise térmica, aparece como dois picos de fusão (referentes a cada polímero da blenda). Não foi possível realizar os ensaios em DMA pela sua baixa resistência mecânica e friabilidade. Por isso serão mostradas neste capítulo somente as análises de materiais de PCL/AS 90:10 e 80:20 (% m/m). Os demais resultados poderão ser visualizados no capítulo 8 (Anexos – Fig. 60-63).

A Figura 17 mostra, por microscopia óptica polarizada, a superfície do arcabouço de policaprolactona (PCL) e da blenda de PCL e ácido sebácico (AS) na proporção de 90:10 (% m/m). Na figura 17A observa-se a parte cristalina do PCL formada por estrutura de esferulitos, circundados pela porção amorfa do polímero. Na membrana da blenda (Fig. 17B) também há a presença de estrutura cristalina (esferulitos), porém em tamanho reduzido e com uma maior porção amorfa de PCL circundado por estruturas esferóides. A mesma estrutura cristalina foi observada por Wang e colaboradores (2006). O tamanho dos esferulitos foi menor quanto maior a cadeia de policaprolactona ao aquecer rapidamente o material e resfriá-lo lentamente. Os autores sugerem que as cadeias maiores têm dificuldade de se organizar, e esse fator agrava com a presença de outro polímero. No trabalho mencionado, a policaprolactona foi copolimerizada com fumarato (Wang *et al.*, 2006). Em outro trabalho realizado por Kesel e colaboradores (1999), mostra PCL e polivinilálcool (PVA), observando-se também a diminuição da fase cristalina (presença de esferulitos) e do tamanho das estruturas esferóides com o aumento na concentração de PVA.

Foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a superfície dos arcabouços de policaprolactona (Fig. 18A) e dos materiais à base de PCL/AS nas seguintes proporções, 90:10 (B) e 80:20 (C) (% m/m). A presença do ácido sebácico aumentou a rugosidade do biomaterial, o que é desejável. Para a cultura celular a rugosidade altera a adesão das células e modifica a taxa de proliferação celular. As células tendem a aderir em superfícies com uma rugosidade uniforme e sem picos, em superfícies muito lisas não se observa uma grande

adesão celular (Kunzler, 2007). A avaliação de outras concentrações do arcabouço de PCL/AS encontra-se no capítulo 8 (Anexos - Fig. 60-63).

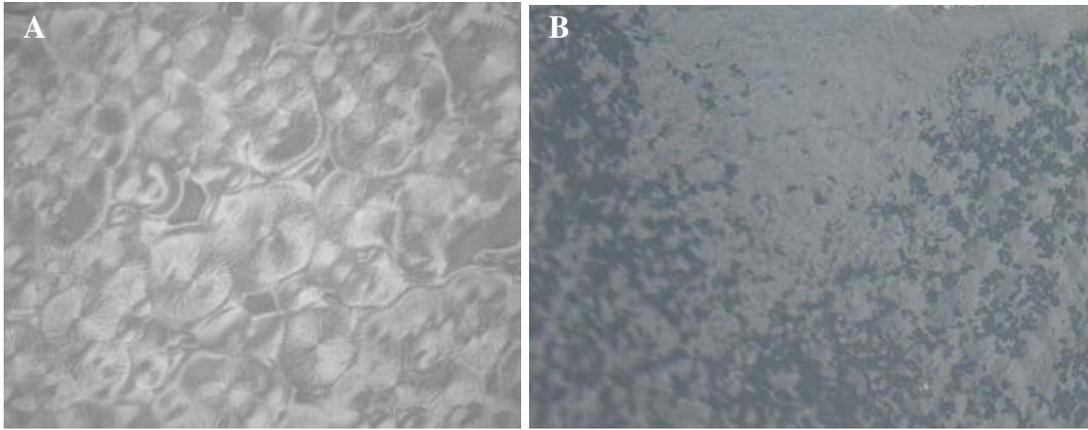


Figura 17: (A) Membrana de PCL observada por microscopia óptica polarizada (10x). (B) Membrana de PCL/AS (90:10 – % m/m) (4x).

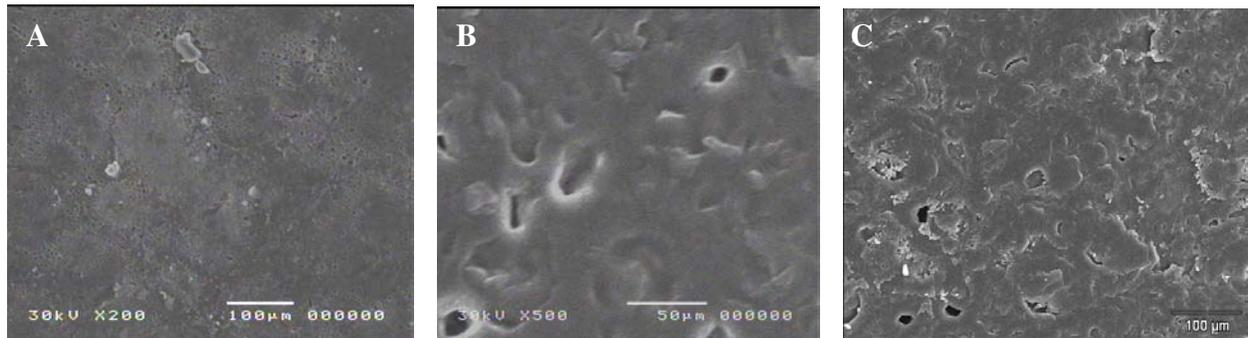


Figura 18: Micrografias das membranas poliméricas (MEV). (A) PCL puro. (B) PCL/AS 90:10 (% m/m), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m).

Nos arcabouços em que se utilizou o ácido cítrico como agente porogênico, a presença do AS aumentou a porosidade em relação a policaprolactona pura (Fig. 19 A-C); os poros encontravam-se maiores e mais bem distribuídos. Essa relação de material e quantidade de poros é fundamental para a cultura celular. Em engenharia tecidual espera-se que haja uma adesão e proliferação de células em toda a extensão do arcabouço, desde a superfície até o seu interior, e a porosidade é um dos fatores limitantes deste processo (Ratner *et al.*, 1995). A porosidade obtida

utilizando o citrato de sódio foi semelhante à mostrada por Kweong e pesquisadores (2003), porém foi utilizado o cloreto de sódio (NaCl) como agente porogênico.

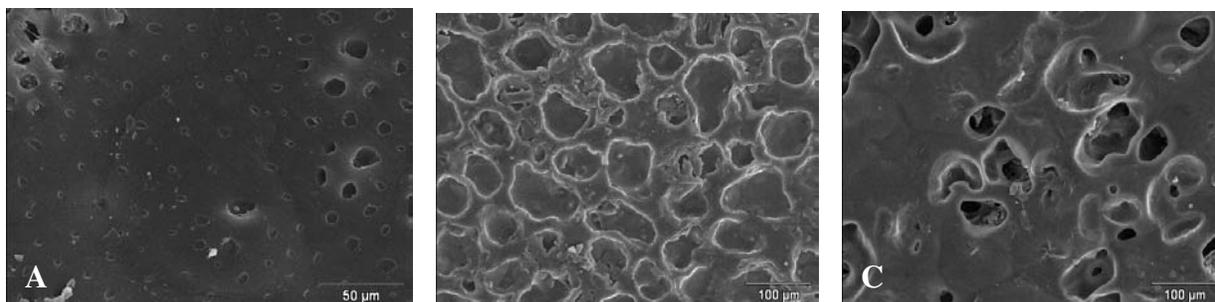


Figura 19: Micrografias dos arcabouços poliméricos porosos (MEV). (A) PCL puro. (B) PCL/AS 90:10 (% m/m), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m).

5.1.2 Caracterização das Propriedades Térmicas

A Figura 20 mostra as curvas de análise termogravimétrica (TGA) do PCL e da blenda, nas quais se observa a influência da concentração de AS na diminuição da temperatura máxima de perda de massa (Tab. 7, Fig. 20 e 21). Nas curvas dos arcabouços de PCL/AS observa-se a formação de dois platôs, indicando que, após o aquecimento, possivelmente haja perda de um polímero da blenda e depois do outro.

Tabela 7: Resultados de análises de TGA dos arcabouços da blenda de PCL/AS com diferentes composições.

| Materiais | Derivada máxima (°C) |
|------------------|----------------------|
| PCL (100 %) | 387,1 |
| AS (100 %) | 198 |
| PCL/AS (90:10 %) | 381,1 |
| PCL/AS (80:20 %) | 375,7 |

Como a policaprolactona é mais estável, durante a degradação térmica, que o ácido sebácico, provavelmente o AS começa a perder massa em primeiro lugar, seguida pela perda do PCL. Estes dois polímeros possuem características térmicas distintas, pois o ácido sebácico é mais cristalino, porém degrada-se mais rapidamente termicamente que o PCL. No trabalho de Wang e

colaboradores (2006) foi observada uma perda precoce de massa de policaprolactona pura. O copolímero de PCL e fumarato estudado por eles conseguiu melhorar a estabilidade térmica da policaprolactona, o que não ocorreu no estudo do PCL e ácido sebácico (Wang *et al.*, 2006).

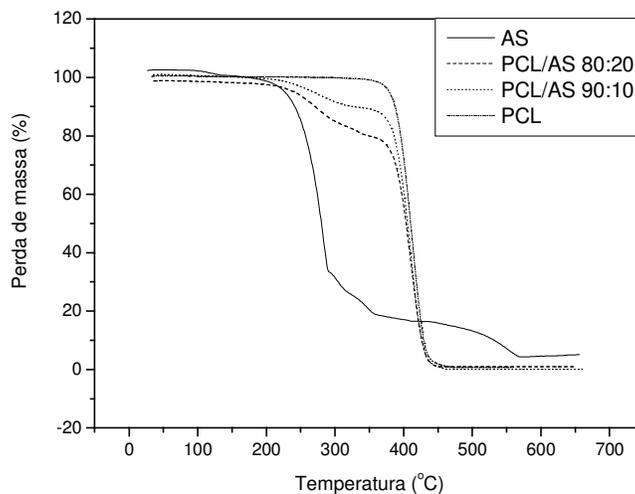


Figura 20: Curvas de TGA dos arcabouços de PCL e de PCL/AS de diferentes composições.

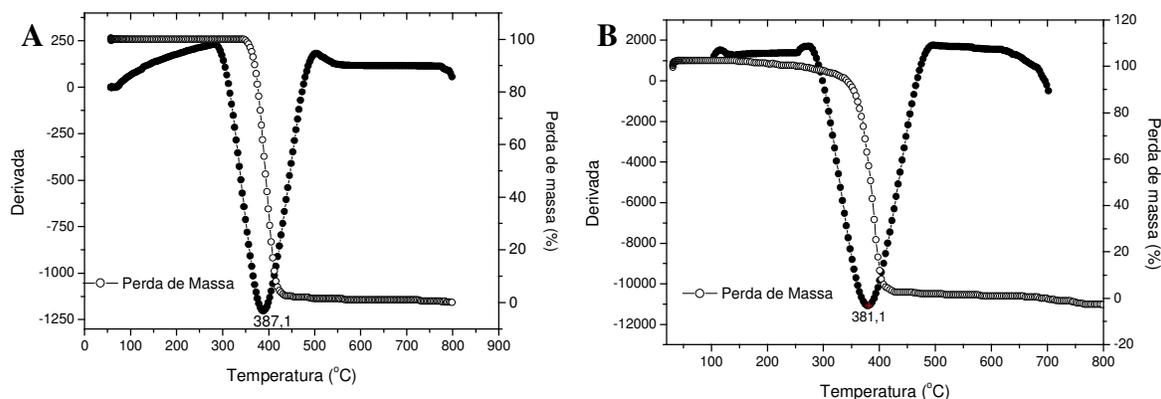


Figura 21: (A) Curvas de TGA do arcabouço de PCL. (B) Curva de perda de massa e da derivada de arcabouço de PCL/AS 90:10 (% m/m).

Nas análises de calorimetria diferencial por varredura (DSC), a área do pico está relacionada à quantidade de energia que o material necessita para mudar de fase, no caso o PCL, por ser um polímero semicristalino com baixo grau de cristalinidade foi necessária pouca energia para sua fusão. A influência do ácido sebácico nas propriedades térmicas da blenda de PCL/AS pode ser observada nas curvas de DSC. Na Figura 22A podem-se notar dois picos de aumento

endotérmico que equivalem às temperaturas de fusão do PCL e do AS. O outro gráfico (Fig.22B) mostra o pico endotérmico de duas proporções dos arcabouços da blenda de PCL/AS (90:10 e 80:20, % m/m). A avaliação de outras concentrações do arcabouço de PCL/AS encontra-se no capítulo 8 (Anexos – Fig. 61 e 64).

Na curva do arcabouço com maior proporção de ácido sebáico foi observada um primeiro pico na temperatura de fusão (T_m) do PCL e segundo pico próximo da T_m do AS. Os resultados das análises da blenda polimérica mostraram que as temperaturas de transição possuem diferenças significativas, além das porcentagens de cristalização (principalmente com o aumento na concentração de AS). Para o cálculo da porcentagem de cristalinidade foi utilizado como base de cálculo, a entalpia da policaprolactona completamente cristalina (100 %). O ΔH utilizado foi igual a 135 J/g. A diminuição da cristalinidade com a adição de ácido sebáico corrobora com resultados de Kesel e colaboradores (1999). Porém os pesquisadores utilizaram PCL e polivinilálcool (PVA). Apesar dos compostos possuírem uma temperatura de fusão ($T_m = 70\text{ }^\circ\text{C}$) e uma entalpia maior ($\Delta H = 90\text{ J/g}$), as blends de PCL/PVA e PCL/AS tiveram o percentual de cristalinidade semelhante (~65 %) (Kesel *et al.*, 1999).

Em copolímeros de poli(ácido láctico) (PLA) e policaprolactona observou-se a diminuição da entalpia do material ($\Delta H = 54\text{ J/g}$), porém a temperatura de fusão se manteve ($T_m = 67\text{ }^\circ\text{C}$) quando comparado ao PCL puro (Huang *et al.*, 2004). Provavelmente o fato das temperaturas de fusão do PLA e do PCL serem semelhantes não interferiu na fusão do material, porém alterou a organização das cadeias e o grau de cristalização do polímero.

O resultado obtido na DSC para o ácido sebáico foi semelhante ao relatado por Santos e colaboradores (1999), onde a T_m foi de $137\text{ }^\circ\text{C}$ e a entalpia do AS diminuiu à medida que o polímero foi misturado ao fumarato, conseqüentemente, a porcentagem de cristalinidade também diminuiu. Com isso, pode-se notar que a mistura de PCL e AS alterou a cristalinidade de ambos os polímeros, reduzindo a entalpia. Outro grupo de pesquisadores (Arvanitoyannis *et al.*, 1995) verificaram em trabalho realizado com PCL, AS e 1,6-hexanedmina os mesmos resultados de DSC obtidos pelos arcabouços deste trabalho (PCL/AS). Eles também verificaram um aumento na T_g e uma diminuição na entalpia e na T_m , com o aumento na concentração de ácido sebáico.

A maioria dos materiais poliméricos pode ser considerada como sólidos visco-elásticos que podem exibir propriedades tanto elásticas quanto viscosas. A análise dinâmico-mecânica (DMA) ajuda a elucidar as características visco-elásticas dos materiais e também gera informações de acordo com as propriedades físicas e de resistência mecânica dos compostos. Nas análises dinâmico-mecânicas das propriedades viscoelásticas (DMA) foi possível observar a influência do AS na redução do módulo elástico quando a concentração deste polímero aumenta. A temperatura de transição vítrea (T_g) dos arcabouços das blendas aumentou com a diminuição da concentração de PCL provavelmente devido à maior cristalinidade do AS (observado pelo tamanho da área do pico endotérmico durante a fusão), que dificultou a movimentação das cadeias poliméricas. Porém, a temperatura de fusão (T_m) dos arcabouços de PCL/AS é aproximada do resultado do PCL puro. Porém, a entalpia e a porcentagem de cristalinidade diminui à medida que se aumentou a proporção do ácido sebácico (Tab. 8).

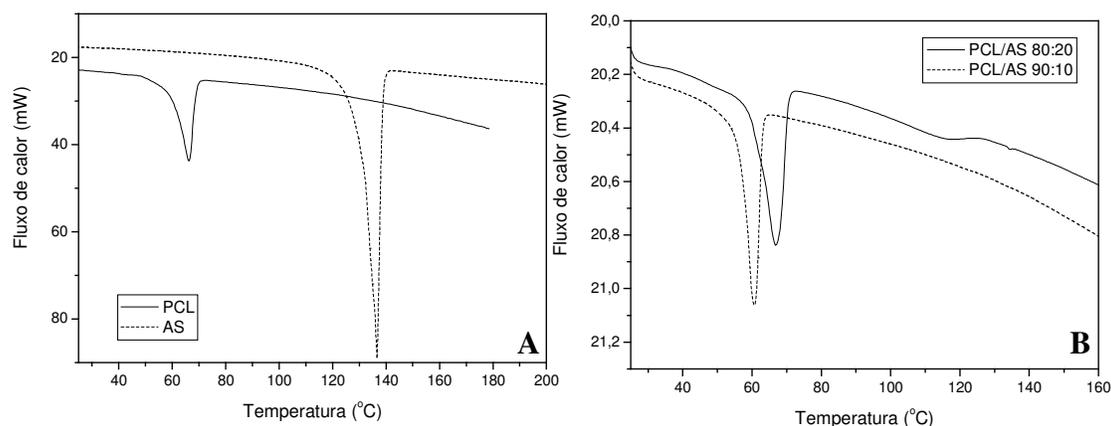


Figura 22: (A) Curvas de DSC do arcabouço de policaprolactona e ácido sebácico. (B) PCL/AS nas proporções 90:10 e 80:20 (% m/m).

Nas curvas de DMA da blenda de PCL/AS observa-se uma redução do módulo de armazenamento (E'). Provavelmente esse fenômeno foi observado pela menor deformação elástica do ácido sebácico. O ácido sebácico possui uma alta resistência mecânica, porém não se deforma, é um material frágil. Portanto, o módulo de armazenamento (E') da blenda tende a diminuir quando a concentração de AS aumenta (Fig. 23). Não houve diferença estatística no módulo de perda (E'') entre o PCL e a blenda 90:10 (% m/m) (Fig. 23B). Em trabalho de Chan &

Chun (2003) foram avaliados copolímeros de polietilenoglicol (PEG) e ácido sebácico (AS) por análise dinâmico-mecânica. Os resultados mostraram que a introdução de PEG no copolímero estudado reduziu a resistência mecânica do material. O declínio das propriedades mecânicas na temperatura de fusão fez com que o módulo de armazenamento (E') fosse reduzido também. Provavelmente, a menor elasticidade do PEG causou a redução de E' (Chan & Chun, 2003). A mesma resposta foi verificada com as análises da arcabouço de PCL/AS, onde O PCL com a adição do ácido sebácico teve o E' diminuído. Além disso, a presença do AS tornou o módulo de perda (E'') um pouco reduzido, porém sem diferença nas duas concentrações (10 e 20 %), tornando o material menos flexível.

Tabela 8: Análises de DSC e DMA dos arcabouços de PCL/AS com diferentes composições.

| Materiais | DMA | DSC | Entalpia (J/g) | Cristalinidade (%) |
|------------------|--------|--------|----------------|--------------------|
| | Tg(°C) | Tm(°C) | | |
| PCL (100 %) | -63,2 | 66,3 | 136* | 100* |
| AS (100 %) | 27,5 | 135,9 | 221 | - |
| PCL/AS (90:10 %) | -55 | 66,7 | 88 | 64,4 |
| PCL/AS (80:20 %) | -43,1 | 64,8 | 60 | 44,4 |

* Valores ideais considerando que o polímero fosse 100 % cristalino (Brandrup & Immergut, 1989).

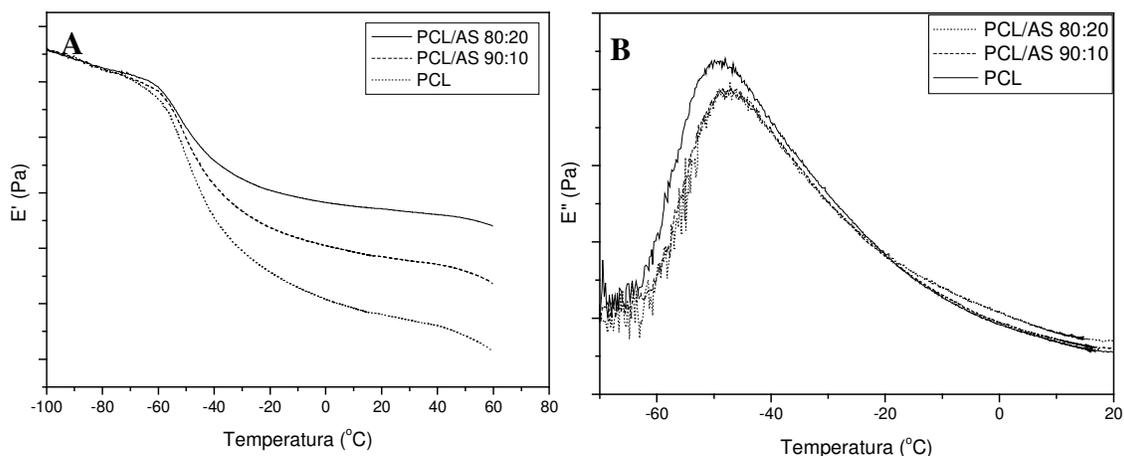


Figura 23: (A) Módulo de armazenamento (E') na análise de DMA com polímero puro de PCL e dos arcabouços das blendas com diferentes concentrações de AS (90:10 e 80:20 - % m/m) (E'). (B) Curvas de módulo de perda (E'') das mesmas amostras.

5.1.3 Análise das Propriedades Mecânicas

Na Tabela 9 é mostrada uma diminuição da resistência mecânica mediante a presença de ácido sebácico. O mesmo ocorreu com o módulo de elasticidade e o alongamento na ruptura. Isto significa que a composição da blenda se mostrou menos resistente quando foi aumentada a concentração do ácido sebácico no arcabouço. Semelhantes resultados de diminuição de resistência mecânica foram apresentados por Wang e colaboradores (2003) com arcabouços de policaprolactona e outros polímeros sintéticos como, poli(ácido lático) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) em diferentes proporções. Ambos os poliésteres avaliados possuíam características de baixa resistência mecânica à tração, porém eram polímeros amorfos. Diferentemente do ácido sebácico, que é um polímero semi-cristalino, que desfavorece a viscoelasticidade mediante a menor mobilidade das cadeia poliméricas.

Os resultados da avaliação de resistência mecânica à tração dos arcabouços da blenda de PCL/AS corroboram com as curvas de DMA. A redução das propriedades mecânicas foi proporcional ao aumento da concentração de AS no arcabouço (Tab. 9).

Tabela 9: Avaliação da resistência mecânica de PCL puro e arcabouços de diferentes composições da blenda com AS.

| Amostras | Tensão máxima (MPa)_{±DP*} | Alongamento Total na ruptura (%)_{±SD} | Módulo de Young (MPa)_{±DP*} |
|-------------------------|---|---|---|
| PCL (100 %) | 366 _{±22} | 11 _{±1} | 6570 _{±567} |
| PCL/AS (90:10 %) | 58 _{±10} | 3 _{±1} | 1648 _{±306} |
| PCL/AS (80:20 %) | 1 _{±0} | 1 _{±1} | 24 _{±4} |

* DP = desvio padrão.

Comparando os resultados da resistência mecânica a propriedades mecânicas do tecido ósseo (Tab. 10) pode-se observar que, tanto a força máxima (resistência à tração), quanto o alongamento a ruptura, do arcabouço de PCL/AS possui valores semelhantes aos do osso esponjoso (trabecular). Ponderando sobre estes resultados pode-se inferir que o biomaterial mantém as propriedades necessárias para a sua aplicação biológica embora seja o objetivo da blenda polimérica a sua mais rápida degradabilidade.

Tabela 10: Propriedades biomecânicas do osso (Murugan e Ramakrishna, 2005).

| Propriedades | Valores Medidos | |
|----------------------------|-----------------|----------------|
| | Osso cortical | Osso Esponjoso |
| Módulo de Young (MPa) | 14.000-20.000 | 50-500 |
| Resistência a tração (MPa) | 50-150 | 10-20 |
| Deformação na ruptura (mm) | 1-3 | 5-7 |

5.1.4 Tratamento de Superfície do Biomaterial

Na avaliação de ângulo de contato foi observado um aumento do ângulo na superfície dos arcabouços contendo AS, provavelmente devido a uma maior hidrofiliabilidade da superfície dos arcabouços (Tab. 11). Para viabilizar um possível tratamento de superfície do material visando um aumento na hidrofiliabilidade do material foi feito um tratamento com solução de NaOH por 24 h e a superfície foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fig. 24) e o ângulo de contato com água foi medido (Tab. 11). O objetivo de melhorar a dispersão de água pelo material é facilitar uma maior adesão protéica na superfície, facilitando a cultura de células, porém materiais muito hidrofílicos ou muito hidrofóbicos tendem a inibir a adsorção de proteínas e a adesão celular (Li *et al.*, 1999). A solução básica reduziu a hidrofobicidade, característica da policaprolactona. Uma explicação para este efeito é o fato da dispersão da água estar diretamente ligada a concentração de grupos (-OH) e de grupos ésteres do material. Além disso, a diferença entre a hidrofiliabilidade dos materiais pode estar correlacionada com o número de ligações ésteres da cadeia polimérica (tamanho e massa molecular) e a viabilidade destas como porções terminais do polímero (Rezwan *et al.*, 2006). Apesar de terem sido obtidos alguns resultados a maioria das análises não foi possível devido à dispersão da gota d'água na superfície do material (alta hidrofiliabilidade ou somente absorção pelos poros). Sabe-se que substratos com superfície muito irregular ou porosa não devem ser utilizados para análise nesta técnica, porém as análises dos arcabouços não tratados foram um pouco elucidativas quanto às características de hidrofiliabilidade destes materiais.

O tratamento dos arcabouços com solução alcalina não foi utilizado para as demais análises devido à grande friabilidade das amostras tratadas e foi observada uma menor resistência mecânica durante a manipulação dos materiais, sendo a sua aplicabilidade como material de

suporte de crescimento celular inviável. Os resultados das amostras tratadas foram pouco elucidativos e a metodologia abandonada.

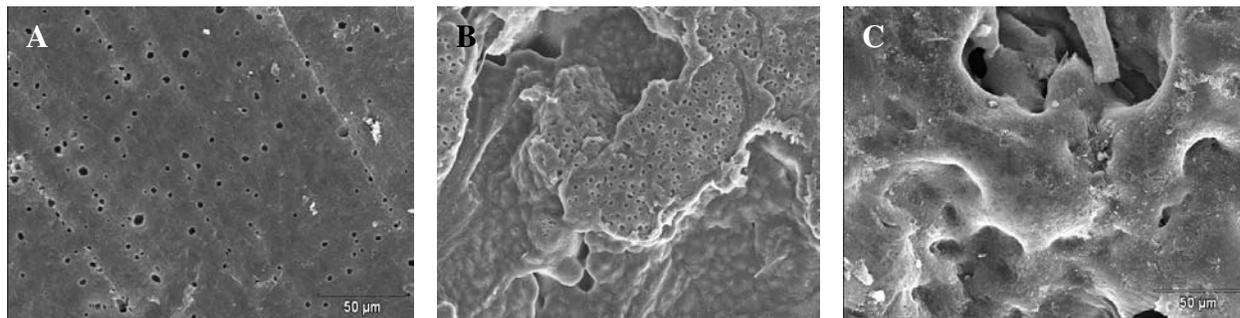


Figura 24: Micrografias dos arcabouços poliméricos tratados com solução de NaOH (0,1 M). (A) PCL puro. (B) PCL/AS 90:10 (% m/m), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m).

Tabela 11: Resultados de análise de ângulo de contato dos arcabouços de diferentes composições da blenda com e sem tratamento com NaOH por 24 h.

| Materiais | Sem tratamento (graus) | NaOH 0,5M (graus) | NaOH 0,1M (graus) |
|------------------|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PCL (100 %) | 75,2 | -* | -* |
| PCL/AS (90:10 %) | -* | -* | -* |
| PCL/AS (80:20 %) | 93,4 | -* | 94,5 |

* Resultados não mostrados na tabela devido à dispersão da água.

5.1.5 Biodegradação

Nas análises térmicas e mecânicas do biomaterial, tanto a policaprolactona (PCL) quanto o ácido sebácico (AS) foram avaliados separadamente e as blendas nas seguintes porcentagens 90:10 e 80:20 (% m/m). Com estas composições, foi realizada a degradação em PBS por 30, 60, 90 e 120 dias, e foram detectadas diferenças na superfície do material com o decorrer do tempo (MEV).

A degradação hidrolítica ocorre devido à cisão das cadeias poliméricas pela presença de grupos susceptíveis à reação com a água. Esta reação pode ser catalisada por ácidos, bases, sais ou enzimas. A hidrólise se caracteriza por ser um processo de passo único onde a taxa de quebra das cadeias poliméricas está diretamente ligada à estrutura química do material e à velocidade da

reação de polimerização (Schnabel, 1981). Outros fatores que aumentam ou não a susceptibilidade do polímero à degradação hidrolítica são a morfologia polimérica, as dimensões do material e o ambiente de degradação. Grupos funcionais como a carbonila e a hidroxila também são agentes facilitadores da degradação do biomaterial, porque facilita a interação destas cadeias com as moléculas de água (Ratner *et al.*, 1995).

Nos ensaios de degradação foi utilizada solução salina tamponada à base de fosfato (PBS). Observa-se que a aceleração na perda da massa molecular está relacionada com o aumento na porcentagem de AS na composição da blenda. Após 8 semanas de degradação houve perda de aproximadamente 2 % da massa da arcabouço (Fig. 25). Porém, a taxa de degradação diminuiu com 12 semanas de incubação do PCL puro. Provavelmente este fato ocorreu porque o PCL é um polímero semi-cristalino e a fase cristalina torna mais lenta a taxa de degradação. Este fenômeno pode ser observado nas micrografias (MEV) pela presença da estrutura estriada na superfície (áreas esbranquiçadas e com formato de teias) (Fig. 26). Sabe-se que a degradação do PCL ocorre preferencialmente na fase amorfa do material, e como resultado observou-se partículas de fase cristalina restantes após 16 semanas de degradação. Resultados semelhantes foram obtidos por Chen e colaboradores (2000) na avaliação da degradação do PCL puro. A forma e o tamanho dos esferulitos da fase cristalina influenciam no movimento das moléculas modificando a taxa de degradação (Sun, *et al.*, 2006). Na Figura 25 pode-se observar uma perda de massa dos arcabouços de PCL/AS com semelhantes resultados entre as diferentes composições e o PCL puro. Além disso, foi observada uma perda de massa dos arcabouços de PCL/AS com tendência a aumentar após 120 dias, porém sem diferença estatística entre os períodos de tempo observados. Esta explicação foi corroborada com as avaliações de MEV, onde aparecem poros na superfície do material, porém na avaliação da blenda com 10% de AS, a perda de material e formação de poros aumentou com o decorrer do tempo (Fig. 26). Após 120 dias foi possível visualizar este aumento e a ampliação do tamanho dos orifícios. Todos estes dados obtidos podem estar vinculados a perda do ácido sebácico que ocorre rapidamente (aproximadamente 30 dias), o fato de este polímero ser parcialmente solúvel em água favorece a sua remoção pela solução salina, aumentando a degradação. Apesar disto a perda de massa observada foi inferior a 4 % no arcabouço com 20 % de AS após 120 dias (Fig. 25).

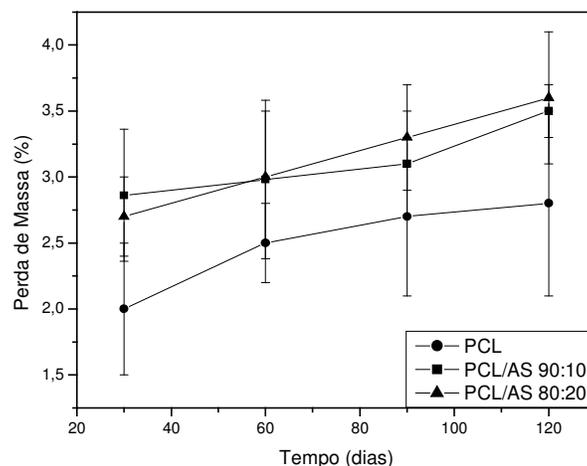


Figura 25: Curvas de perda de massa dos arcabouços da blenda de PCL/AS incubadas em solução salina (PBS) por diferentes períodos de tempo. Análise estatística *t student* $p < 0,05$.

5.1.6 Citotoxicidade do Arcabouço da Blenda Polimérica

Segundo Ratner e colaboradores (1995), um material tóxico é definido como um composto que libera um componente químico em quantidade suficiente para matar qualquer célula diretamente ou indiretamente (inibição de controle metabólico). O número de células afetadas é um indicativo da dosagem e potência do agente tóxico. O ensaio de contato direto tem como objetivo quantificar microscopicamente a quantidade de células vivas e mortas e a morfologia celular. Se as células apresentarem vacúolos ou uma diminuição na aderência à placa de cultura, dependendo da porcentagem o biomaterial pode ser considerado tóxico (Anderson *et al.*, 2004). Na análise de citotoxicidade, os arcabouços não induziram morte celular em cultura de linhagem de osteoblastos (MG63) (Tab. 12). Usualmente, a toxicidade dos solventes utilizados na preparação dos arcabouços das blendas poliméricas pelo método de evaporação de solvente funciona como um fator limitante na aplicação como biomaterial para implante. Os arcabouços de PCL/AS se mostraram não tóxicos, tanto nos ensaios de contato direto, quanto nos de contato indireto em cultura de MG63.

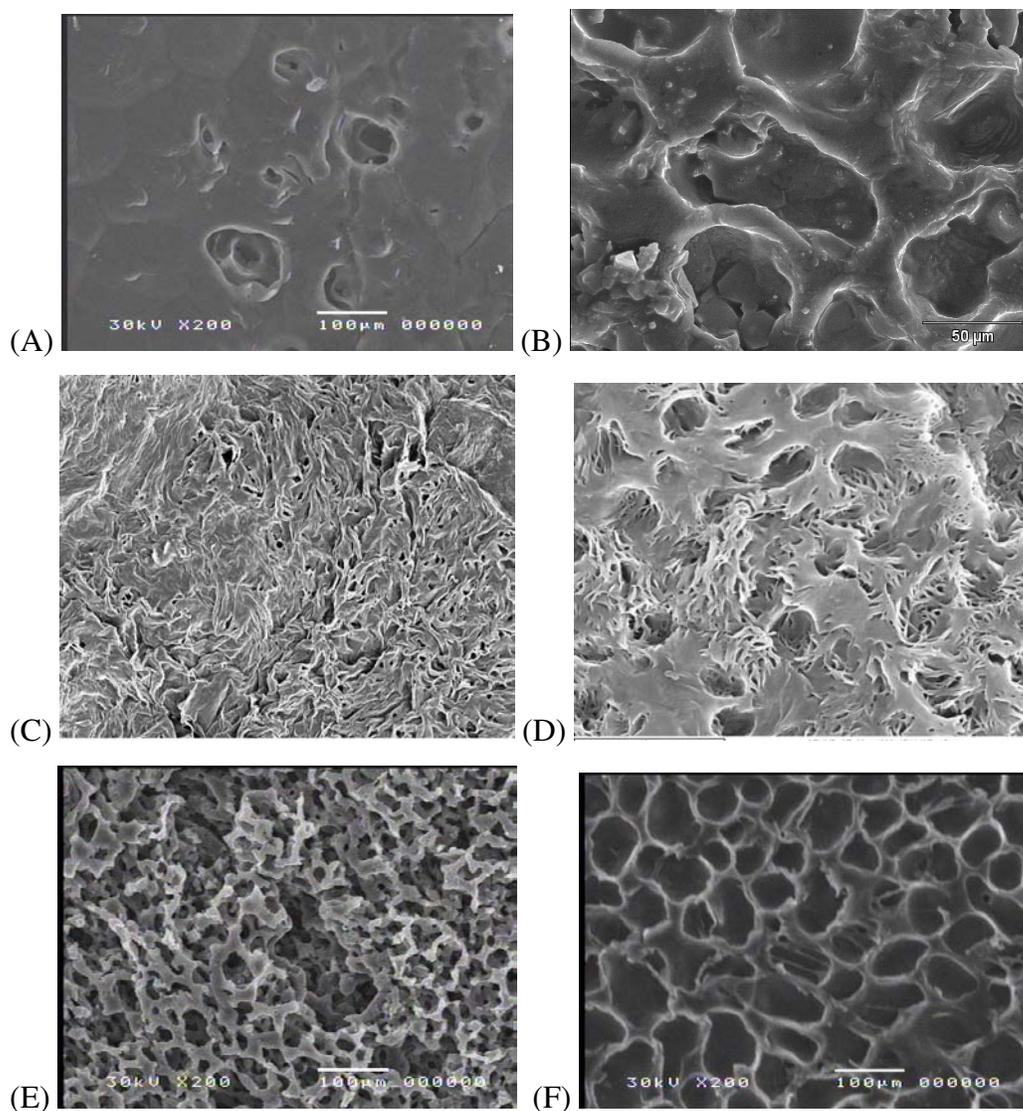


Figura 26: Arcabouços de PCL/AS (80:20, % m/m) após 30, 90 e 120 dias de degradação em PBS a 37°C (A, C e E). Degradação (30, 90 e 120 dias) do arcabouço da blenda de PCL/AS (90:10, % m/m) em PBS a 37°C (B, D e F).

Tabela 12: Análise de contato direto de células MG63 incubadas com arcabouços de PCL/AS de diferentes composições.

| Amostras | Índices de zona* | Morte celular* |
|------------------|------------------|----------------|
| PCL (100 %) | 0 - nenhum | 0 - nenhum |
| PCL/AS (90:10 %) | 0 - nenhum | 0 - nenhum |
| PCL/AS (80:20 %) | 0 - nenhum | 0 - nenhum |

*Índices segundo a tabela da ISO 10993-5.

A Figura 27 mostra a viabilidade celular em osteoblastos no teste do MTT. Os dados estão apresentados em porcentagem relativa ao controle negativo, onde não foi incubado nenhum material, há somente a presença da placa de cultura celular (poliestireno). Este resultado foi utilizado como 100 % de viabilidade celular e aplicado na seguinte equação (3):

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (N_t/N_c) \times 100 \quad (3)$$

onde N_t é a densidade óptica verificada pelo grupo das arcabouços poliméricas e N_c a densidade óptica verificada pelo grupo do controle negativo (poliestireno). A viabilidade celular do grupo dos arcabouços de PCL/AS se mostrou superior a 90 % em todas as amostras do contato indireto (Fig. 27). Resultados semelhantes foram obtidos por Le Ray e colaboradores (2003) utilizando discos de PCL puro em contato direto com fibroblastos (L929), que relataram a porcentagem de viabilidade celular acima de 95 %.

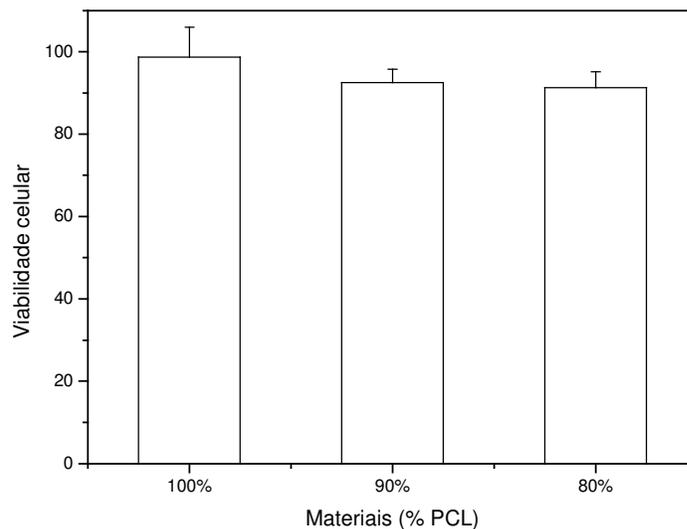


Figura 27: Viabilidade celular do arcabouço de PCL-AS em osteoblastos humanos (MG63) em ensaio de metabolismo celular (MTT) por 72 h. Análise estatística *t student* $p < 0,05$.

5.1.7 Medida da Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

Para a diferenciação de células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) foi utilizado o meio de cultura específico para células mesenquimais suplementado com dexametasona e ácido ascórbico para induzir a diferenciação das células-tronco em osteoblastos ao longo de 15 dias. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi utilizada como um marcador de diferenciação celular. Não houve diferença significativa nos resultados de viabilidade celular e de atividade ALP na presença ou não dos arcabouços nas diferentes composições de PCL/AS (Fig. 28).

Também foi medida a viabilidade celular das mesenquimais (hMSC) pelo ensaio do azul de Alamar (resazurina). As células mesenquimais se mostraram sensíveis a adição de solução de MTT e se descolaram do fundo da placa, inviabilizando a medida da viabilidade celular. Como a resazurina também é metabolizada nas mitocôndrias das células e produz resultados semelhantes ao ensaio do MTT, a viabilidade das células mesenquimais foi quantificada pelo método do azul de Alamar. Não houve diferença estatística entre a cultura de hMSC com e sem a presença das arcabouços com diferentes composições, a viabilidade celular foi superior a 90 %, sendo todas as amostras analisadas citocompatíveis com a cultura destas células (Fig. 28).

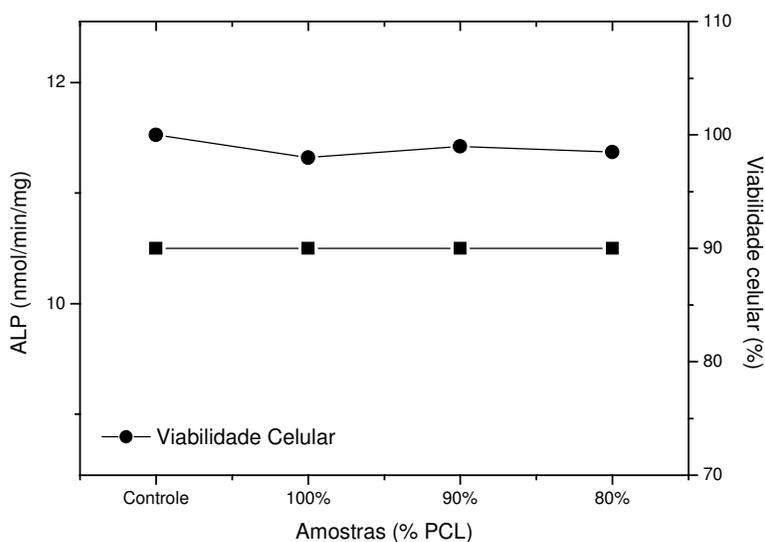


Figura 28: Viabilidade celular e atividade de ALP (fosfatase alcalina) de células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) em contato com diferentes concentrações das arcabouços de PCL/AS por 15 dias. Análise estatística *t student* $p < 0,05$.

5.1.8 Avaliação Morfologia e Proliferação Celular (MEV e Confocal)

Outro parâmetro que deve ser avaliado na análise da biocompatibilidade de biomateriais é a adesão celular. Os arcabouços foram incubados com osteoblastos (MG63) durante 7 dias. Depois a cultura foi fixada e as amostras avaliadas por MEV. Não foram utilizadas as células mesenquimais porque houve um desprendimento da camada celular durante a aplicação do vácuo para metalização e avaliação das amostras.

Os resultados se mostraram semelhantes aos de citotoxicidade direta, onde não houve diferença na morfologia e taxa de proliferação da cultura das células nos diferentes materiais avaliados (Fig. 29 A-C). Tanto a policaprolactona pura, quanto as blenda de PCL/AS 90:10 e 80:20 (% m/m) se mostraram citocompatíveis. Os osteoblastos mostram morfologia normal e estão espalhados na superfície do arcabouço (Fig. 29D). As células estão em contato umas com as outras e com aspecto favorável à proliferação. Em algumas amostras, a individualização celular ficou comprometida por um fato positivo, houve a formação de uma monocamada celular aderente à superfície. Em alguns materiais, a camada celular se despreendeu da superfície devido ao vácuo necessário para análise, (Fig. 29B e C).

Resultados semelhantes foram apresentados por Coombes e pesquisadores (2004) com a incubação de osteoblastos humanos (HOB) na presença de membranas de PCL e policaprolactona/hidroxiapatita (PCL/HA). As células apresentavam-se aderidas, achatadas e espalhadas por toda a superfície do arcabouço. Outros autores também mostram resultados semelhantes com outros tipos celulares, com isso pode-se dizer que a policaprolactona favorece a adesão celular e a formação de uma camada de células em toda a superfície do material (Kirkpatrick & Deeker, 1992; Mayer *et al.*, 1993; Boyan *et al.*, 1996; Saltzman, 2000).

As avaliações por microscopia confocal mostraram que em ambas as diferentes blendas de PCL/AS houve adesão e espalhamento de células osteoblásticas (MG63) e no decorrer do tempo de incubação foi possível visualizar a proliferação e o agrupamento de colônias celulares. Outro fator importante foi o total encobrimento da superfície do material com a monocamada celular

após 10 dias de incubação. Pode ser visto também o preenchimento das superfícies dos poros, com visível intercomunicação celular (Fig. 30).

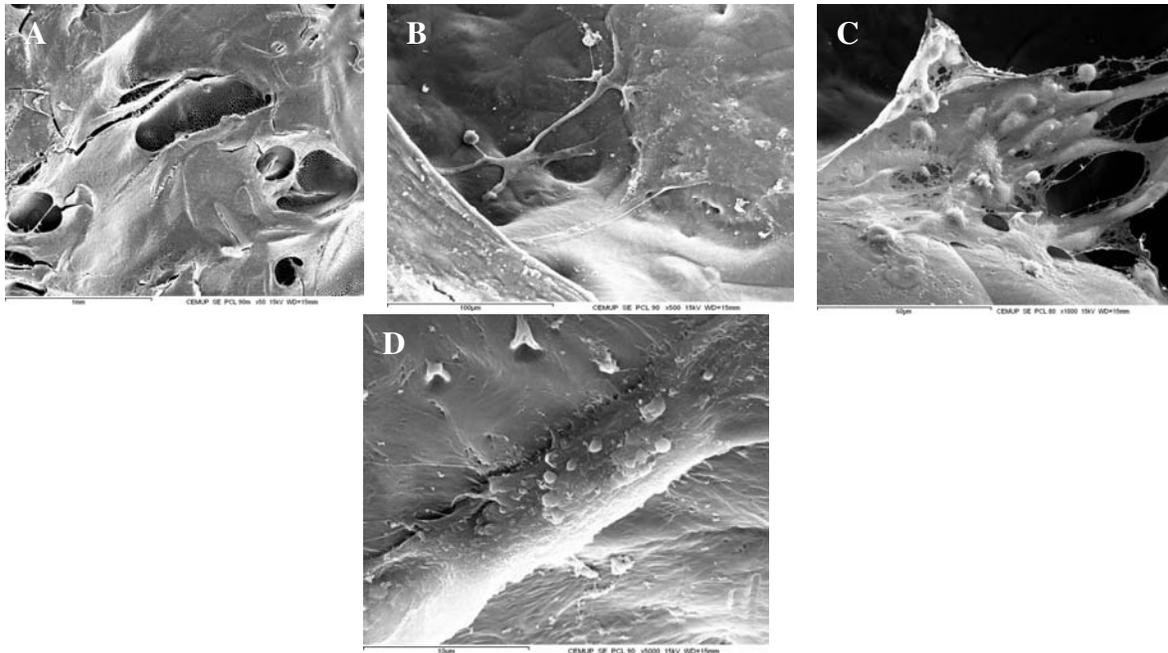


Figura 29: Micrografias dos arcabouços porosas poliméricas incubadas com osteoblastos (MG63) por 7 dias. (A) Arcabouço de PCL puro. (B) PCL/AS 90:10 (% m/m), (C) PCL/AS 80:20 (% m/m) (500x). (D) Ampliação e detalhes da morfologia celular na superfície do arcabouço de PCL/AS 90:10 (% m/m).

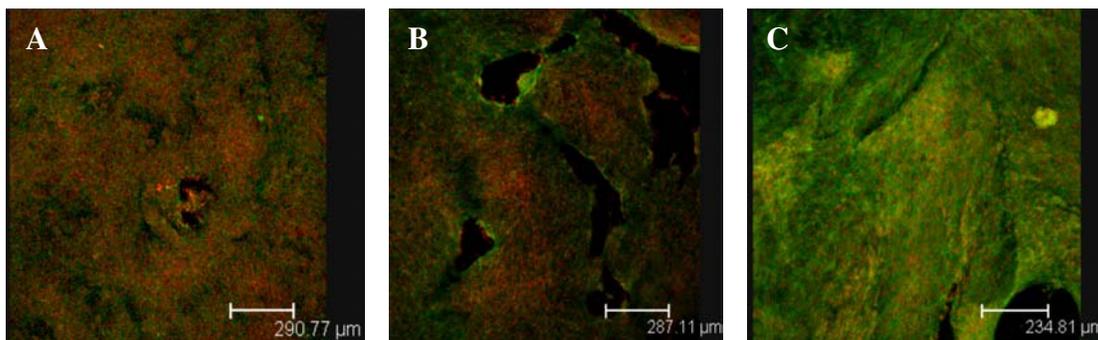


Figura 30: Microscopia confocal dos arcabouços de PCL puro, PCL/AS 90:10 e 80:20 (% m/m) (A, B e C, respectivamente) incubado com osteoblastos humanos (MG63) por 10 dias.

5.1.9 Histologia Ratos Wistar com Implantes Subcutâneos

Com o objetivo de avaliar se os resultados positivos dos ensaios *in vitro* seriam reprodutíveis *in vivo*, foram implantados discos dos arcabouços de 0,8 cm de diâmetro no dorso posterior dos ratos. Os implantes permaneceram nos animais durante 30 e 60 dias (Fig. 31A-F). Este local foi escolhido pela grande vascularização do tecido subcutâneo, a grande capacidade de regeneração celular e a presença de células de defesa como macrófagos. Após a implantação, o tecido adjacente incorporou os arcabouços e notou-se a presença de uma fina camada de colágeno ao redor do material (Fig. 31A-C). Tanto o arcabouço de policaprolactona pura, quanto o da blenda de PCL/AS 90:10 (% m/m) apresentaram-se com aspecto claro e o tecido com a aparência normal (semelhante à área sem a presença do biomaterial). Porém, no arcabouço de PCL/AS 80:20 (% m/m), pode-se observar uma maior vascularização no interior do implante, pelo aspecto avermelhado do material, provavelmente devido a uma intensa neovascularização do material. O tecido circunvizinho ao biomaterial mostra aspecto normal. Macroscopicamente, não houve diferenças nos arcabouços e no tecido após 60 dias de implantação. Também não foi observada nenhuma degradação superficial (Fig. 31D-F). O fato do ácido sebácico se dissolver em ambientes aquosos pode ter estimulado a maior formação de tecido e uma melhor vascularização.

As análises histológicas dos arcabouços mostrados anteriormente foram realizadas em microscópio óptico e os tecidos foram corados por hematoxilina e eosina (HE). No implante do arcabouço de PCL, após 30 dias, foi observada uma cápsula fibrosa ao redor de todo o implante com a presença de fibroblastos, ligeiro infiltrado inflamatório de células mononucleadas (macrófagos, principalmente), vasos sanguíneos hiperemiados (cheios de hemácias) e muitas células gigantes. O tecido adjacente ao implante possuía aspecto normal sem a presença de necrose ou abscesso (Fig. 32 e Tab. 13). Semelhante resultado ocorreu no arcabouço de PCL/AS 80:20 (% m/m), porém a cápsula fibrosa se encontrava mais delgada e havia presença de tecido conjuntivo frouxo no interior do material. Diferentemente, o arcabouço 90:10 (% m/m) mostrou a presença de delgada cápsula fibrosa com poucas células inflamatórias e algumas células gigantes. Havia crescimento de tecido conjuntivo frouxo em toda a superfície e interior do arcabouço, com a presença de muitos fibroblastos. Notou-se a presença de vasos neoformados que possuíam morfologia normal. Houve integração entre o material e o tecido adjacente ao implante. Ambos

os implantes das blendas mostraram uma melhoria de integração com o tecido circunvizinho quando comparado ao PCL puro. Pode-se inferir pelas imagens que quanto maior a concentração de AS, maior a formação de tecido na periferia do implante e melhor a revascularização deste tecido neoformado.

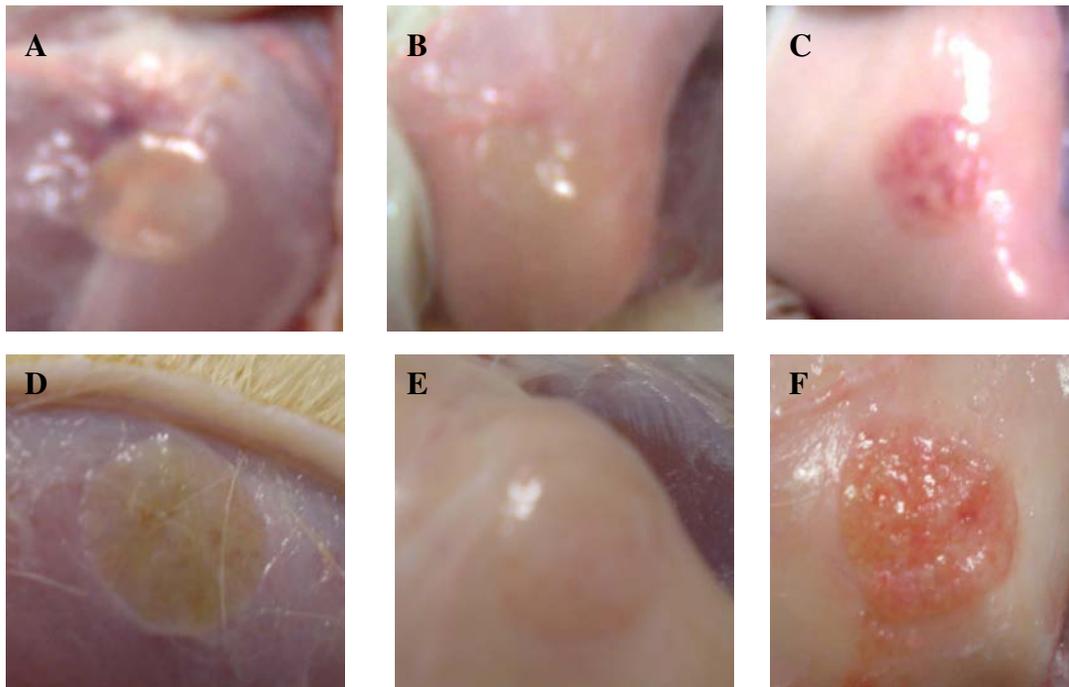


Figura 31: Fotografias de implantes subcutâneos dos arcabouços porosos da blenda de PCL/AS após 30 e 60 dias. (A e D) PCL puro. (B e E) PCL/AS 90:10 (% m/m). (C e F) Blenda 80:20 (% m/m).

Jameela e colaboradores (1997) utilizaram microesferas de PCL puro e verificaram uma leve reação inflamatória no tecido periférico ao material em ratos. Porém, esta reação foi significativamente menor que a induzida por PLA e PGA, que geram um ambiente extremamente ácido durante a sua degradação (Gopferich, 1997). Este tipo de reação não é observado durante a degradação da policaprolactona. Segundo Rodriguez e colaboradores (2008) em respostas de corpo estranho a implantes de materiais em ratos existem a presença de macrófagos e células gigantes. Este tipo de resposta ocorre quando o material é hidrofóbico e estas células persistem aderidas à superfície do implante, quanto mais hidrofílica ou neutra eletricamente, menor a atividade e adesão das células inflamatórias (Jones *et al.*, 2007). Contudo a resposta de corpo

estranho em implantes avaliados pelo grupo (elastano, polietilenotereftalato e polietiluretano) só foram observadas a partir de 21 dias (Rodriguez *et al.*, 2008).

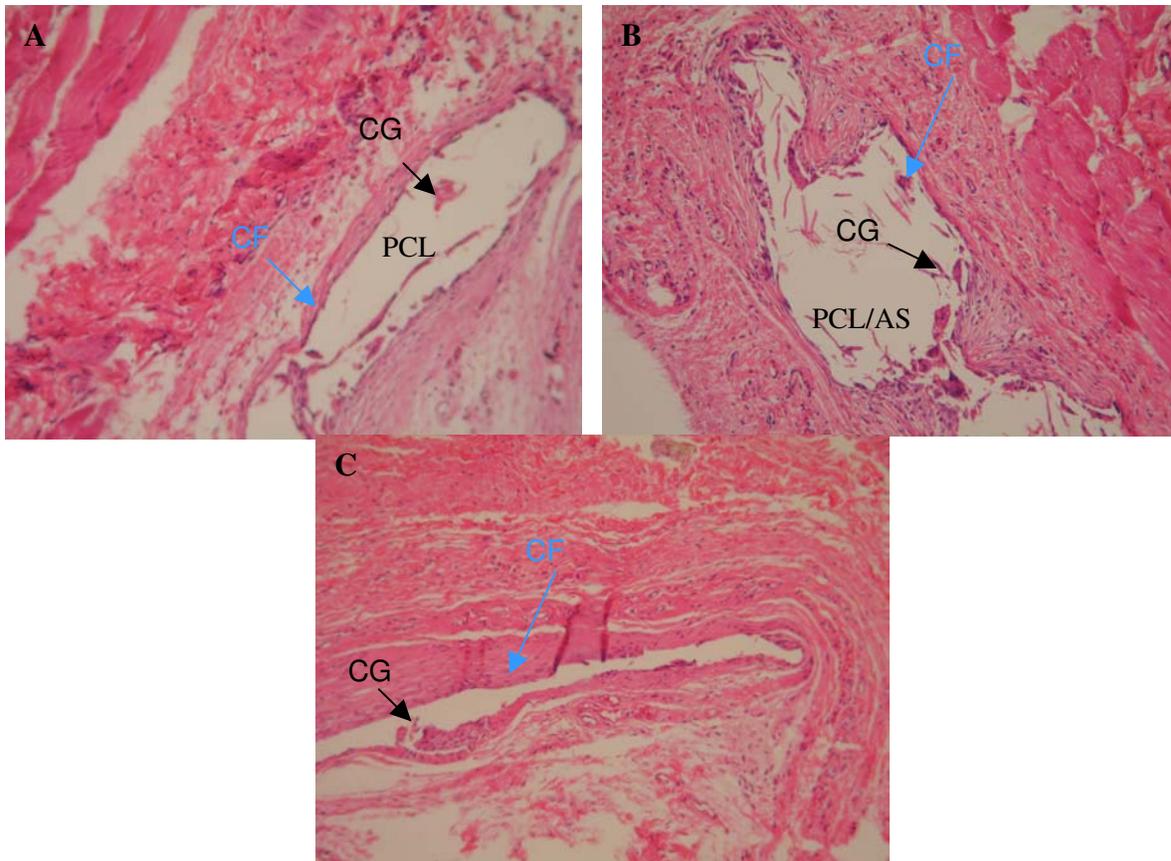


Figura 32: Implantes dos arcabouços após 30 dias. Tecido processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) PCL puro (10x). (B) PCL/AS 80:20 (% m/m) (10x). (C) PCL/AS 90:10 (% m/m) (10x). As setas azuis apontam a cápsula fibrosa (CF) e as setas pretas mostram as células gigantes (CG). O espaço vazio nas imagens refere-se à presença do material que é removido durante o processamento.

Após 60 dias não houve grandes modificações em todos os grupos, exceto pelo aumento na espessura da cápsula fibrosa dos grupos do arcabouço só de PCL e com ácido sebácico a 20 %. Também, nos mesmos grupos, houve diminuição no número de células inflamatórias, mas foram também observadas algumas células gigantes (Fig. 33 e Tab. 13).

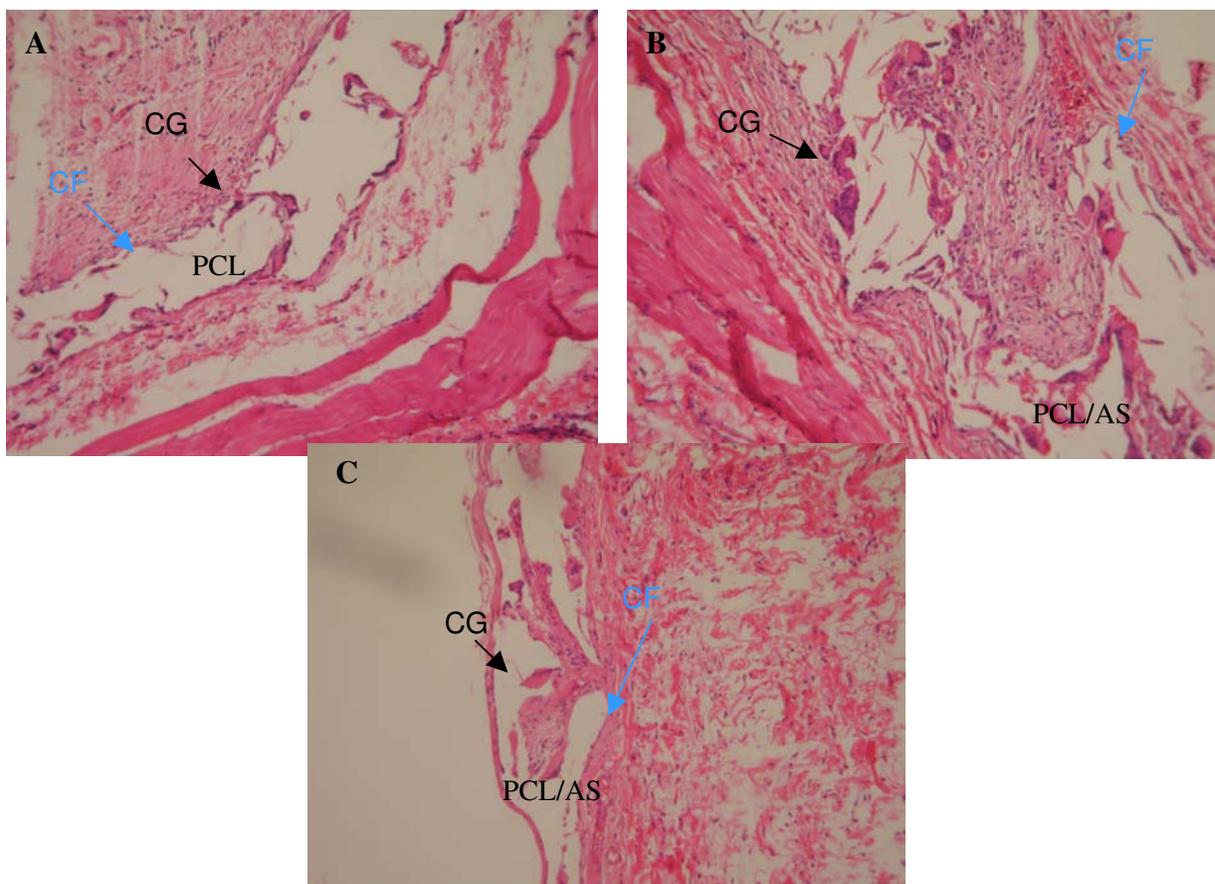


Figura 33: Implantes dos arcabouços após 60 dias. Tecido processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) PCL puro (10x). (B) PCL/AS 80:20 (% m/m) (10x). (C) PCL/AS 90:10 (% m/m) (10x). As setas azuis apontam a cápsula fibrosa (CF) e as setas pretas mostram as células gigantes (CG). O espaço vazio nas imagens refere-se à presença do material que é removido durante o processamento.

Tabela 13: Resultados histopatológicos dos implantes dos arcabouços de PCL/AS.

| Análise <i>in vivo</i> | PCL | | PCL/AS 90:10 (% m/m) | | PCL/AS 80:20 (% m/m) | |
|--|---------|---------|-------------------------|---------|-------------------------|---------|
| | 30 dias | 60 dias | 30 dias | 60 dias | 30 dias | 60 dias |
| Histopatologia | | | | | | |
| Espessura da cápsula (mm) ^a | 0,05 | 0,1 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,1 |
| Presença de tecido necrótico ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Presença de células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) ^b | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| Grau de maturação do tecido conjuntivo ^b | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Presença de resposta de corpo estranho (células gigantes) ^b | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |

^a Análise quantitativa.

^b Análise qualitativa.

Diante dos resultados observados nas análises histológicas pode-se inferir que de acordo com as características dos materiais ocorrem diferentes processos durante a cicatrização dos implantes. Caso o material seja hidrofóbico, ocorre a agregação de proteínas na superfície e estas promoverão a adesão de células. As primeiras células a migrarem para a região do implante são as células de defesa como macrófagos e neutrófilos. Estes macrófagos aderidos tentariam fagocitar partículas do material, caso não seja possível estas células se agregam formando células gigantes. Estas células secretam citocinas que estimulam a migração de fibroblastos para a região do implante que formam uma cápsula fibrosa (Colágeno tipo I) ao redor do material. Caso o material seja hidrofílico as proteínas que aderem à superfície seriam diferentes, o que não promoveria a adesão dos macrófagos. Com isso, outras células aderem na superfície e ocorre a integração do tecido ao material (Fig. 34).

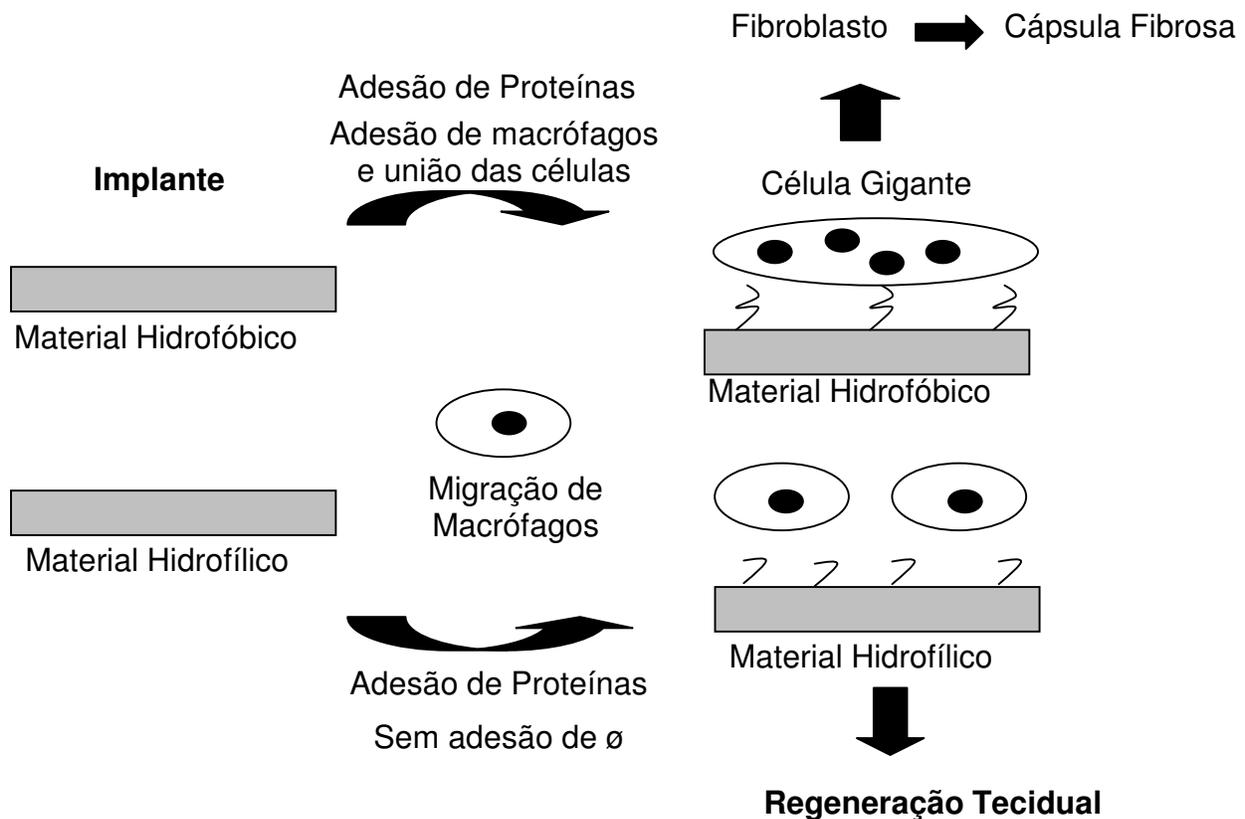


Figura 34: Desenho esquemático de sequência de eventos após a implantação de materiais em tecido subcutâneo de animais.

5.2 Gel da blenda de PCL/AS

Os materiais injetáveis têm sido muito pesquisados recentemente com o objetivo de sua utilização na engenharia tecidual. E tem como característica principal, ser um método menos invasivo por utilizar somente uma seringa comum para implantação do biomaterial. Para o paciente, o uso de sistemas injetáveis pode oferecer vantagens, como a não utilização de procedimentos cirúrgicos invasivos, o preenchimento facilitado de defeitos irregulares e a diminuição de possíveis complicações pós-cirúrgicas. Outro fator favorável ao uso destes materiais seria a fácil incorporação de agentes ativos solúveis durante a mistura dos polímeros antes da injeção do material, podendo facilmente solucionar problemas de adesão e proliferação celular (Payne *et al.*, 2002). Para essa finalidade foi realizada uma reticulação de policaprolactona de alta massa molecular com policaprolactona diol de baixa massa molecular. Para acelerar a degradação *in vivo* foi utilizado o ácido sebácico de baixa massa molecular. Para facilitar a reticulação foi utilizada uma solução salina a base de cloreto de cálcio a uma temperatura de 60 °C e todo o processo deve terminar dentro do tecido vivo, gerando uma matriz resistente mecanicamente com as propriedades viscoelásticas desejadas.

Devido aos resultados anteriores da caracterização dos arcabouços de diversas composições de policaprolactona e ácido sebácico, optou-se por tentar confeccionar em gel as blendas de PCL/AS com 90:10 e 80:20 (% m/m). Porém, a alta cristalinidade do ácido sebácico aumentou a viscosidade do gel formado, o que pode dificultar a sua introdução no corpo humano por meio de uma seringa comum. Para formulação de um gel de PCL/AS com baixa viscosidade a concentração de ácido sebácico teve que ser reduzida para 5 %. No intuito de melhorar a dispersão do AS na massa de PCL, foram adicionados surfactantes como Triton X-100 (Sigma), Tween 80 (Sigma) e Spam 60 (Merck) na concentração de 0,05 a 1 % da massa polimérica total. Estes surfactantes foram escolhidos devido a citação em trabalhos da literatura estudada (Jamela *et al.*, 1997; Jabbari *et al.*, 2005) Contudo, apesar da melhoria das propriedades como, fluidez, viscoelasticidade e porosidade e degradabilidade do material, nos ensaios de citotoxicidade, tanto direta quanto indireta, houve uma alta mortalidade celular, sendo os materiais considerados citotóxicos. Foi medido o pH da solução que manteve os materiais incubados por 24 h e foram observados valores inferiores a 6. Esta condição de pH inviabiliza a cultura de células, aumentando a morte celular.

Foi verificada a capacidade de injectabilidade do gel por uma seringa comum e verificou-se que a concentração de macromolécula de poli(ϵ -caprolactona) deveria ser de 30 % (% m/V). Com a ausência de surfatantes o gel se tornou mais viscoso, sendo necessária uma alta concentração de PCL diol de baixa massa molecular, uma vez que não se pode aumentar o volume de solvente por causa da sua toxicidade em cultura de células. Assim, o PCL com menor peso molecular se tornaria menos viscoso e mais fácil de ser manuseado por uma seringa comum.

Portanto, após várias tentativas de melhorar a composição do gel da blenda de PCL/AS, as análises mais favoráveis para sua utilização como material injetável foram do composto 95:05 (% m/m), com 30 % de PCL de alta massa molecular, 65 % de PCL diol, 5 % de ácido sebácico, sem a adição de surfatantes. Os resultados deste trabalho, que será detalhado a seguir, geraram uma patente brasileira (PI 018080059526). Os resultados das análises do gel são mostrados no próximo item.

5.2.1 Morfologia de Superfície Avaliada por Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura

O objetivo da análise por microscopia óptica é visualizar a formação da fase cristalina dos polímeros semi-cristalinos, policaprolactona e ácido sebácico. Na imagem observa-se a formação dos esferulitos que seriam o arranjo de cristalitos dispostos ordenadamente em relação a um núcleo. Entre os cristalitos existe a região amorfa, formando assim uma fase contínua das cadeias poliméricas (Manrich, 2005).

A Figura 35 mostra as análises por microscopia óptica de policaprolactona pura e do gel de PCL/AS. Os resultados das avaliações da superfície das diferentes composições do gel de PCL/AS mostraram que houve pouca formação de fase cristalina (esferulitos), havendo em sua maioria, uma fase amorfa com pontos cristalinos devido à presença do AS (Fig. 35). Estes resultados foram também observados por MEV onde são visualizadas projeções poliméricas (AS) interligadas por polímero amorfo (PCL) (Fig. 36). Em alguns pontos da superfície é possível notar alguns esferulitos de PCL, porém muito pequenos (Fig. 35).

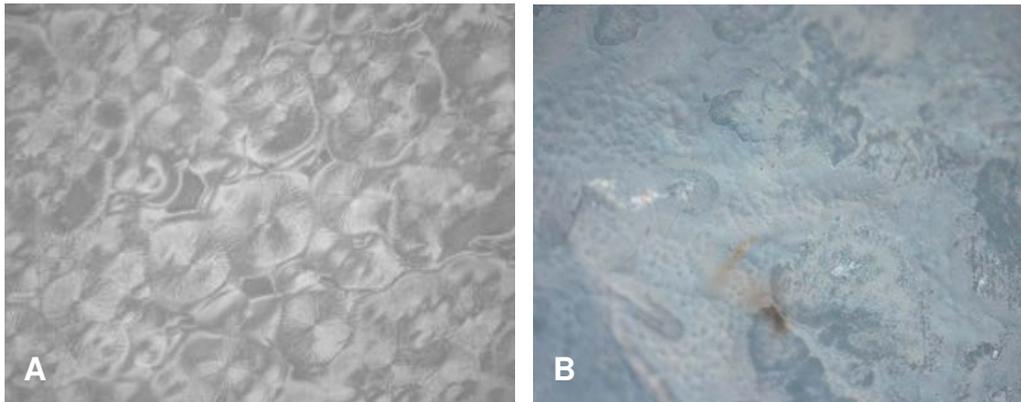


Figura 35: (A) Microscopia óptica do arcabouço de PCL puro. (B) Microscopia óptica do gel da blenda de PCL/AS 95:05 (% m/m).

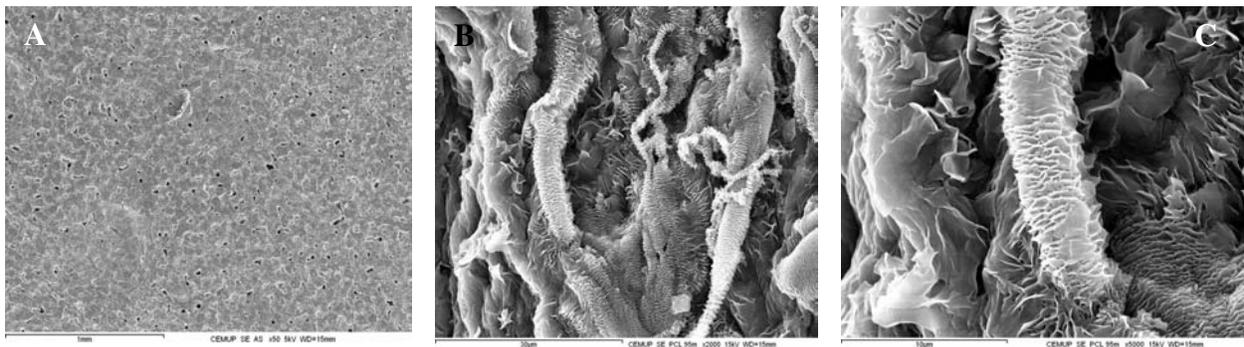


Figura 36: (A) Microscopia da superfície do gel de PCL/AS (95:05 % m/m) seco em temperatura ambiente por 24 h. (B) Linhas de conformação do gel após ser injetado por uma seringa comum. (C) Linhas de fluxo do material após injeção.

5.2.2 Caracterização das Propriedades Térmica e Dinâmico-Mecânica

Para obter a caracterização térmica e dinâmico-mecânica da blenda de PCL/AS em forma de gel, as amostras foram secas em temperatura ambiente por 24 h, formando filmes e analisadas em DSC e DMA. A formulação em gel não alterou termicamente e mecanicamente a estrutura da blenda polimérica. As diferenças mais marcantes foram a diminuição da fase cristalina do PCL (DSC – Fig. 37B e Tab. 14), comparado com o PCL puro e com as diferentes formulações dos arcabouços (por evaporação de solvente). O pico observado em aproximadamente 60 °C

corresponde à temperatura de fusão do polímero. A área do pico está relacionada à quantidade de energia que o material necessita para mudar de fase, no caso, por ser um polímero semicristalino com baixo grau de cristalinidade, foi necessária pouca energia para sua fusão. A linha tracejada corresponde à análise do ácido sebácico. Para esse polímero foi realizado um aquecimento de 20 a 250 °C. O pico observado em aproximadamente 135 °C, corresponde também a temperatura de fusão. No caso deste material semi-cristalino com alta taxa de cristalinidade pode-se observar uma grande energia consumida para ser realizada a transição de fase.

A Figura 37B corresponde à análise da blenda de PCL/AS de 20 °C a 200 °C, onde observa-se o pico na mesma temperatura do polímero de PCL puro (Fig. 37A), porém foi necessária menor energia para ocorrer a fusão do biomaterial. Comparando os materiais, foi observado que o ácido sebácico tem uma maior cristalinidade e uma alta temperatura de fusão. Contudo, a policaprolactona possui uma menor temperatura de fusão, o que favorece o processamento da blenda em laboratório. Sendo a manipulação do PCL/AS mais fácil e mais econômica. Estudos de Kweon e colaboradores (2003), utilizando PCL (macromolécula) de vários tamanhos de cadeia, observaram a redução da cristalinidade, entalpia e temperatura de fusão com o aumento da massa molecular da policaprolactona. O oposto ocorre quando o PCL era diol, foi mostrado um aumento na cristalinidade, entalpia e temperatura de fusão. Porém, quando o polímero era produzido em forma de arcabouço sintético a partir da macromolécula, foi observada uma diminuição em todos os parâmetros avaliados (T_m , ΔH_f e %C). Com isso, observa-se que no gel de PCL/AS, a reticulação pode ter favorecido o abaixamento da T_m , da entalpia e da porcentagem de cristalinidade. Na análise do gel observou-se pouca influência do ácido sebácico na blenda devido a sua baixa concentração (Tab. 14 e Fig. 37).

Tabela 14: Análises de DSC e DMA do gel da blenda de PCL/AS com diferentes composições.

| Materiais | DMA | DSC | Entalpia (J/g) | Cristalinidade (%) |
|------------------|--------|--------|----------------|--------------------|
| | Tg(°C) | Tm(°C) | | |
| PCL (100 %) | -63 | 63 | 136 | 100,0 |
| AS (100 %) | 28 | 136 | 221 | - |
| PCL/AS (95:05 %) | -34 | 60 | 57 | 42 |

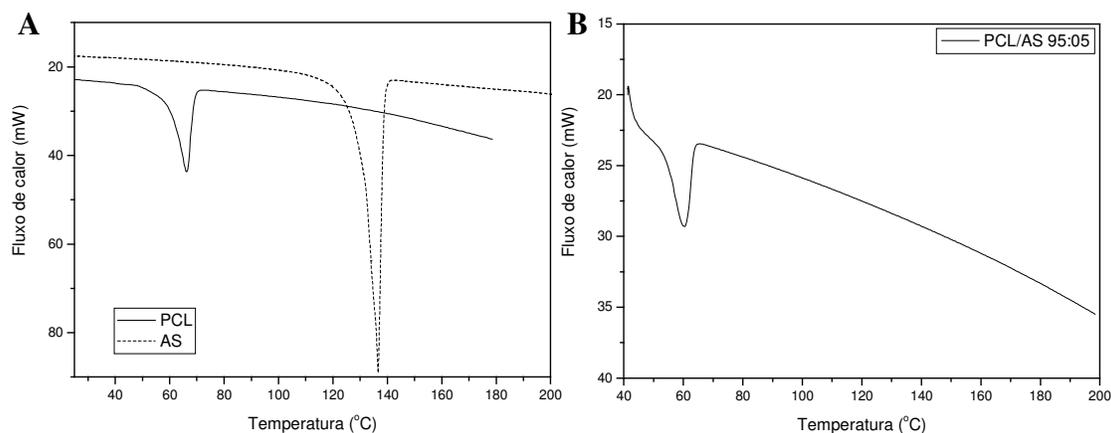


Figura 37: (A) Curvas de DSC de policaprolactona (PCL) e do ácido sebácico (AS). (B) Gel da blenda de PCL/AS 95:05 (% m/m).

Resultados semelhantes ao dos arcabouços (por evaporação de solvente) de PCL/AS também foram observados nas análises de DMA do gel. O aumento da T_g do gel comparado ao PCL puro, devido ao acréscimo do ácido sebácico e uma diferença não muito expressiva na T_m eram esperados. Porém, também uma maior diminuição na entalpia e na porcentagem de cristalização do gel foi observado (Fig. 38 e Tab. 14). Outro fato observado na curva de DMA do PCL/AS é a presença de um platô de transição secundária que pode ser talvez referente à reticulação do gel na temperatura de -50 °C aproximadamente (Fig. 38). As análises da membranda de PCL puro mostraram uma maior rigidez do material (E'), provavelmente devido ao tamanho das cadeias poliméricas que são maiores do que no material em gel. Como o gel de PCL/AS possui uma baixa porcentagem de cristalização (material mais amorfo), na sua curva de módulo de perda (E'') foi observado uma diminuição e arredondamento do pico (DMA). O menor tamanho das cadeias, pela presença de uma maior concentração de PCL diol, favorece a diminuição do E'' (Fig. 38B).

5.2.3 Hidrofilicidade do Biomaterial

Nas avaliações de desidratação e rehidratação do gel foi constatada uma maior hidrossolubilidade do material, talvez pela menor cristalinidade do polímero comparado ao PCL

puro (Tab. 15). As características de superfície citadas no item 5.2.1 e 5.2.2 podem favorecer uma degradação mais rápida do gel em relação ao polímero puro (PCL). A maior porcentagem de fase amorfa do polímero pode proporcionar melhores resultados na taxa de degradação do gel, gerando uma maior porosimetria e melhor dispersão da água, o que pode facilitar o crescimento celular. Verificou-se uma grande perda de água pelo material exposto ao ambiente após 24 h, cerca de 50 %, provavelmente devido à reticulação do gel. A blenda polimérica também contraiu cerca de 30 % com a perda de água, contudo, o material em ambiente aquoso absorveu 18 % da água perdida, sem aumento na área da amostra (Tab. 16). Os resultados observados foram utilizados para melhorar o armazenamento do gel, que passou a ser acondicionado em solução aquosa e estéril antes de ser avaliado pelos outros métodos de caracterização. Porém, para ensaios de DMA e da medida de ângulo de contato (Tab. 17), as amostras foram secas em temperatura ambiente.

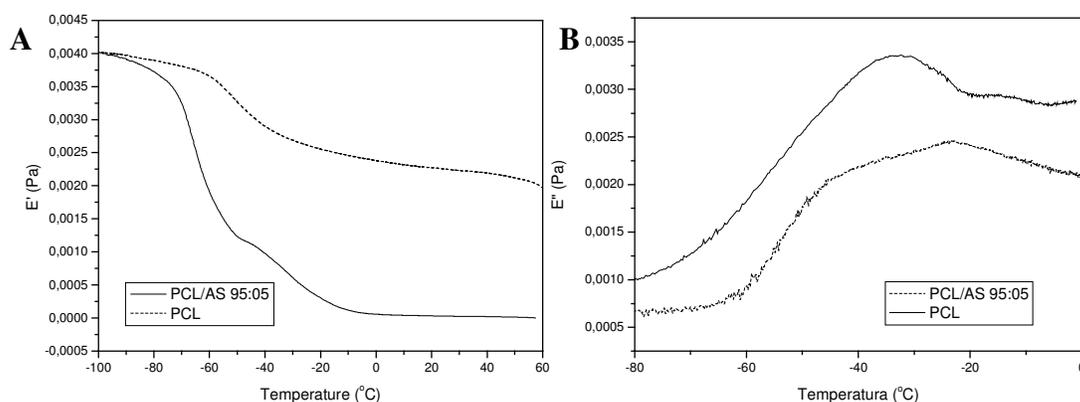


Figura 38: (A) Curvas de DMA com PCL puro e do gel da blenda de PCL/AS (95:05 - % m/m), módulo de armazenamento (E'). (B) Módulo de perda (E'') de ambos os materiais.

Tabela 15: Avaliação da perda de água do gel de PCL/AS 95:05 (m/m%).

| Desidratação da amostra PCL | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|---------------|
| Tempo (h) | Massa da amostra (mg) | Perda de água (%) | Área da amostra (mm ³) | Contração (%) |
| 0 | 251,2 ± 0,5 | 0 ± 0,5 | 1756 ± 2 | 0 ± 2 |
| 2 | 219,6 ± 0,2 | 13 ± 0,2 | - | - |
| 4 | 202,7 ± 0,8 | 19 ± 0,8 | - | - |
| 6 | 197,5 ± 0,6 | 21 ± 0,6 | - | - |
| 24 | 118,6 ± 0,1 | 53 ± 0,1 | 1206 ± 4 | 28,6 ± 4 |

Na Tabela 17 foi avaliado o ângulo de contato externo de uma gota de água com a superfície do gel de PCL/AS seco em temperatura ambiente. Pode-se observar que o gel possui características mais hidrofílicas do que o PCL puro. Houve um aumento expressivo do ângulo externo corroborando com os resultados de perda e absorção de água das amostras do gel.

Tabela 16: Avaliação de absorção de água pelo gel de PCL/AS 95:05 (m/m%).

| Rehidratação da amostra | | |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| Tempo (h) | Massa da amostra (mg) | Ganho de água (%) |
| 24 | 145,1 ± 0,7 | 22 ± 0,7 |
| 72 | 140,2 ± 0,5 | 18 ± 0,5 |

Tabela 17: Resultados da análise de ângulo de contato do gel da blenda.

| Materiais | Ângulo de Contato (graus) |
|------------------|---------------------------|
| PCL (100 %) | 75,2 |
| PCL/AS (95:05 %) | 114,7 |

5.2.4 Biodegradação

A policaprolactona consiste em um poliéster alifático linear semicristalino e é reconhecida como um polímero bioabsorvível. A degradação hidrolítica do polímero ocorre em três etapas sucessivas. Na primeira fase o material sofre um processo de degradação não enzimática que resulta na susceptibilidade da ligação éster à hidrólise. Na segunda etapa formam-se oligômeros de cadeia curta, diminuindo a massa molar. Na última fase a policaprolactona de baixa massa molecular é fagocitada por macrófagos e rapidamente degradada em ϵ -hidroxicapróico, que é metabolizado entrando no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e eliminado pela excreção renal (Li *et al.*, 1999).

Os resultados de degradação hidrolítica do gel em PBS, de 30 a 120 dias, foram semelhantes provavelmente devido ao alto grau de cristalinidade do PCL de alta massa molecular e do ácido sebáico, o que torna difícil a quebra hidrolítica das cadeias poliméricas e conseqüentemente a degradação do material (Tab. 18). Estes resultados corroboram com os

trabalhos de Huang e colaboradores (2004) verificaram também um aumento na cristalinidade e na temperatura de fusão ($T_m = 63\text{ }^\circ\text{C}$) de PCL após 60 semanas de degradação e consequentemente, o aumento da entalpia (de 46 para 58 J/g) (Chen *et al.*, 2000).

As curvas de DSC representam a análise da blenda de policaprolactona e ácido sebácico, onde foi feito um escaneamento de 20 a 180 $^\circ\text{C}$. O pico observado em aproximadamente 60 $^\circ\text{C}$ corresponde à temperatura de fusão dos polímeros. Neste ensaio de degradação, o que ficou demonstrado foi a diminuição da energia necessária na transição de fase do material devido à quebra das cadeias poliméricas por hidrólise (Tab. 18), fato observado também por Coombes e colaboradores (2004), que estudaram a degradação dos arcabouços de PCL em solução de PBS e observaram o aumento da T_g de -65 $^\circ\text{C}$ para -62 $^\circ\text{C}$, após 12 meses, aumentando para -45 $^\circ\text{C}$, após 45 meses de incubação em PBS.

Tabela 18: Análises de DSC e DMA de PCL e gel da blenda com diferentes composições após degradação hidrolítica em PBS.

| Materiais | Degradação (dias) | Tg ($^\circ\text{C}$) | Tm ($^\circ\text{C}$) | Entalpia (J/g) | Cristalinidade(%) |
|--------------------------|--------------------------|---|---|-----------------------|--------------------------|
| PCL | 0 | -63 | 63 | 136 | 100 |
| | 30 | -36,1 | 67,6 | 68 | 50 |
| | 60 | -34,7 | 68,3 | 63,4 | 46,6 |
| | 90 | -31,4 | 66,3 | 96,2 | 70,8 |
| | 120 | -28,5 | 65,3 | 105,7 | 77,7 |
| PCL/AS 95:5 % | 0 | -34 | 60 | 57 | 42 |
| | 30 | -45,5 | 62,8 | 38,6 | 28,4 |
| | 60 | -36,1 | 67,8 | 72,7 | 53,5 |
| | 90 | -31,7 | 68,8 | 63 | 46,3 |
| | 120 | -20 | 66,4 | 75,1 | 55,2 |

A análise de DMA da blenda polimérica mostrou um decréscimo considerável no módulo de armazenamento (E'), tanto quanto o aumento da T_g após os tempos de degradação em PBS até 120 dias (Fig. 39). O fator que pode ter gerado o aumento na rigidez do gel de PCL/AS foi a perda rápida do ácido sebácico e a perda gradual do PCL diol. Após 120 dias, o PCL/AS em gel tornou-se mais cristalino (Tab. 18), com cadeias poliméricas maiores, aumentando a rigidez do material. Ao contrário disto, o PCL puro perde a sua porção amorfa (60 dias) e somente após 120 dias apresenta um maior aumento na rigidez (redução do E'). Provavelmente esta perda refere-se

ao restante da fase amorfa do polímero, tornando-o mais cristalino (Fig. 39A e B). O objetivo principal da confecção da blenda da policaprolactona com o ácido sebácico era uma redução na fase cristalina e um maior controle na taxa de degradação. Com estas análises foi verificada uma melhoria das propriedades de degradação do material quando comparado ao polímero puro (PCL).

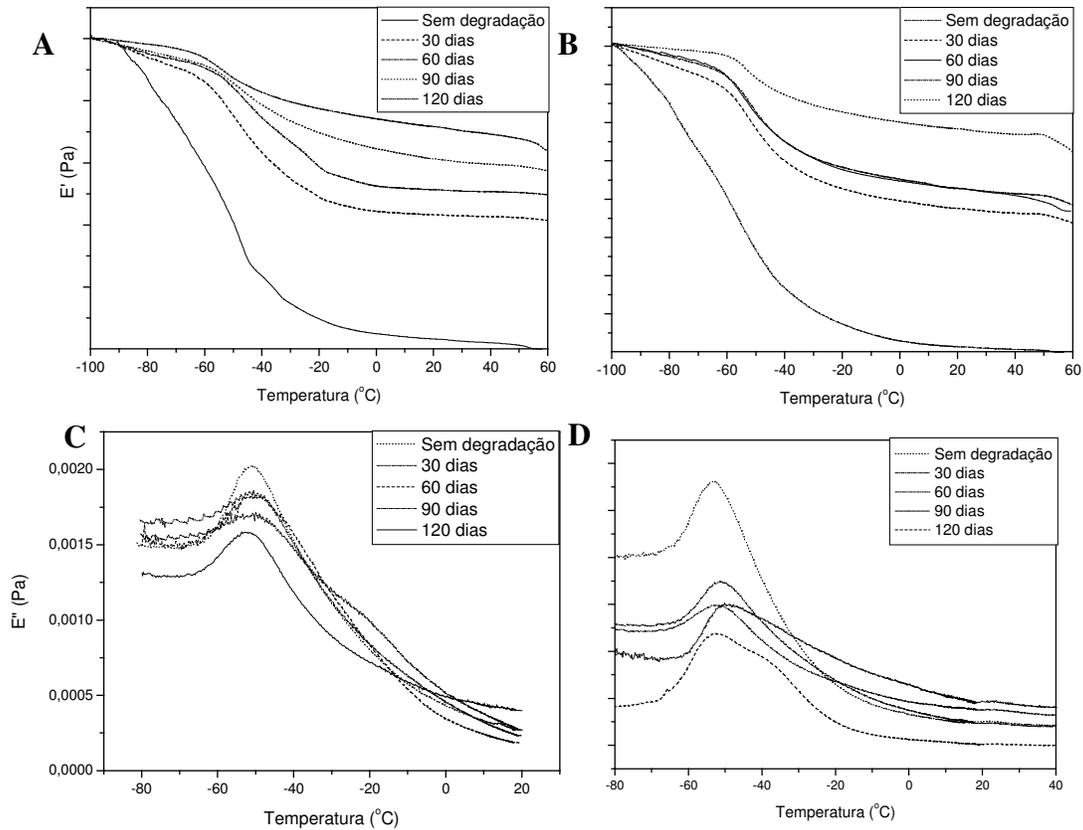


Figura 39: (A) Curvas de DMA do gel de PCL/AS 95:05 antes e depois da degradação em solução de fosfato (PBS). Módulo de armazenamento (E') nos tempos de degradação 30, 60, 90 e 120 dias. (B) PCL puro em PBS por 0, 30, 60, 90 e 120 dias. (C) PCL/AS 95:05 antes e depois da degradação (Módulo de perda – E'') (D) PCL antes e depois da degradação (E'').

Na avaliação das curvas de módulo de perda do gel de PCL/AS, observa-se uma diminuição gradativa da área, porém não muita expressiva. Pode-se constatar que como nas curvas de E' , o módulo de perda (E'') tem uma diminuição gradativa. Diferente destes resultados, nas amostras de PCL puro pode-se verificar que o E'' possui um abaixamento expressivo após 30

dias de degradação, e somente depois de 120 dias há uma redução novamente, semelhante aos resultados do módulo de armazenamento (E') (Fig. 39C e D).

5.2.5 Morfologia de Superfície após Degradação *in vitro* (MEV)

A superfície do gel de PCL/AS após os períodos de degradação foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) semelhante às análises realizadas com os arcabouços (Fig. 26). Foram obtidos resultados semelhantes aos dos arcabouços durante a biodegradação. O material que inicialmente possuía poros de tamanhos pequenos, após a degradação, houve um aumento tanto na largura quanto na sua profundidade dos poros após 30 dias (Fig. 40A). Com o decorrer do tempo, a superfície do gel se tornou mais rugosa, devido, provavelmente, a perda de parte do material, principalmente do ácido sebácico (Fig. 40B).

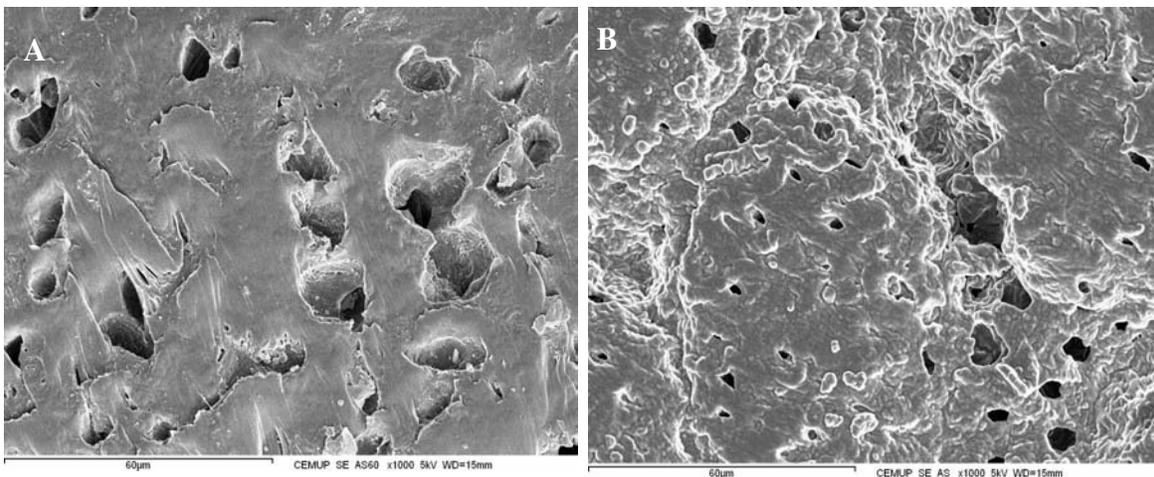


Figura 40: Amostras de PCL/AS (95:05, % m/m) gel com 30 e 60 dias de degradação (A e B, respectivamente) fotografados no MEV.

Na Figura 41, observa-se que a porosidade do biomaterial aumenta gradativamente, após 90 dias. A partir de 120 dias de degradação o gel perdeu massa polimérica significativamente, aumentando o tamanho dos poros. A superfície do material possui macroporos e microporos de aproximadamente, 100 μm e 10 μm , respectivamente.

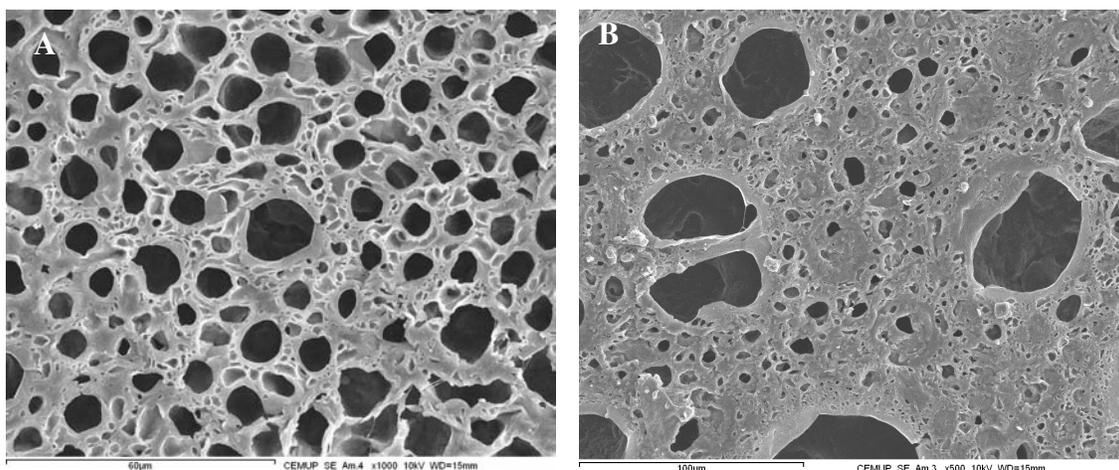


Figura 41: Amostras de PCL/AS (95:05, % m/m) gel com 90 e 120 dias de degradação fotografados no MEV.

Porém, na medida da perda de massa não foi observado diferença significativa da blenda em gel após 120 dias. Resultado semelhante foi verificado com a policaprolactona pura, contudo a porcentagem de perda de massa foi menor que a do PCL/AS em gel. Apesar disto, nenhum resultado foi diferente estatisticamente (Fig. 42). Os resultados podem ter sido influenciados pela menor porcentagem de ácido sebácico que alteraria a taxa de degradação. Além disso, a policaprolactona tende a ter o seu tamanho de cadeia e a porcentagem de cristalinidade reduzida antes de perderem massa. Porém, o aumento da porosidade e do tamanho dos poros favorece a cultura de células, a sua adesão e proliferação na superfície e interior do material. Outro fator complicador das análises da perda de massa foi a secagem das amostras, não foi possível secá-las em forno, devido a utilização das amostras para outras análises (MEV, DSC e DMA). Portanto, poderia haver presença de água no material, desfavorecendo a medida exata da perda de massa.

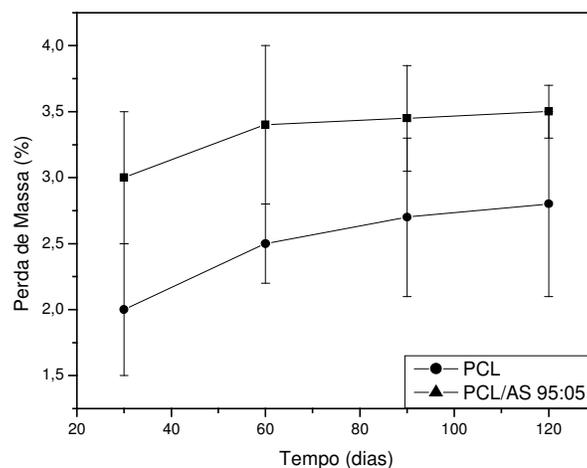


Figura 42: Curvas de perda de massa dos arcabouços da blenda de PCL/AS incubadas em solução salina (PBS) por diferentes períodos de tempo. Análise estatística *t student* $p < 0,05$.

5.2.6 Avaliações de Citotoxicidade

5.2.6.1 Ensaio de Contato Direto e Indireto

Os ensaios de citotoxicidade revelaram que o biomaterial estudado não promoveu a diminuição da viabilidade celular das células MG63 (osteoblastos humanos) e hMSC (células mesenquimais de medula óssea humanas) (Fig. 43 e 44, respectivamente). A toxicidade de compostos orgânicos usualmente utilizados no preparo das blendas de hidrogéis poliméricos é um fator limitante da aplicação destes materiais como implantes. De acordo com a Figura 43, a viabilidade celular do poço do controle negativo (meio fresco) não é estatisticamente diferente dos poços com as células cultivadas com o meio de cultura que continha os produtos de liberação do gel (eluato). Portanto, o número de osteoblastos viáveis cultivados com meio fresco era semelhante ao número de osteoblastos cultivados com o meio que continha o gel, inclusive nas diluições (50 e 30 %). Com estes resultados, o gel de PCL/AS mostrou ser citocompatível.

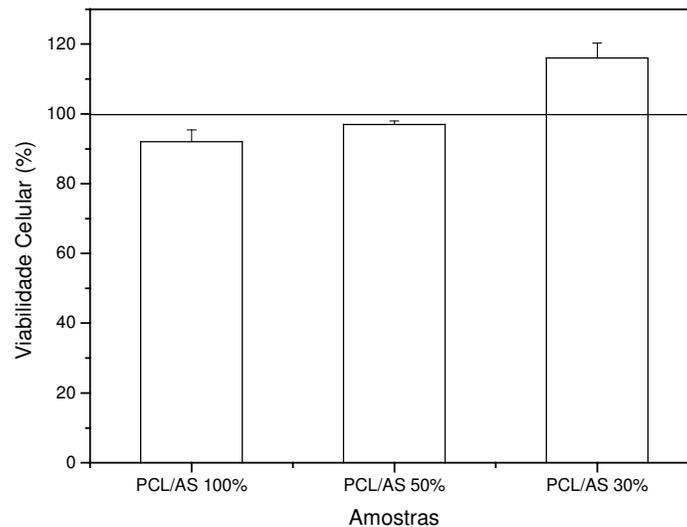


Figura 43: Medida de viabilidade celular indireta do gel de PCL/AS com MG63 por metabolismo do MTT. Controle negativo representado pela linha em 100 %. Análise estatística *t student* $p < 0,05$.

Na Figura 44 pode-se observar pelo método de avaliação do metabolismo celular com azul de Alamar que, em células mesenquimais de medula (hMSC), tanto a arcabouço de policaprolactona pura quanto o gel PCL/AS mostraram resultados acima do controle negativo (meio fresco) com 2 dias de incubação. Porém, o arcabouço de PCL mostrou uma queda de viabilidade celular (10 %) e o gel da blenda manteve resultado semelhante ao controle negativo, após 7 dias. Provavelmente a presença dos biomateriais estimulou a proliferação das células-tronco, contudo após 7 dias esta indução não foi mais observada. Ambos os materiais se mostraram biocompatíveis na cultura de células-tronco mesenquimais.

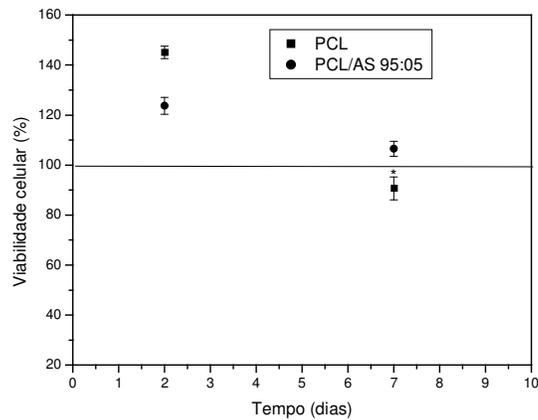


Figura 44: Medida de viabilidade celular indireta do gel de PCL/AS com hMSC por método de azul de Alamar. Controle negativo representado pela linha em 100 %. Análise estatística *t student* $p < 0,05$.

No ensaio de contato direto do biomaterial com os osteoblastos humanos (MG63), as células foram plaqueadas em uma concentração de 10^6 células/mL em placas de 6 poços. Depois de 24 h, os materiais estéreis de 0,1 g de massa foram colocados em contato com a monocamada celular. Após 24 h as amostras tiveram as suas dimensões marcadas no fundo da placa e as células foram coradas com azul de metileno e observadas por microscopia ótica. Na análise, foi observada uma diminuição na concentração de células logo abaixo do gel de PCL/AS, porém elas se encontravam com morfologias normais e aderidas (Fig. 45).

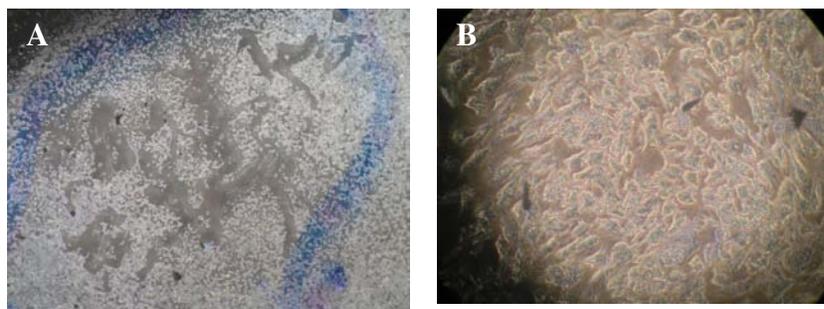


Figura 45: (A) Fotografia de ensaio de teste do contato direto da blenda PCL/AS 95:05 (% m/m) com osteoblastos (MG63). (B) Imagem de microscopia ótica (100x) das células dentro da área de contato.

Os índices de citotoxicidade de acordo com a ISO 10993-5 foram de toxicidade leve (índice = 1) e nenhuma presença de morte celular (índice = 0). Provavelmente o material comprimiu a camada de células dificultando a sua troca gasosa e pode ter favorecido a morte celular. O arcabouço de policaprolactona pura também mostrou resultados semelhantes ao gel (índice = suave toxicidade), pode ser devido a semelhança nas características de biocompatibilidade dos materiais (Tab. 19).

Tabela 19: Análise de contato direto com células MG63 incubadas com gel de PCL/AS.

| Amostras | Índices de zona* | Morte celular* |
|--------------|------------------|----------------|
| Controle | 0 - nenhum | 0 - nenhum |
| PCL | 1 - suave | 0 - nenhum |
| PCL/SA 95:05 | 1 - suave | 0 - nenhum |

*Índices segundo a tabela da ISO 10993-5.

Outro método utilizado para avaliar a viabilidade celular mediante o contato direto com o gel polimérico foi por fluorescência (*live/dead*) (calceína - verde e iodeto de propídeo - vermelho), em que foram utilizadas linhagem de osteoblastos (MG63). As células viáveis são coradas de verde e as mortas de vermelho. As células foram misturadas com o gel e cultivadas em cultura 3D (*Spinner flask*). A viabilidade celular foi observada, após 24 h, e mostrou células viáveis e aderidas à superfície e presentes no interior do material (Fig. 46).

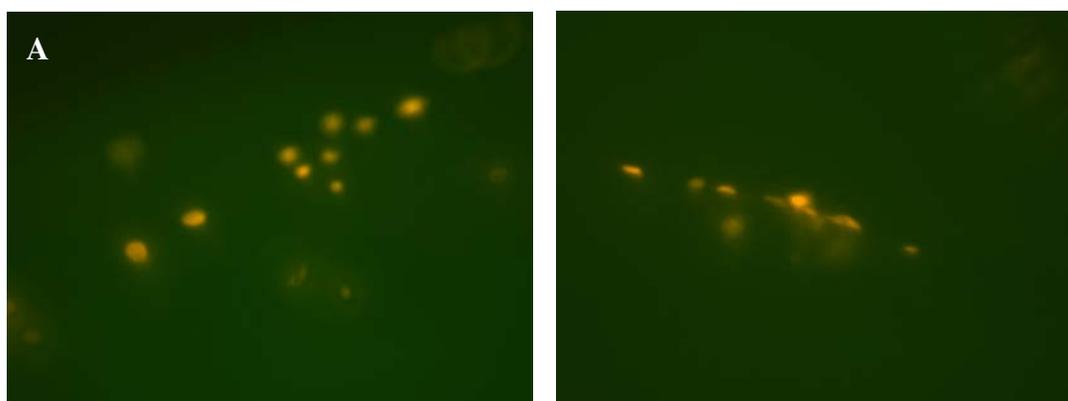


Figura 46: (A) Blenda PCL/AS 95:05 (% m/m) com osteoblastos (MG63) marcados com calceína (verde) e iodeto de propídeo (vermelho) (24 h) (10x). (B) Micrografia da superfície do material.

Na Figura 46 podem-se visualizar as células com coloração alaranjada porque houve absorção pelo material da calceína e do iodeto de propídeo, dificultado a coloração das células. Porém, antes da análise foi realizado o ensaio com azul de alamar e a viabilidade celular foi semelhante ao controle negativo (~98 %). Na Figura 47, pode-se observar um grande número de células no interior do gel e após 48 h foi mostrado um aumento na concentração celular, que pode ser pela proliferação das MG63, que apresentam um tempo de duplicação celular inferior a 24 h. As micrografias foram feitas após os materiais estarem fixados com formaldeído 4 % e incubados com iodeto de propídeo para visualização dos núcleos celulares.

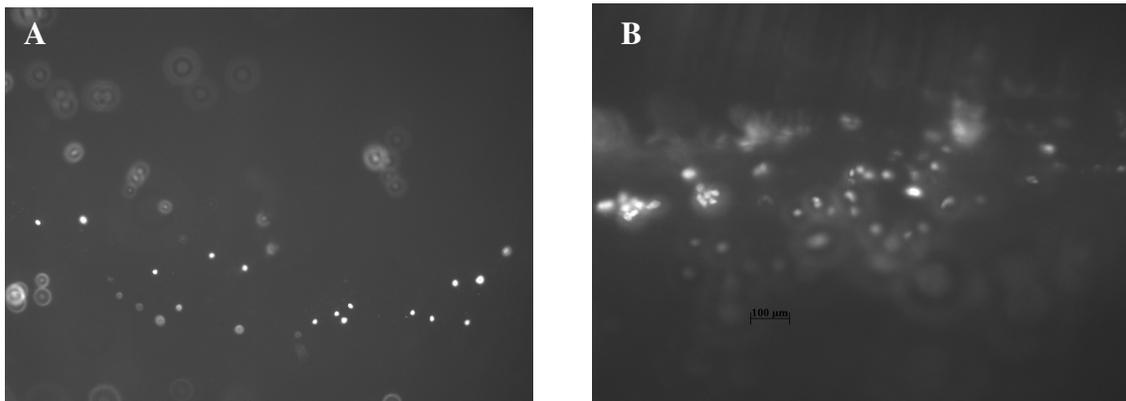


Figura 47: (A) Imagem de imunofluorescência da blenda PCL/AS 95:05 (% m/m) com osteoblastos (MG63) (10x). (B) Células marcadas com iodeto de propídeo com 48 h de incubação em meio de cultura (α -MEM e 10% SBF) (10x).

Não foi possível realizar o ensaio com a calceína e iodeto de propídeo porque as células não estavam viáveis, também foi feita a medida pelo azul de Alamar e a cultura mostrou viabilidade inferior a 40 % em comparação ao controle. As células aprisionadas no interior do gel, após a sua proliferação, podem ter sofrido com a falta de oxigenação ou de nutrientes necessários para a manutenção da sua viabilidade. Contudo a presença do material não diminui a viabilidade de células cultivadas na sua superfície (Fig. 47).

5.2.6.2: Análise da Apoptose por Citometria de Fluxo

Apoptose é um processo fisiológico normal que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostase tecidual. A ativação da apoptose se caracteriza por

alguns acontecimentos morfológicos, como a perda ou assimetria da arcabouço plasmática, condensação do núcleo e do citoplasma ou a fragmentação do DNA. Nas células apoptóticas (em fase de morte celular), a membrana de fosfolípedes é invertida (de fora para dentro), expondo a porção interna de fosfatidilserina (FS). Utiliza-se o fluorocromo Anexina V para detecção de apoptose celular. Ele possui alta afinidade de ligação ao FS. Para identificar as células mortas foi utilizado o brometo de propídeo que tem alta afinidade com o DNA, mas não consegue ultrapassar a membrana citoplasmática de células viáveis. Portanto, as células vivas não são marcadas (Vermees *et al.*, 1995). A Tabela 20 mostra as análises realizadas em citometria de fluxo dos osteoblastos nos diferentes tempos de incubação.

Tabela 20: Avaliação de citotoxicidade direta com MG63 por citometria de fluxo.

| Categoria das células | | Porcentagem de cada categoria | | | | | | | |
|----------------------------|--------------------|-------------------------------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|
| | | Controle | | | | PCL/AS | | | |
| | | 24 (h) | 72 (h) | 96 (h) | 7 (dias) | 24 (h) | 72 (h) | 96 (h) | 7 (dias) |
| Sem marcação | Viáveis | 50 ± 8 | 53 ± 5 | 70 ± 10 | 23 ± 6 | 42 ± 9 | 53 ± 11 | 55 ± 8 | 37 ± 9 |
| Brometo de Propídeo | Mortas | 34 ± 4 | 40 ± 12 | 24 ± 9 | 56 ± 20 | 45 ± 11 | 32 ± 15 | 34 ± 10 | 39 ± 7 |
| Anexina V | Apoptóticas | 14 ± 7 | 4 ± 2 | 2 ± 1 | 1 ± 0,8 | 13 ± 12 | 2 ± 2 | 4 ± 1 | 1 ± 0,2 |

Para avaliação por citometria de fluxo, foram utilizados como controle negativo, poços com células sem incubação de nenhum material, somente a placa de cultura (poliestireno). Comparando com o controle negativo, o gel da blenda não apresentou um número significativo de células apoptóticas. Nos diversos tempos de incubação, a porcentagem de células mortas foi semelhante ao controle negativo (Tab. 20). Nos totais das porcentagens de células viáveis, mortas e apoptóticas há um resultado inferior a 100 % devido a escolha da população com tamanho celular aproximado do tamanho normal de um osteoblasto.

5.2.7 Avaliação da Morfologia e Proliferação Celular (MEV e Confocal)

As linhagens celulares utilizadas foram a de osteoblasto (MG63) pela sua maior taxa de proliferação e facilidade de cultivo, e as mesenquimais de medula óssea pela sua maior aplicabilidade na técnica de engenharia tecidual. As células foram incubadas com o gel de PCL/AS durante 3, 7 e 10 dias. A cultura foi realizada na superfície do material devido a dificuldade de penetração dos fluorocromos no interior do gel. Após o período de incubação os materiais foram removidos e analisados por microscopia confocal e eletrônica de varredura.

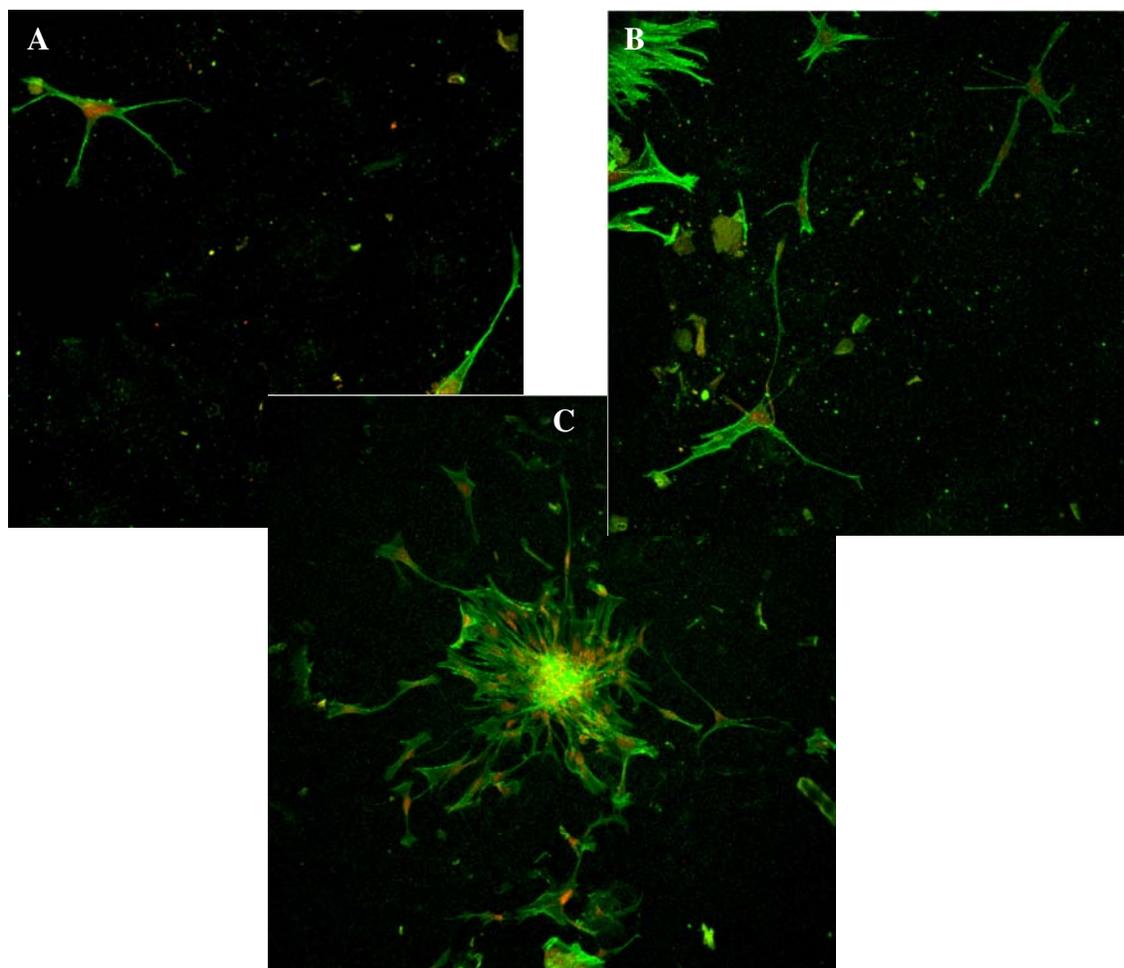


Figura 48: Micrografias do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m) incubados com osteoblastos (MG63) por 3, 7 e 10 dias (A, B e C, respectivamente) (200x).

Nas amostras avaliadas por microscopia confocal, inicialmente, poucas células se encontram aderidas à superfície do biomaterial, porém elas estão espalhadas e viáveis (Fig. 48A).

Após 7 dias de cultura pode-se observar um maior número celular e as células estão interligadas (Fig. 48B). Com 10 dias de cultura foram observadas colônias celulares espalhadas por toda a superfície do gel, (Fig. 48C). Esta formação celular é característica da linhagem empregada que descende de um osteossarcoma humano e tende a crescer em colônias.

Nos materiais avaliados por MEV após 10 dias (Fig. 49 e 50), a cultura de osteoblastos na superfície do material se apresenta aderida e as células apresentam morfologia normal. Houve a formação de uma camada celular sobre toda a superfície o gel após 10 dias de incubação (Fig. 49). Semelhante resultado foi obtido com a cultura de células tronco adultas (hMSC), as células encontravam-se aderidas, espalhadas, interligadas e com morfologia normal (Fig. 49). As células mesenquimais se caracterizam por possuir um tamanho maior em relação a fibroblastos e osteoblastos, além de possuírem a tendência de emitir prolongamentos a certa distância, ficando com uma imagem muito achatada. Devido a sua taxa de proliferação mais lenta não houve a formação de uma camada celular por todo o biomaterial como na cultura com osteoblastos (MG63) (Fig. 50).

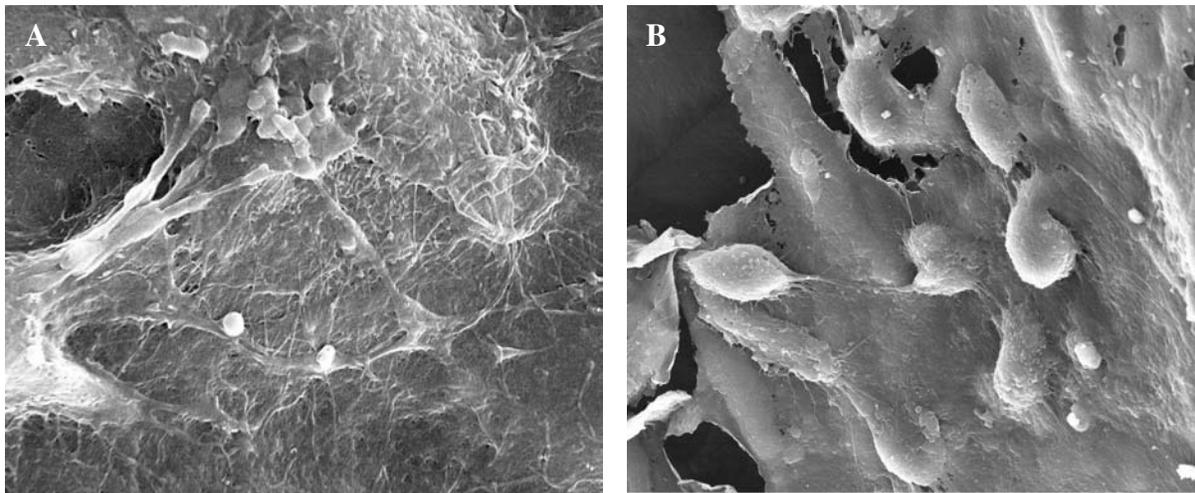


Figura 49: Micrografias do gel incubadas com osteoblastos (MG63) por 10 dias. (A) Gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), (B) Ampliação da imagem para visualizar a aderência das células na superfície da amostra.

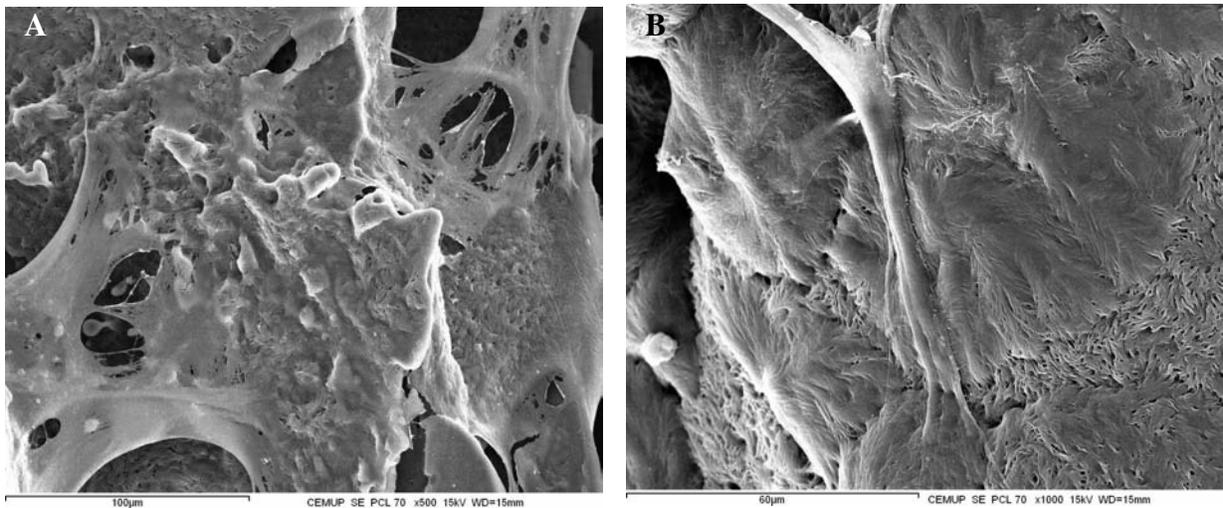


Figura 50: Micrografias do gel com células tronco de medula óssea humana (hMSC) por 10 dias. (A) Gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), (B) Ampliação da imagem para visualizar a aderência das células na superfície da amostra.

5.2.8 Avaliação da Atividade de Fosfatase Alcalina

Para avaliar a diferenciação das células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) foram feitas medidas de atividade de fosfatase alcalina (ALP). Foi utilizado o meio indutor de diferenciação celular para promover a transformação das células-tronco em osteoblastos (meio osteogênico). As células foram plaqueadas e aderidas em 24 h. O meio comum foi trocado pelo meio indutor de diferenciação, e o material colocado em contato com a monocamada celular. Depois de 3, 7 e 15 dias as células foram rompidas com Triton X-100 e a atividade de ALP medida pelo método que utiliza o p-nitrofenil. Também foi realizada a medida da concentração de proteína total em todos os períodos. Esta medida mostra a concentração real da enzima de acordo com a concentração das proteínas. Para verificar a viabilidade das células foi medida a fluorescência do sobrenadante no ensaio com o azul de Alamar no grupo do controle negativo (sem material) e com o gel da blenda, nos diferentes tempos de incubação.

Em todos os tempos avaliados, foi observada uma redução na atividade do ALP nas células cultivadas com o gel de PCL/AS. Este fato pode indicar uma diferenciação precoce destas células quando em contato com o biomaterial (Fig. 51). Este fato não foi observado quando as

células mesenquimais foram incubadas com os arcabouços de PCL/AS com diferentes composições (Item 5.1.5, Fig. 28). Nas avaliações de biocompatibilidade o material em gel mostrou resultados muito semelhantes aos dos arcabouços o que já era esperado. Porém, nas avaliações da atividade da fosfatase alcalina (ALP), a forma em gel pode ter favorecido a diferenciação celular em pré-osteoblastos, uma vez que na preparação da blenda foi utilizada uma solução com alta concentração de cálcio, o que seria talvez o fator desencadeador do evento (Fig. 51).

Resultado semelhante foi observado por Evangelista e colaboradores (2007) utilizando alginato modificado por um peptídeo (RGD) como biomaterial. Os pesquisadores observaram uma maior expressão de ALP após 21 dias de incubação com as hMSCs. Após este período a atividade de ALP reduz à medida que a atividade do gene para osteocalcina aumenta, caracterizando a diferenciação celular. O aumento da atividade de ALP nos mostra uma maior atividade celular e possivelmente uma maior produção de matriz extracelular e do colágeno (Evangelista *et al.*, 2007).

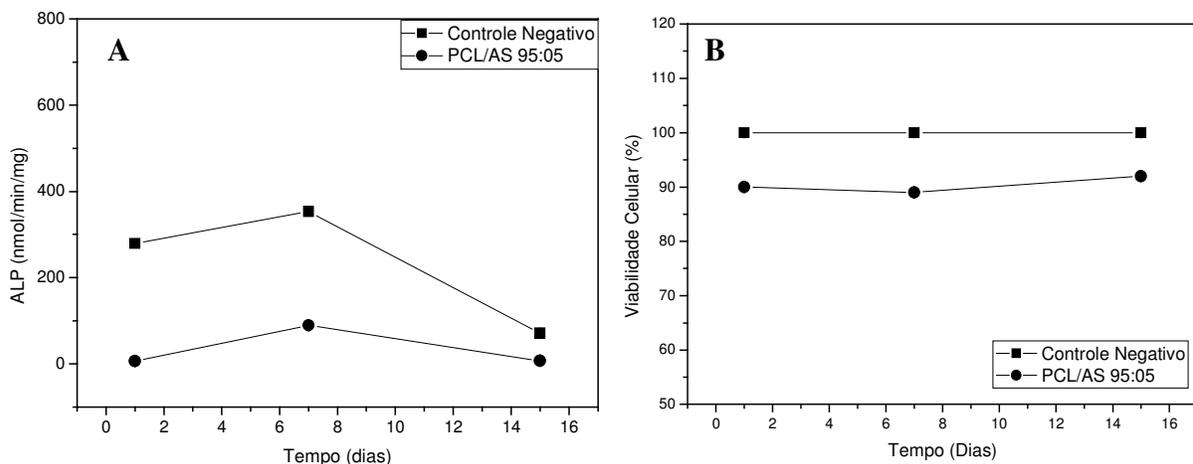


Figura 51: (A) Atividade de ALP (fosfatase alcalina) por células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC) em contato com gel de PCL/AS. (B) Citotoxicidade direta do gel de PCL/AS em hMSC no ensaio de metabolismo celular (azul de Alamar). Análise estatística *t student* $p < 0,05$.

5.2.9 Avaliação de Calcificação de Matriz Extracelular (Von Kossa)

Um marcador tardio de diferenciação celular para as células mesenquimais adultas é a calcificação da matriz extracelular. Para visualizar este fenômeno foi utilizada a coloração de Von Kossa e a superfície do material foi visualizada em microscópio ótico. Na Figura 52, pode-se observar a presença de pequenos nódulos negros por toda a extensão do gel de PCL/AS (10 e 15 dias de incubação). Os nódulos de cálcio estão circutados nas imagens para melhor visualização. Como controle negativo, a mesma linhagem foi cultivada em policaprolactona pura e não foi observada a formação de nódulos de cálcio.

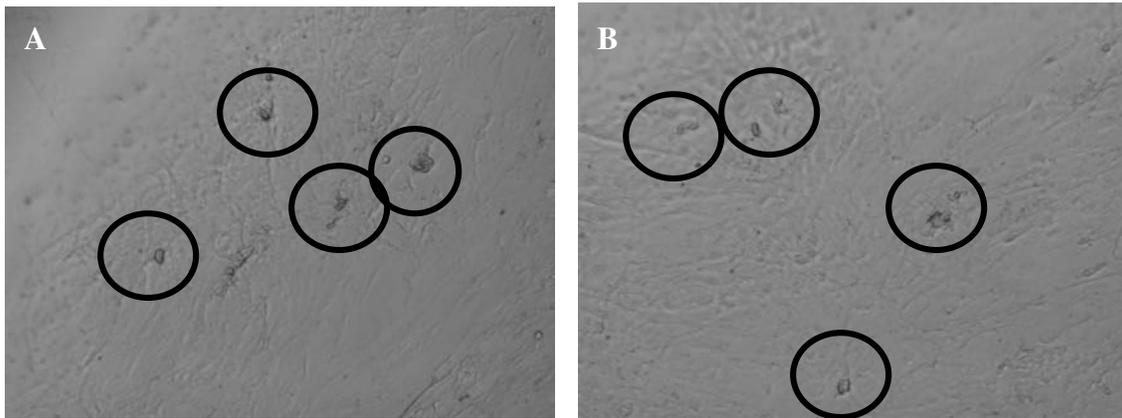


Figura 52: (A) Fotografia de microscópio de fluorescência de cultura de hMSC corado para Von Kossa (Círculos) após 10 dias. (B) 15 dias de incubação com gel de PCL/AS.

5.2.10 Avaliação *in vivo* de Implante Subcutâneo em Ratos Wistar

A biocompatibilidade *in vivo* do gel de PCL/AS foi semelhante aos resultados obtidos nas análises *in vitro*. Macroscopicamente foi observada a degradação da matriz gel (PCL/AS) após 30 dias (Fig. 53A), e nos implantes com 60 e 90 dias foram observados poucos fragmentos do material e tecido conjuntivo formado no lugar do gel (Fig. 53B e C). Nas análises histológicas foi observado que o biomaterial induziu a migração de infiltrado inflamatório (monócitos) após 30 dias de implantação. Este processo pode ter sido provocado pela reticulação do material e a perda de água para o tecido. O tecido formado no interior do material apresentou morfologia de tecido conjuntivo frouxo com a presença de fibroblastos, vasos sanguíneos volumosos e células de defesa sanguínea (macrófagos e linfócitos). Nas micrografias (Fig. 54-56), observam-se algumas das partículas do gel em formato arredondado. O tecido formado no interior do biomaterial

mostrou novos vasos sanguíneos (angiogênese), e estes se encontravam cheios de células sanguíneas (hemácias) (Fig. 54). Como a neoformação vascular é um fator limitante da regeneração tecidual no interior do material, quanto maior a formação de vasos melhor a regeneração tecidual (Ratner *et al.*, 2005).

Comparando os resultados obtidos com outros trabalhos de pesquisadores, porém com outros materiais pode-se inferir que a resposta inflamatória a biomateriais é mediada por uma interação complexa entre macrófagos, linfócitos e células gigantes e estas células interagem através das citosinas (Luttikhuisen *et al.*, 2006). Em pesquisa realizada pelo grupo do Dr. James Anderson (2008) da Universidade de Case Western Reserve (Cleveland, U.S.A.) foi observado que há influência das propriedades químicas da superfície dos materiais na liberação de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) na ativação de macrófagos ativados e aderentes na reação de corpo estranho (Rodriguez *et al.*, 2008b). Segundo Chang e colaboradores (2008), a carga superficial interfere na ativação dos macrófagos, sendo que materiais hidrofílicos catiônicos têm a adesão e migração destas células diminuídas, com isso há uma menor indução de formação de células gigantes, comparado com materiais hidrofóbicos ou neutros. As cargas aniônicas ou neutras das superfícies dos materiais induziriam a apoptose dos macrófagos, ativando o agrupamento destas células, formando células gigantes. O PCL/AS em forma de gel tem propriedades hidrofílicas e, pela presença do cálcio, deve ter carga positiva na superfície. Estas características talvez fossem inibitórias a adesão de macrófagos na superfície e não promoveriam a apoptose e formação de células gigantes.



Figura 53: Fotografias dos implantes subcutâneos de gel de PCL/AS após 30, 60 e 90 dias (A, B, C, respectivamente).

No arcabouço de PCL/AS, as características são completamente diferentes, o material é hidrofóbico e não possui cálcio na formulação, o que favoreceria a adesão de macrófagos e a formação de células gigantes. Com a presença de células gigantes, há uma migração de fibroblastos e estes produzem colágeno para a formação da cápsula fibrosa (Rodriguez *et al.*, 2008a). Apenas nos implantes do arcabouço de PCL/AS há formação de cápsula fibrosa.

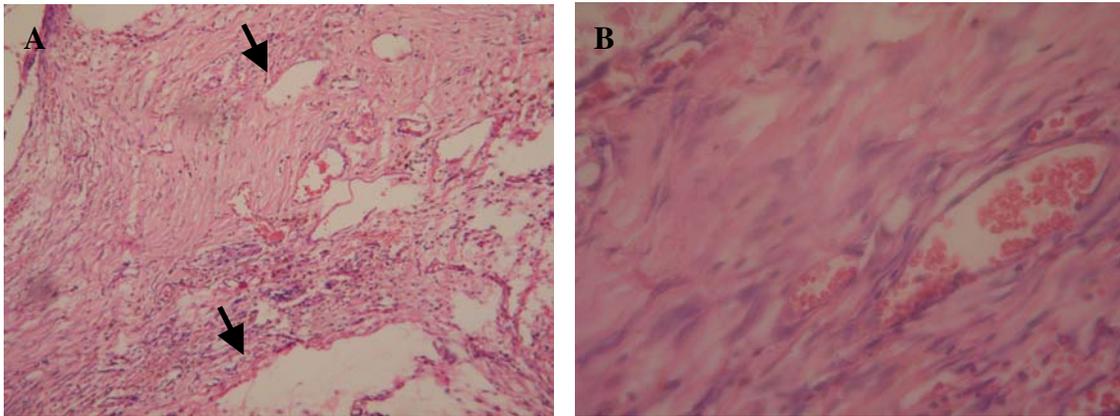


Figura 54: Implantes do gel de PCL/SA após 30 dias. O tecido foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). As fotografias foram obtidas por microscopia óptica (Ampliação – 10 e 100x). As setas indicam as partículas de gel.

Na Figura 55 pode-se observar o gel de PCL/AS com 60 dias de implantação. Houve a formação de tecido conjuntivo frouxo, como na Figura 54; o tecido neoformado possui um grande número de células fibroblásticas e poucas células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) (Fig. 55A). Na Figura 56B observou-se o gel com 90 dias de implantação. Na avaliação histológica, foram obtidos resultados semelhantes à Figura 55A (60 dias de implante). O biomaterial foi reduzido a pequenos fragmentos do gel polimérico, pois apresentou uma degradação avançada. Provavelmente, restando apenas pequenas porções da fase cristalina do PCL. Estes fragmentos estavam circundados por uma camada de fibras colágenas orientadas, talvez numa tentativa do organismo de isolar o material do tecido (Fig. 55B). Contudo, o tecido conjuntivo formado no espaço em que havia material polimérico apresenta morfologia normal. A rápida degradação do gel após 90 dias de implantação foi um resultado excelente comparado ao que foi obtido de perda de massa nos ensaios *in vitro* com solução salina. Rodriguez e colaboradores (2008) avaliaram *in vivo* diversos materiais (PET, PU e elastano) implantados

subcutaneamente. Eles observaram uma intensa migração de monócito após 2 semanas de implantação, resultados estes esperados. Eles observaram a adesão e fusão dos macrófagos formando células gigantes, porém dependendo do tipo de material foi observado um menor infiltrado de linfócitos T ativados ($CD4^+$), alterando a resposta dos macrófagos.

Uma explicação para a alta taxa de degradação do gel de PCL/AS seria a elevada concentração de macrófagos após a implantação do biomaterial, este apresentaria baixa viscosidade e alta permeabilidade nas primeiras 24 h, facilitando a migração destas células para o interior do gel. Com a reticulação do material, estas células ficariam aprisionadas e poderiam mudar a sua configuração (pois não estão aderidas) (Mantovani, 2006). Possivelmente as células secretariam enzimas (Anderson, 1996), como a peroxidase, e após 48 h, elas entrariam em morte celular como observado na cultura de osteoblastos. As proteases contidas no interior dos macrófagos seriam então liberadas acelerando a degradação do material no seu interior. Como a superfície do gel possui características hidrofílicas, os macrófagos tendem a não aderir à superfície, não havendo formação de células gigantes como observado na análise histológica dos arcabouços de PCL/AS (Fig. 32 e 33). Estas células não aderidas modificam a sua polaridade e podem expressar citocinas favoráveis a neoformação vascular e regeneração tecidual (Mantovani, 2006), que são características observadas nas Figuras 54 e 55.

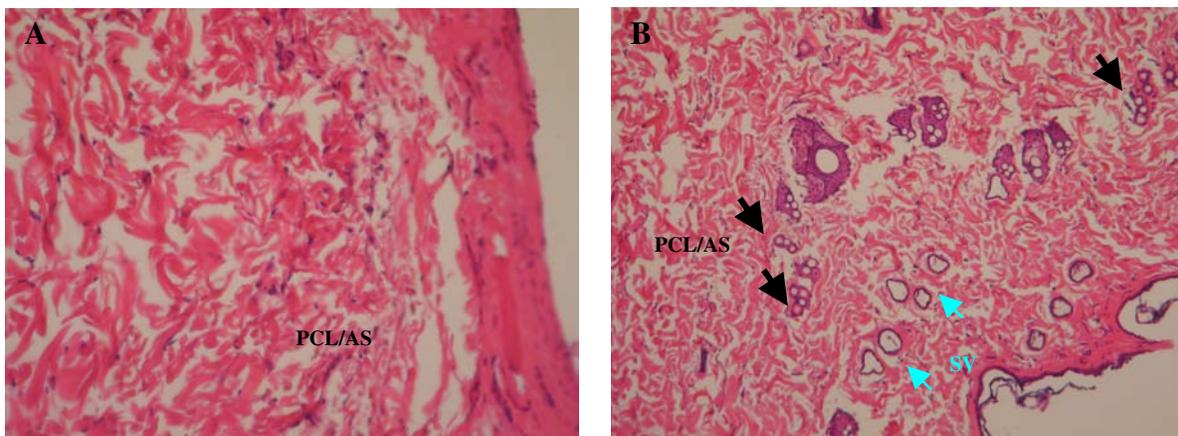


Figura 55: Implantes do gel de PCL/SA após 60 e 90 dias (A e B, respectivamente). O tecido foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). As micrografias foram obtidas por microscopia óptica (Ampliação – 10 e 100x). As setas pretas visualizam as partículas de gel. As setas azuis apontam os vasos sanguíneos neoformados (SV = vasos sanguíneos).

A Tabela 21 apresenta um resumo das análises histopatológicas dos implantes de PCL/AS. Nos cortes histológicos pode-se observar que somente no grupo de 30 dias há uma presença de ligeiro infiltrado inflamatório mononuclear. Esta resposta pode ter sido provocada pela reticulação do gel no tecido subcutâneo, pela liberação de uma solução de fosfato (PBS) e de PCL diol. O tecido conjuntivo frouxo observado em todos os grupos possui novos vasos sanguíneos e somente no grupo de 90 dias verifica-se uma cápsula fibrosa de espessura significativa (~50 µm) circundando as partículas do biomaterial. Neste grupo o gel mostrou um estágio avançado de degradação, restando pequenas partículas de polímero.

Tabela 21: Resultados histopatológicos dos implantes do gel de PCL/AS.

| Histopatologia | Resultados | | |
|---|------------|---------|---------|
| | 30 dias | 60 dias | 90 dias |
| Espessura da cápsula (µm) ^a | 0 | 0 | 50 |
| Presença de tecido necrótico ^b | 0 | 0 | 0 |
| Presença de células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) ^b | 1-2 | 1 | 0 |
| Grau de maturação do tecido conjuntivo ^b | 1-2 | 2 | 2-3 |
| Presença de resposta de corpo estranho (células gigantes) ^b | 0 | 0 | 0 |

^a Análise quantitativa.

^b Análise qualitativa.

Análises semelhantes realizadas por Jabbari e colaboradores (2005) no estudo de matriz injetável de PCL e fumarato mostraram respostas de biocompatibilidade (*in vivo*) semelhantes às do gel de PCL/AS. Outro estudo avaliou o copolímero de ácido sebácico e ácido ricinoléico para liberação controlada de fármaco. Na avaliação histológica foi observada a presença de ligeira inflamação aguda depois de uma semana de implantação. Porém, esta resposta inflamatória não foi observada um mês após o implante, revelando uma regeneração tecidual pela reticulação do material *in situ* (Shikanov *et al.*, 2004). Outro estudo do mesmo grupo que avaliou o copolímero injetável de AS e ácido ricinoleico, mostrou que após 1 dia de implantação o material manteve o formato e permaneceu na região onde foi injetado no dorso do rato. A reticulação do composto foi feita no interior do tecido subcutâneo (Shikanov & Domb, 2006). O gel de PCL/AS apresentou os mesmos resultados, o que viabiliza a sua utilização como material injetável. O material reticula e tende a contrair, além disso, ele passa de viscoso para rígido, estas características parecem ter induzido um desconforto dos animais que removeram os implantes.

Estes foram refeitos em outro local e em menor volume e a remoção do material pelos animais não foi observada. Em outros estudos onde foi avaliado o copolímero de AS e PLA mostraram leve resposta inflamatória aguda após a injeção do biomaterial (Modi *et al.*, 2006). Na análise do gel de PCL/AS não foram observadas respostas adversas, tais como, necrose tecidual, abscesso, calcificação, tumorização do tecido, e resposta de corpo estranho. Os resultados apresentados sugerem adequada biocompatibilidade do material com o tecido subcutâneo.

5.2.11 Avaliação *in vivo* do Gel de PCL/AS em Tíbia de Ratos Wistar

Macroscopicamente, foi observado em todos os períodos de implantação (30, 60 e 90 dias) a presença do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m) (Fig. 56A-C) e também pode-se constatar a oclusão do defeito ósseo, onde não foi colocado nenhum material. Este acontecimento foi observado devido à pequena dimensão do defeito ósseo e a rápida cicatrização do tecido pela abundância do aporte sanguíneo (medula óssea). Nas fotografias com ampliação por lupa, pode-se notar a integração do gel ao tecido adjacente e este mostra morfologia normal. O volume de material encontra-se diminuído no implante de 90 dias (Fig. 56C), fato devido à degradação do gel que se revelou lento, mas efetivo.



Figura 56: Fotografias de implantes em tíbia de rato do gel da blenda de PCL/AS. (A) 30 dias de implante. (B) 60 dias de implante. (C) 90 dias de implante.

Por microscopia ótica, as lâminas dos diferentes períodos de implantação do gel foram avaliadas. No implante de 30 dias foi observada a oclusão total do defeito ósseo por baixo do material polimérico. O tecido apresenta-se mineralizado, porém desorganizado (aspecto globular). Também se pode notar um leve infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos) na

medula óssea (semelhante ao tecido sem a presença do material). Sendo a medula óssea responsável pela produção de células sanguíneas, foi observada uma grande quantidade de células precursoras da resposta inflamatória, principalmente células mononucleadas (linfócitos e macrófagos). Por isso, tanto na tíbia com gel, quanto no controle negativo, a medula óssea mostrava um aspecto arroxeadado pela coloração por HE. Observou-se uma fina camada fibrosa envolvendo o gel de PCL/AS e a formação de pequenos vasos sanguíneos. Foram observadas a presença de osteoblastos e osteoclastos, provavelmente para remodelação do tecido ósseo (Fig. 57 e Tab. 22).

Após 60 dias, foi observada também a oclusão do defeito ósseo por formação de tecido mineralizado. Este se encontra mais organizado (estrutura lamelar) e também foi visualizada a presença de leve infiltrado inflamatório na medula óssea, semelhante ao controle negativo (sem o material). A presença de osteoblastos e de osteoclastos na superfície do tecido ósseo corrobora com aos resultados anteriores (Fig. 58 e Tab. 22). Estes resultados são semelhantes a estudos realizados com osso autógeno em calvária de ratos. Neste trabalho foi medida a expressão de osteocalcina e osteopontina e observaram uma grande quantidade de osteoblastos que significa uma atividade de regeneração e remodelação óssea (Nagata *et al.*, 2009).

Depois de 90 dias o tecido ósseo apresenta-se compacto, organizado, sem infiltrado inflamatório na medula óssea e não se observa a presença de osteoclastos na superfície. Ainda existe uma fina cápsula fibrosa circundando o biomaterial (Fig. 59 e Tab. 22). Em estudos realizados por Sawyer e pesquisadores (2009) foram utilizados implantes de PCL e fosfato tricálcio (TCP) com ou sem colágeno e proteína óssea morfogenética (BMP-2). Os materiais foram colocados em calvária de rato com tamanho de 5 mm de diâmetro. Os resultados após 4 semanas foram semelhantes aos do gel de PCL/AS, onde houve formação de tecido ósseo desorganizado abaixo do implante. Após 15 semanas, o defeito estava completamente cicatrizado, com formação de um tecido ósseo mais organizado. Porém, como o defeito gerado tinha maiores dimensões, o mesmo não foi observado no controle negativo. Nos animais sem o implante, não houve qualquer formação de tecido ósseo (Sawyer *et al.*, 2009).

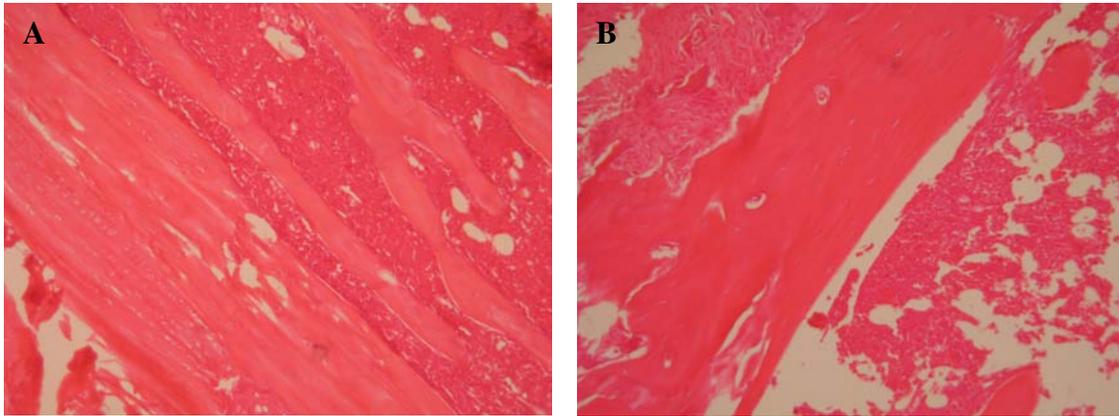


Figura 57: Implantes em tíbia de rato após 30 dias. O tecido ósseo foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) Micrografias do controle negativo (sem material) (Ampliação – 10x). (B) Micrografia do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), formação de tecido ósseo abaixo do material.

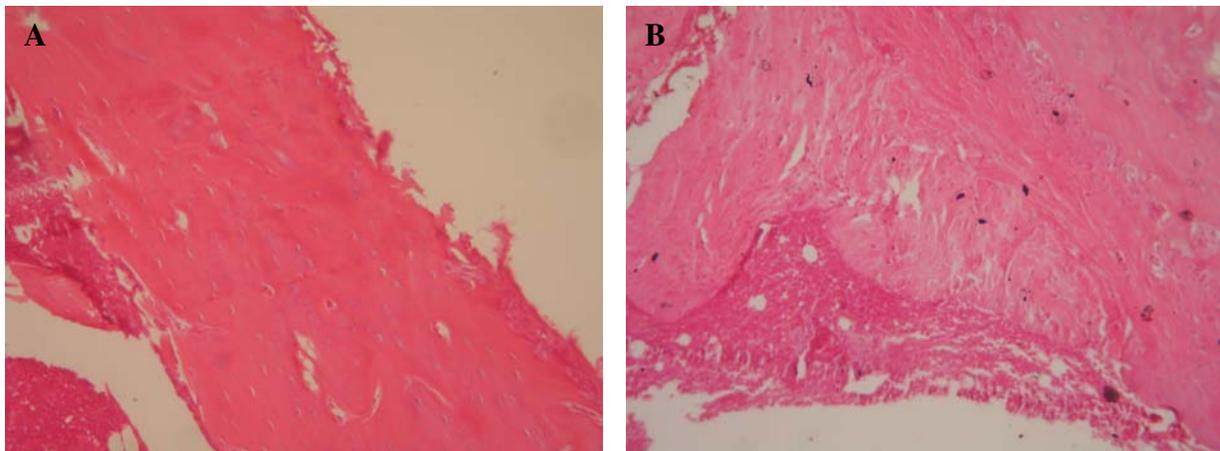


Figura 58: Implantes em tíbia de rato após 60 dias. O tecido ósseo foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) Micrografias do controle (sem material) (Ampliação – 10x). (B) Micrografia do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), formação de tecido ósseo abaixo do material.

Outra pesquisa utilizando cimento a base de zinco em tíbia de coelhos *New Zeland* (Li *et al.*, 2009) observaram que, após 4 semanas, o implante permanece no defeito, porém há uma formação de tecido na superfície do implante, semelhante à formação induzida pelo gel de PCL/AS. Também observaram a presença de osteoblastos e osteoclastos na superfície do osso

neoformado. Outro resultado interessante foi a manutenção da estrutura frente às solicitações mecânicas do animal, a resistência é importante na manutenção do novo tecido ósseo (Bohner, 2004). O gel observado nas fotografias feitas por lupa (Fig. 56) permanece com a mesma morfologia nos diferentes períodos de implantação (30, 60 e 90 dias). Porém, é observada uma diminuição no volume do material após 90 dias. Mas, também se observa uma maior formação de tecido ósseo e este se encontra mais organizado (Fig. 56B).

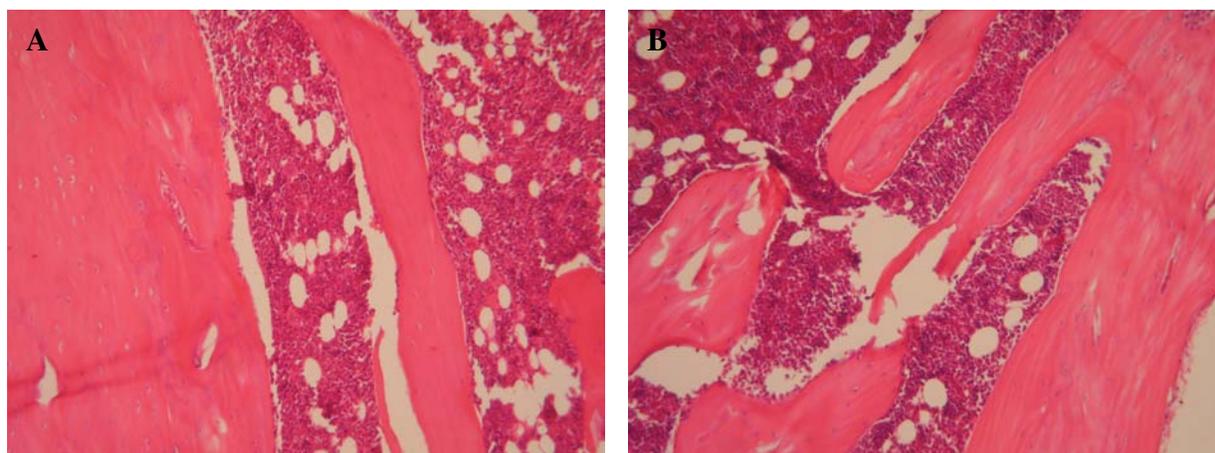


Figura 59: Implantes em tíbia de rato após 90 dias. O tecido ósseo foi processado histologicamente e corado em HE (hematoxilina e eosina). (A) Micrografias do controle (sem material) (Ampliação – 10x). (B) Micrografia do gel de PCL/AS 95:05 (% m/m), formação de tecido ósseo abaixo do material.

Tabela 22: Resultados histopatológicos dos implantes do gel de PCL/AS.

| Histopatologia | Resultados | | |
|---|------------|---------|---------|
| | 30 dias | 60 dias | 90 dias |
| Espessura da cápsula (μm) ^a | 50 | 0 | 0 |
| Presença de tecido necrótico ^b | 0 | 0 | 0 |
| Presença de células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) ^b | 1 | 1 | 1 |
| Grau de maturação do tecido ósseo ^b | 1-2 | 2 | 2-3 |
| Presença de resposta de corpo estranho (células gigantes) ^b | 0 | 0 | 0 |

^a Análise quantitativa.

^b Análise qualitativa.

A Figura 59 demonstra esquematicamente a sequência de eventos celulares após a injeção do gel de PCL/AS. A relação do biomaterial com os macrófagos não foi completamente elucidada através de ensaios imunohistoquímicos, porém estas células estavam presentes no tecido circunvizinho ao material como mostrado nas micrografias de cortes histológicos dos implantes (Fig. 32 e 54).

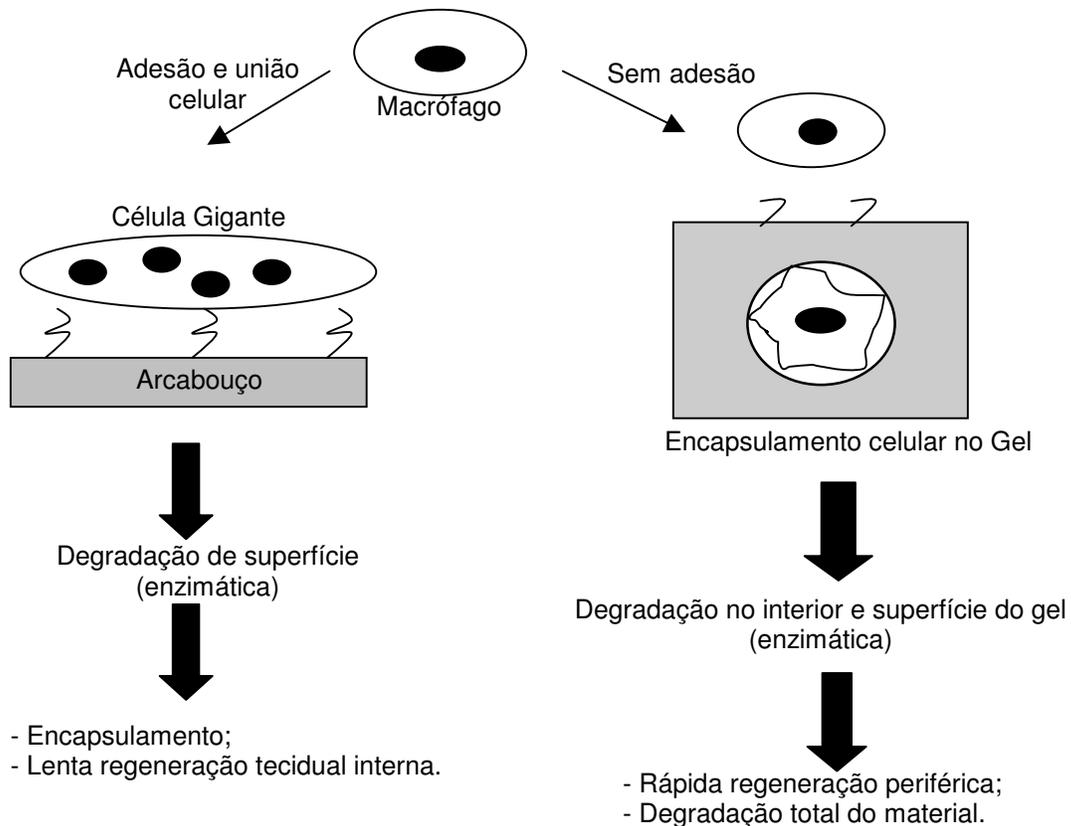


Figura 60: Desenho esquemático da sequência de eventos celulares e de cicatrização após a implantação de arcabouço ou gel de PCL/AS.

De acordo com estudos realizados por outros pesquisadores (Rodrigues *et al.*, 2009a e b) sabe-se que as características hidrofílicas dos materiais podem influenciar nas respostas celulares. Portanto, resumidamente, o arcabouço de PCL/AS seria mais hidrofóbico e levaria a adesão e agregação de macrófagos, gerando as células gigantes. Estas por sua vez promovem a migração de fibroblastos e estes formarão uma cápsula fibrosa circundando o material. No gel de PCL/AS não houve adesão destas células devido a sua característica mais hidrofílica, porém estas células

podem ter migrado para o interior do material, ficando retidas na matriz gel. Estas células seriam levadas à morte e rompimento da membrana plasmática liberando enzimas que podem ter acelerado a taxa de degradação do gel. Portanto, cada material desenvolvido possui características únicas que podem levar a diferentes aplicações em diferentes tecido pela técnica de engenharia tecidual. As conclusões das análises realizadas neste trabalho serão abordadas no próximo capítulo.

Capítulo 6

Conclusões

Nas análises dos arcabouços porosos de PCL/AS pode-se concluir que:

- Os resultados obtidos para a policaprolactona e ácido sebácico (PCL/AS) mostram que a blenda é imiscível.
- A incorporação de AS no PCL reduziu a entalpia e a cristalinidade, porém propiciou uma maior friabilidade do material, com menor resistência mecânica a tração.
- Os arcabouços de PCL/AS mostraram-se citocompatíveis, *in vitro* (contato direto e indireto).
- Foram observadas células com morfologia normal e proliferando (Microscopia Confocal e MEV).
- A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi semelhante ao controle negativo em células mesenquimais de medula óssea humana (hMSC).
- Nas avaliações *in vivo* o biomaterial não induziu a inflamação aguda ou necrose do tecido subcutâneo de ratos Wistar. Também foi observada a formação de tecido conjuntivo na superfície do material.

Nas análises do gel de PCL/AS pode-se concluir que:

- Houve uma redução da cristalinidade da blenda (>50 %), na entalpia e na temperatura de fusão, que pode facilitar o processamento e a degradação do biomaterial.
- O módulo de armazenamento (E') se mostrou aumentado por uma redução na rigidez da blenda em relação ao PCL puro. Houve também um aumento na T_g , porém não houve significativas modificações na T_m .
- Tanto a redução tanto no E' quanto do E'' do gel foi gradual e controlada durante a degradação *in vitro*, em relação as perdas abruptas e desiguais do PCL puro.
- A viabilidade celular do gel de PCL/AS *in vitro* (contato direto e indireto), foi satisfatória (~100 %) em osteoblastos.
- Não foi observado processo de apoptose das células, comparado ao controle negativo.
- Osteoblastos e células mesenquimais de medula óssea foram capazes de apresentaram morfologia normal, proliferaram e secretaram matriz extracelular.
- A atividade de fosfatase alcalina (ALP) mostrou uma redução a partir de 24 h em cultura de mesenquimais de medula humana (hMSC), podendo ser uma marcação de diferenciação celular.
- Foram observados grânulos de calcificação na matriz extracelular das células mesenquimais após 10 dias de incubação com o gel de PCL/AS.
- Na avaliação *in vivo* dos implantes subcutâneos, foi verificada uma leve indução de inflamação nos implantes subcutâneos no período de 30 dias. Não foram observadas outras alterações indesejáveis (necrose, abscesso, etc.). Nos períodos de 60 e 90 dias, o tecido se regenerou não apresentando células inflamatórias.

- Nos implantes intra-ósseos, foi observada a formação de tecido abaixo da matriz polimérica e este tecido apresentava morfologia normal. Não foram observadas reações adversas de inflamação ou de morte celular.

Os resultados mostraram que tanto os arcabouços rígidos da blenda de policaprolactona e ácido sebácico, quanto a sua fórmula em gel possuem grande potencial de aplicação em engenharia tecidual. Cada biomaterial pode ser aplicado para um determinado tipo de tratamento médico ou odontológico. O PCL/AS em gel poderia ser utilizado no preenchimento de ossos com osteoporose avançada. No entanto, o arcabouço poroso de PCL/AS poderia ser utilizado como membrana de proteção cirúrgica para enxertos ósseos em tratamentos de periodontite crônica.

Trabalhos Futuros

As sugestões para trabalhos futuros baseiam-se nas limitações observadas ao longo deste trabalho e na necessidade de melhorar certas características dos arcabouços e do gel. Assim, sugere-se:

1. O estudo de outros polímeros naturais que melhor favoreçam as características da policaprolactona;
2. A possibilidade do uso de outros agentes porogênicos, tanto no arcabouço, quanto no gel;
3. A adição de fatores indutores de diferenciação óssea (ex. BMP) para melhorar a osteoindução da blenda (gel e arcabouço);
4. A confecção de compósitos (ex. β -TCP) para matriz injetável para melhorar as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

Ali, S. A. M., Doherty, P. J., Williams, D. F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices, 2. Poly(DL-lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993, v. 27, p. 1409-1418.

Anderson, J. M. Host Reactions to Biomaterials and Their Evaluation. Biomaterials Science. In: An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press. San Diego, 1996, p. 165-214.

Anderson, D. G.; Burdick, J. A. e Langer, R. Smart. Biomaterials. *Science*, 2004 v. 305, p. 1923-24.

American Society for Testing and Materials (ASTM F1408). Standard practice for subcutaneous screening test for implant materials. West Conshohocken, PA, ASTM, 1997, 4 p.

American Society for Testing and Materials (ASTM F895). Practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical Devices. West Conshohocken, PA, ASTM, 1995, p. 233-36.

American Society for Testing and Materials (ASTM D882): Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. West Conshohocken, PA, ASTM, 2002.

Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A.; Kawasaki, N.; Yamamoto, N. Synthesis and study of novel biodegradable oligo(ester amide)s based on sebacic acid, octadecanedioic acid, 1,6-hexanediamine and ϵ -caprolactone: 2. *Polymer*, 1995, v. 36, n. 4, p. 857-66.

Ashton, B.; Abdullah, F.; Cave, J.; Williamson, M.; Couch, M.; Poser, J. Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: preliminary assessment of their osteogenicity. *Bone*, 1985, v.6, p. 313-319.

Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Porous and dense poly(L-lactic acid) membranes: in vitro degradation. *Acta Microscopica*, 2002, v.11, (1), p. 85-89.

Barrias, C.C.; Lamghari, M.; Granja, P.L.; Sá Miranda, M.C.; Barbosa, M.A. Biological evaluation of calcium alginate microspheres as a vehicle for the localized delivery of a therapeutic enzyme. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2005, v. 72, n. 1, p. 57-66.

Bayley, P. J. Sponge implants as models. *Methods in Enzymology*, 1988 162, p.327-34.

Bohner, M. *Biomaterials*, 2004, v.25, p.741.

Boyan, B.D.; Hummert, T.W.; Dean, D.D.; Scharz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 1996, v. 17, p. 137-46.

Brandrup, J.; Immergut, E.H. *Polymer Handbook*. 3rd ed. Nova York: Wiley; 1989.

Bruder, S.P.; Jaiswal, N.; Haynesworth, S.E. Growth Kinetics, Self-Renewal, and the Osteogenic Potential of Purified Human Mesenchymal Stem Cells During Extensive Subcultivation and Following Cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1997, v.64, p.278–294.

Burkersroda, F., Schedl, L., Göpferich, A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, 2002, v.23, p. 4221-4231.

Canevarolo, S. V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. Editora Artber, São Paulo, 2004, 448p.

Chan, CK.; Chun, IM. Crystalline and dynamic mechanical behaviors of synthesized poly(sebacic anhydride-co-ethylene glycol). *Biomaterials*, 2003, v. 24, p. 47-54.

Chang, D.T.; Jones, J.A.; Meyerson, H.; Colton, E.; Kwon, I.K.; Matsuda, T.; Anderson, J.M.. Lymphocyte/macrophage interactions: Biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, p. 676-87.

Chen, D. R., *et al.* Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polymer Degradation and Stability*, 2000, v.67, p.455-459.

Chu, C. C., Biodegradable Polymeric Biomaterials: an Update Overview. In: *The Biomedical Engineering Handbook*, 2a ed., CRC Press, 1999, pp. 41.

Coelho, M. B., Soarez, I. R. e Pereira, M. M. Estruturas macroporosas de vidro bioativo para cultura de células do tecido ósseo. *Anais do CEBCIMAT*, nov, 2002.

Coombes, A.G.A.; Rizzi, S.C.; Williamson, M.; Barralet, J.E.; Downes, S.; Wallace, W.A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, 2004, v.25, p. 315-25.

Costa, C.A.; Hebling, J.; Garcia-Godoy, F.; Hanks, C.T. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements, *Biomaterials*, 2003, v.24, n.21, p.3853-3858.

Evangelista, M.B.; Hsiong, S.X.; Fernandese, R.; Sampaio, P.; Kong, H-J.; Barrias, C.C.; Salem, R.; Barbosa, M.A.; Mooney, D.J.; Granja, P.L. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials*, 2007, v.28, p.3644–3655.

Freed, L. E., Marquis, J. C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A. G., Langer, R. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultures on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993, v.27, p. 11-23.

Friedenstein, A.J.; Chailakhyan, R.K.; Latsinik, N.V.; Panasyuk, A.F.; Keiliss-Borok, I.V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*, 1974a, v.17, p.331-40.

Friedenstein, A.J.; Deriglazova, U.F.; Kulagina, N.N.; Panasuk, A.F.; Rudakowa, S.F., Luria, E.A.; Ruadkow, I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol*, 1974b, v.2, p.83-92.

Goeckner, H.; Jonuleit, T.; Lemke, HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar blue. *J. Immunol. Meth*, 2001, v. 252, p. 131-38.

Gopferich, A. Polymer Bulk Erosion. *Macromolecules*, 1997, v.30, p.2598-2604.

Gryglewicz, S. Lipase catalysed synthesis of sebacic and phthalic esters. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, v.33, p.952-957.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J. Immunol. Methods*, 1989, v.119, p.203-210.

Hench, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, 1998, v. 19, p. 1419-23.

Hench, L. L. Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Science*, 2009, v. 29, p. 1257-65.

Hench, L. L. & Polak, J. M. Third –Generation Biomedical Materials. *Science*, 2002, v. 295, p. 1014-1017.

Hench, L. L. Biocompatibilidade, Bioatividade e Engenharia de Tecidos. In: *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. Editora Cultura médica, Rio de Janeiro, R.J., 2006, p. 481-506.

Hollister, S.J.; Lin, C.Y.; Saito, E.; Lin, C.Y.; Schek, R.D.; Taboas, J.M.; Williams, J.M.; Partee, B.; Flanagan, C.L.; Diggs, A.; Wilke, E.N.; Van Lenthe, G.H.; Muller, R.; Wirtz, T.; Das, S.; Feinberg, S.E.; Krebsbach, P.H. Engineering craniofacial scaffolds. *Orthod. Craniof. Res.*, 2005, v-8, p. 162-73.

Hou, Q.; De Bank, P.A.; Shakesheff, K.M. Injectable scaffolds for tissue regeneration, *J. Mater. Chem.*, 2004, v.14, p.1915–1923.

Huang, W., Carlsen, B., Wulur, I., Rudkin, G., Ishida, K., Wu, B., Yamaguchi, D. T., Miller, T. A. BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and is required for in vitro bone formation in a PLGA scaffold. *Experimental Cell Research*, 2004, v.299, pp. 325-334.

Huang, M.H.; Suming, L. Vert, M. Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of ϵ -caprolactone and DL- lactide. *Polymer*, 2004, v. 45, p. 8675-81.

Huang, J.W., Chen, W.J.; Liao, S.K.; Yang, C.Y., Lin, S.S.; Wu, C.C. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore. *Chang Gung Med J.*, 2006, v.29, p.363-72.

Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000, v.21, . 2529-2543.

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

Jabbari, E.; Wang, S.; Lu, L.; Gruetzmacher, J.A.; Ameenuddin, S.; Hefferan, T.E.; Currier, B.L.; Windebank, A.J.; Yaszemski, M.J. Synthesis, Material Properties, and Biocompatibility of a Novel Self-Cross-Linkable Poly(caprolactone fumarate) as an Injectable Tissue Engineering Scaffold. *Biomacromolecules*, 2005, v. 6, p. 2503-11.

Jameela, S.R.; Suma, N.; Jayakrishnan, A. Protein release from poly(ϵ -caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. *Journal Biomaterials Science*, 1997, v.8, n.6, p.457-66.

Jeong, S. I., Kim, S. H., Kim, Y. H., Jung, Y., Kwon, J. H., Kim, B. S., Lee, Y. M. Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2004, v.15, pp. 645-660.

Jones, J.A.; Chang, D.T.; Meyerson, H.; Colton, E.; Kwon, K.; Matsuda, T.; Anderson, J.M.. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, p.585-596.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10^a edição, 2004, 540p.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. *Biologia Celular e Molecular*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 8^a edição, 2005, 352p.

Kellomäki, M. & Tormala, P. Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissueengineering scaffolds. *Methods in Molecular Biology*, 2004, v.238, p. 1-10.

Kesel, C.; Levefre, C.; Nagy, C.D. Blends of polycaprolactone with polyvilyl alcohol: a DSC, optical microscopy and solid state NMR study. *Polymer*, 1999, v.40, p.1969-78.

Khor, H. L.; Schantz, J. T.; Phan, T-T.; Lim, T. C.; Teoh, S. H.; Hutmacher, D. W. Poly(ϵ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering na epidermal equivalent. *Materials Science and Engineering*, 2002, v.20C, p. 71-75.

Kim, H-W.; Knowles, J. C.; Kim, H-E. Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*, 2004, v.25, p. 1279–1287.

Kirkpatrick, C.J. & Deeker, A. Quantitative evaluation of cell interaction with biomaterials in vitro. *Adv. Biomat.*, 1992, v. 10, p. 31-41.

Kweong, H.Y.; Yoo, M.K.; Park, I.K.; Kim, T.H.; Lee, H.C.; Lee, H-S.; Oh, J-S.; Akaike, T.; Cho, C-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, v.24, p.801-808.

Kretlow, J.D.; Klouda, L.; Mikos, A.G. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, v.59, p. 263–273.

Laine, P.; Kontio, R.; Lindqvist, C.; Suuronen, R. Are there any complications with bioabsorbable fixation devices? A 10 years review in orthognathic surgery. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 2004, v.33, p. 240-244.

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

Langer, R. Tissue Engineering. *Molecular Therapy*, 2000, v.1, p.12.

Le-Ray, A-M.; Chiffolleau, S.; Iooss, P.; Grimandi, A.; Gouyette, A.; Daculsi, G.; Merle, C. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles, for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. *Biomaterials*, 2003, v.24, p.443-49.

Li, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, v.48, n.3, p. 342-353.

Li, W-J., Tuli, R., Okafor, C., Derfoul, A. Danielson, K. G., Hall, D. J., Tuan, R. S. A threedimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2005, v. 26, p. 599–609.

Li, X.; Sogo, Y.; Ito, A.; Mutsuzaki, H.; Ochiai, N.; Kobayashi, T.; Nakamura, S.; Yamashita, K.; LeGeros, R.Z. The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo. *Materials Science and Engineering*, 2009, v.C 29, p.969–975.

Lucas, E.F.; Soares, B.G.; Monteiro, E. Caracterização de Polímeros, determinação peso molecular e análise térmica. Ed. E-papers, Rio de Janeiro, 2001, 365p.

Luciano, R. M., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R., Alberto–Rincon, M. C. Synthesis and characterization of poly(L-lactic acid) membranes: studies in vivo and in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2003, v.14, p. 87-94.

Luttikhuisen, D.T.; Hamsen, M.C.; van Luyn, M.J. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Engineering*, 2006, v.12, p.1955–1970.

Martina, M.; Subramanyam, G.; Weaver, J.C.; Hutmacher, D.W.; Morse, D.E.; Valiyaveetil, S. Developing macroporous bicontinuous materials as scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2005, v.26, p.5609-5616.

Manrich, S. Processamento de termoplástico: Rosca única, extrusão & matrizes, injeção & moldes. Artber Editora, São Paulo, 2005, 431p.

Mantovani, A. Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas. *Blood*, 2006, v.108, n.2, p.408-409.

Mayer, U.; Szulczewski, D.H.; Moeller, K.; Heide, H.; Jones, D.B. Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials surfaces. *Cells Mater.*, 1993, v. 3, p. 129-40.

Modi, S.; Jain, J.P.; Domb, A.J.; Kumar, N. Copolymers of pharmaceutical grade lactic acid and sebacic acid: Drug release behavior and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, v.64, p.277-286.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*, 1983, v.65, p.55-63.

Murugan, R., Ramakrishna, S. Production of ultra-fine bioresorbable carbonated hydroxyapatite. *Acta Biomaterials*, 2006, v.2, p.201-6.

Muschler, J. F., Nakamoto, C.; Griffith, L.G. Engineering Principles of Clinical. Cell-Based Tissue Engineering The Journal of Bone and Joint Surgery, 2004, v.86-A, n.7, p.1541-57.

Nagata, M.; Messoro, M.; Okamoto, R.; Campos, N.; Pola, N.; Esper, L.; Sbrana, M.; Fucini, S.; Garcia, V.; Bosco, A. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: An immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone*, 2009, in press.

Natta, G. Stereospecific polymerizations by means of coordinated anionic catalysis : Introductory Lecture. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 1958, v.8, p.589-611.

Ogawa, R.; Mizuno, H.; Watanabe, A.; Migita, M.; Shimada, T. And Hyakusoku, H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biopchem. Biophys. Res. Comm.* 2004, v.313, p.871-877.

Ogawa, R.; Mizuno, H.; Hyakusoku, H.; Watanabe, A.; Migita, M. And Shimada, T. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J. Nippon Med. Sch.*, 2004, v.71, p.240-241.

Parenteau, N.L. Cells. In: *Tissue Engineering Research*. International Technology Research Institute. Baltimore, Maryland, 2002.

Paynea, Richard G.; Yaszemskib, Michael J.; Yaskoc, Alan W.; Mikos, Antonios G.. Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 1. Encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles. *Biomaterials*, 2002, v.23, p.4359–4371.

Pena, J.; Corrales, T.; Izquierdo-Barba, I.; Doadrio, A. L.; M. Vallet-Regi. Long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids. *Polymer Degradation and Stability*, 2006, v.91, p.1424-1432.

Raimo, M. Kinematic analysis of growth and coalescence of spherulites for predictions on spherulitic morphology and on the crystallization mechanism, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, v.32, p.597–622.

Ratner, B.D. New ideas in biomaterials science a path to engineered biomaterials. *J. Biomed. Mat. Res.*, 1993, v.27, p. 837-850.

Ratner, B. D.; Hoffman, A.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, London, 1995.

Rezwan, K., *et al.* Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, v.27, p.3413-3431.

Rodriguez, A.; Voskerician, G.; Meyerson, H.; MacEwan, S.R.; Anderson, J.M.. T cell subset distributions following primary and secondary implantation at subcutaneous biomaterial implant sites *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, p.556-65.

Rodriguez, A.; MacEwan, S.R.; Meyerson, H.; Kirk, J.T.; Anderson, J.M.. The foreign body reaction in T-cell-deficient mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, p.106-113a.

Rodriguez, A.; Meyerson, H.; Anderson, J.M. Quantitative in vivo cytokine analysis at synthetic biomaterial implant sites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, p. 152-59

Roether, J. A.; Boccaccine, A. R.; Hench, L. L.; Maquet, V.; Gautier, S. e Jerome, R. Development and in vitro characterization of novel bioabsorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, v. 23, p. 3871-78.

Sabolinski, M.; Alvarez, O.; Auletta M.; Mulder, G.; Parenteau, N. L. Cultured skin as a “smart material” for healing wounds. Experience in venous ulcers. *Biomaterials*, 1996, v.17, p.311-320.

Saldana, V. & Grande, D.A., Extracellular matrix protein gene expression of bovine chondrocytes cultured on resorbable scaffolds. *Biomaterials* 2000, v.21, p.2427-2431.

Saltzman, W.M. Cell interaction with polymers. In: Lanza, R.P.; Langer, R.; Vacanti, J. editors. *Principles of tissue engineering*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 221-35.

Santos, C.A.; Freedman, B.D.; Leach, K.J.; Press, D.L.; Scarpulla, M.; Mathiowitz, E. Poly(fumaric-co-sebacic anhydride): a degradation study as evaluated by FTIR, DSC, GPC and X-ray diffraction. *Journal of Controlled Release*, 1999, v.60, p.11-22.

Sawyer, A.A.; Song, S.J.; Susanto, E.; Chuan, P.; Lam, C.X.F.; Woodruff, M.A.; Hutmacher, D.W.; Cool, S.M. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL–TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials*, 2009, v. 30, p.2479–2488.

Serrano, M.C.; Pagani, R.; Vallet-Regí, M.; Peña, J.; Rámila, A.; Izquierdo, I.; Portolés, M.T. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, 2004, v.25, p.5603-11.

Schweikl, H. & Schmalz, G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines, *Eur. J. Oral Sci.*, 1996, v.104, n.3, p.292-299.

Shikanov, A.; Vaisman, B.; Krasko, M.Y.; Nyska, A.; Domb, A.J. Poly(sebacic acid-co-ricinoleic acid) biodegradable carrier for paclitaxel: *In vitro* release and *in vivo* toxicity. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, v.69, p.47-54.

Shikanov, A. & Domb, A. Poly(sebacic acid-co-ricinoleic acid) Biodegradable Injectable in Situ Gelling Polymer. *Biomacromolecules*, 2006, v. 7, p. 288-96.

Sibilia, J.P. A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis. Nova York: VHC Publishers, Inc., 1988. 318p.

Sletten, G.B.G. & Dahl, J.E. Cytotoxicity effects of extract of compomers, *Acta Odontol. Scand.*, 2003, v.57, p.316-322.

Slivniak, R. & Domb, A.J. Stereocomplexes of Enantiomeric Lactic Acid and Sebacic Acid Ester-Anhydride Triblock Copolymers. *Biomacromolecules*, 2002, v.3, p.754-760.

Smith, P.K.; Krohon, R.I.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anl.Biochem.*, 1985, v.150, p. 76-85.

Suggs, L.J.; Shive, M.S.; Garcia, C.A.; Anderson, J.M.; A.G. Mikos, In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of poly(propylene fumarate-coethyleneglycol) hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, v.46, p.22–32.

Sun, H. M.; Mei, L.; Song, S.; Cui, S.; Wang, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*, 2000, v.27, p.1735–1740.

Sung, H-J.; Meredith, C.; Johnson, C.; Galis, Z. S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*, 2004, v.25, p. 5735-5742.

Tamada, J. A. & Langer, R. Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1993, v.90, n.2, p. 552-556.

Temenoff, J.S. & Mikos, A.G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*, 2000, v.21, p.2405-2415.

Uludag, H.; Horvath, V.; Black, J.P.; Sefton, M.V. Viability and protein secretion from human hepatoma (HepG2) cells encapsulated in 400- μ m polyacrylate microcapsules by submerged nozzle-liquid jet extrusion. *Biotech. Bioeng.*, 1994, v.44, p.1199–204.

US Pharmacopeia. Biological reactive tests in vitro. US Pharmacopeia 23. Rockville, United State Pharmacopeial Convention Inc., 1995, p. 1697-1699,.

Valerio, P.; Pereira, M.P.; Goes, A.M.; Leite, M.F. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 2004, v.25, p.2941-48.

Vermes, I.; Haasen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger. A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J. Immunol. Meth.*, 1995, v. 184, p. 39-51.

Vert, M. & Li, M. S., Spenlehauer, G., Guerin, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science*, 1992, v.3, p. 432-436.

Wang, S.; Lu, L.; Gruetzmacher, J.A.; Currier, B.L.; Yaszemski, M.J. Synthesis and characterizations of biodegradable and crosslinkable poly(ϵ -caprolactone fumarate), poly(ethylene glycol fumarate), and their amphiphilic copolymer. *Biomaterials*, 2006, v.27, p.832-841.

Wang, S.; Kempen, D.H.R.; Yaszemski, M.J.; Lu, L. The roles of matrix polymer crystallinity and hydroxyapatite nanoparticles in modulating material properties of photo-crosslinked composites and bone marrow stromal cell responses. *Biomaterials*, 2009, v.30, p.3359–3370.

Wetton, R.E. Dynamic mechanical Thermal Analysis of Polymers and Related Systems. In> Dawkins, J.V. (Ed.) Development in Polymer Characterization. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, v.5, p. 179-221.

Williams, J. M.; Adewunmi, A.; Schek, R. M.; Flanagan, C. L.; Krebsbach, P. H.; Feinberg, S. E.; Hollister, S. J.; Das, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, 2005, v.23, p.4817-4827.

Wilkins, Lm.; Watson Sr.; Prosky, Sj. et al. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotech. Bioeng.* 1994, v.43, p.747-756.

Xynos, I. D.; Edgar, A.J.; Buttery, L.D.; Hench, L.L.; Polak, J.M. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, v. 276, p.461-5.

Zielinski, BA.; Goddard, MB.; Lysaght, MJ. Immunoisolation. In: Lanza RP, Langer R, Chick WL, editors. *Principles of tissue engineering*. Austin: R.G. Landes, 1997. p. 323–32.

Yamada, N.; Uchinuma, E.; Kuroyanagi, Y. Clinical evaluation of an allogenic cultured dermal substitute composed of fibroblasts within a spongy collagen matrix. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hands Surg.*, 1999, v.33, p.147-154.

Capítulo 8

Anexos

8.1 Resultados de DSC dos Arcabouços de PCL/AS

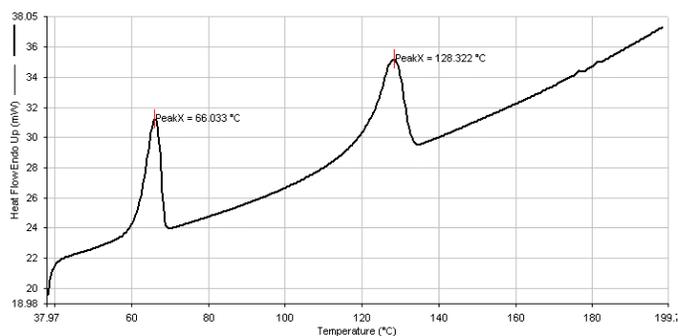


Figura 61: Curva de DSC do arcabouço da blenda de PCL/AS 50:50 (% m/m). A faixa de temperatura utilizada foi de 25-200 °C com um aumento de 10 °C/min.

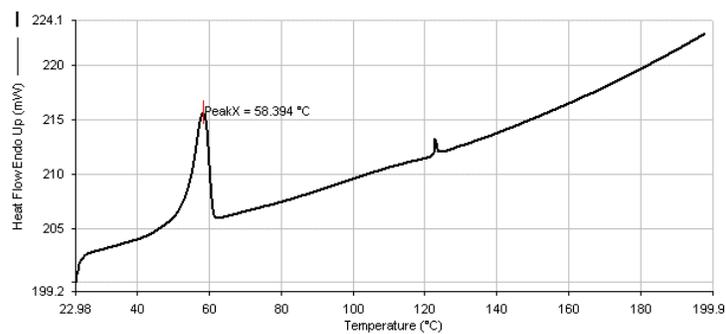


Figura 62: Curva de DSC do arcabouço de PCL/AS 70:30 (% m/m). A faixa de temperatura utilizada foi de 25-200 °C com um aumento de 10 °C/min.

8.2 Resultados de MEV dos Géis de PCL/AS

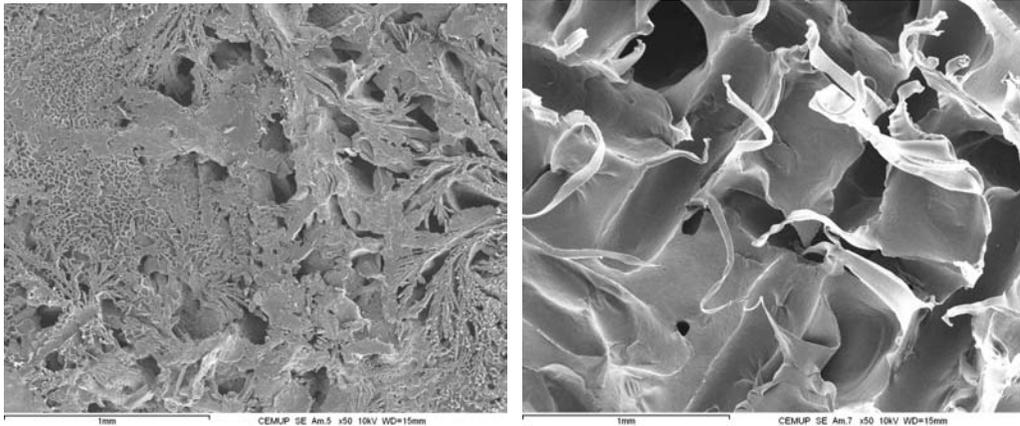


Figura 63: Amostras de PCL/AS (70:30, % m/m) gel sem degradação (direita) e com 30 dias de degradação fotografados no MEV (50x).

8.3 Resultados de Análise de Ângulo de Contato dos Arcabouços de PCL/AS

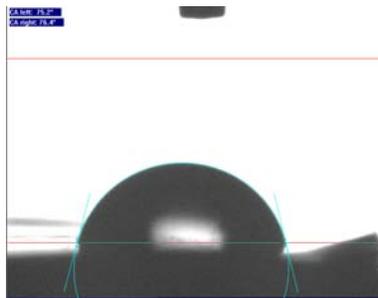


Figura 64: Análise de ângulo de contato de PCL puro.

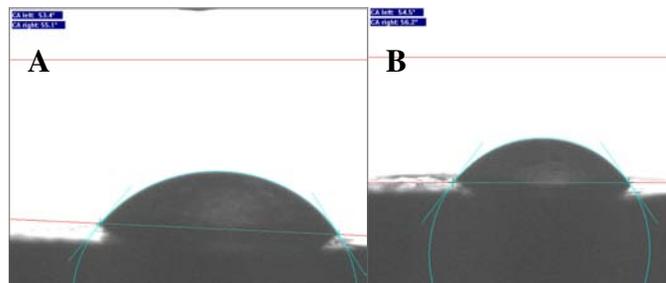


Figura 65: Análise de ângulo de contato do arcabouço de PCL/AS. (A) PCL/AS 80:20 % m/m (B) PCL/AS 80:20 tratado com NaCl 0,1M.

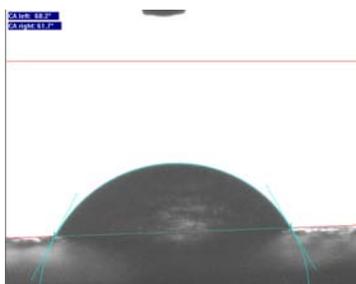


Figura 66: Análise de ângulo de contato de PCL/AS 90:10 % m/m.

8.4 Resultados de Citotoxicidade por Contato Direto dos Arcabouços de PCL/AS

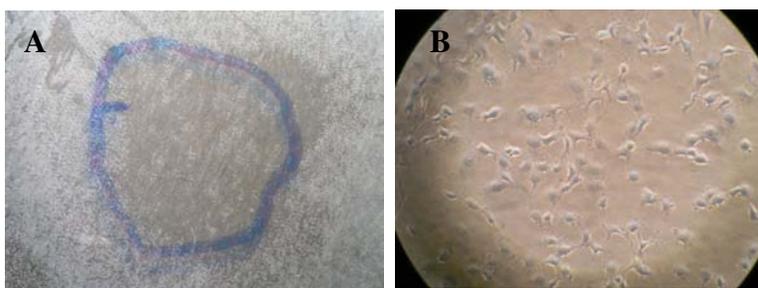


Figura 67: Fotografias de ensaio de teste do contato direto do arcabouço da blenda PCL/AS 70:30 (% m/m) com osteoblastos (MG63). (A) A área demarcada corresponde aos limites do material. (B) Imagem de microscopia óptica(100x).

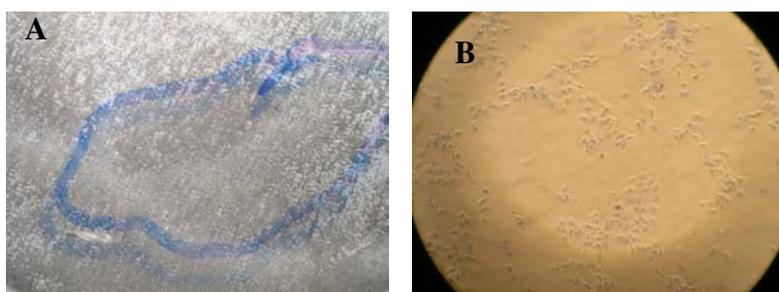


Figura 68: Fotografias de ensaio de teste do contato direto de PCL/AS 50:50 (% m/m) com osteoblastos (MG63). (A) A área demarcada corresponde aos limites do material. (B) Imagem de microscopia das células da área de contato (100x).

8.5 Resultados de Citometria de Fluxo

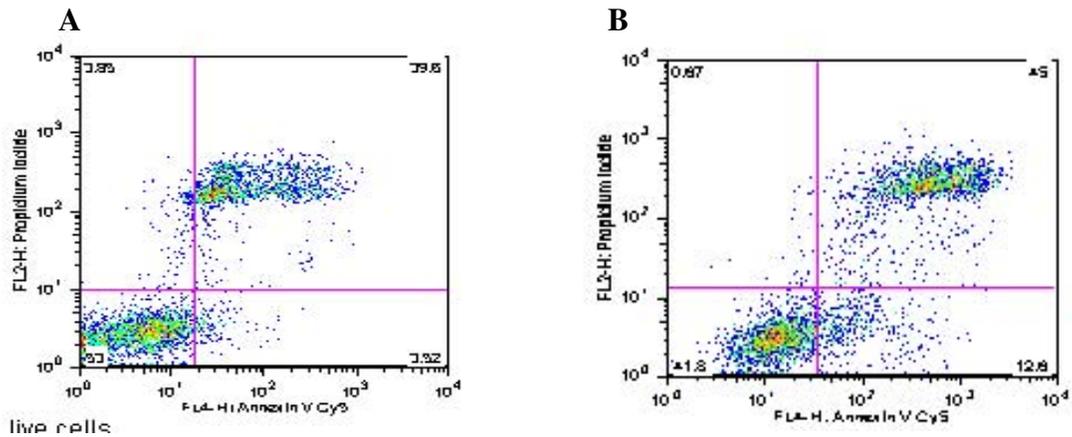


Figura 69: (A) Controle de citometria de fluxo de células MG63 incubadas por 24 h. (B) Citometria de fluxo de células MG63 incubadas por 24 h com gel de PCL/AS 95:05 (% m/m).

8.6 Resultados de MEV de Cultura de MG63 em Arcabouços de PCL/AS

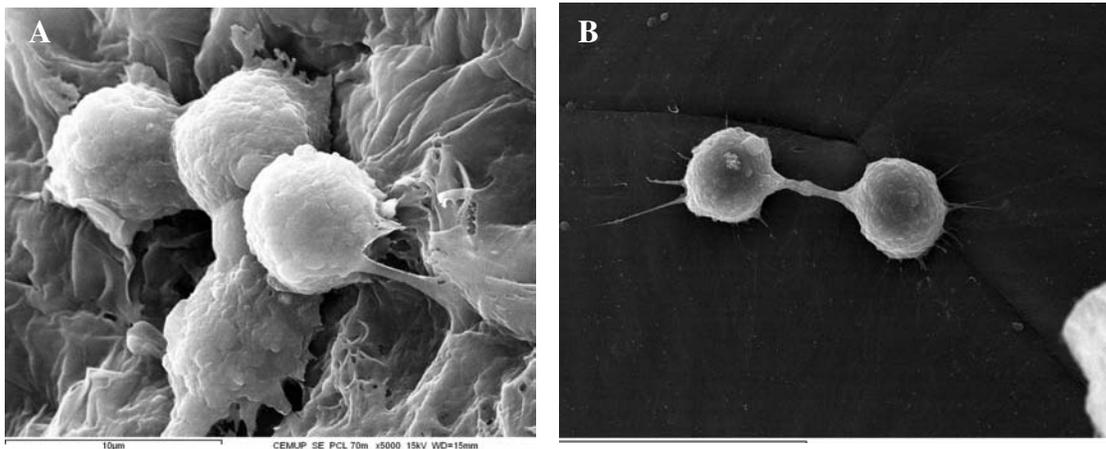


Figura 70: Micrografias dos arcabouços porosas poliméricas incubadas com osteoblastos (MG63) por 7 dias. (A) PCL/AS 70:30 (% m/m) (500x), (B) PCL/AS 50:50 (% m/m) (500x).

**8.7 Projeto Aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade de Biologia da UNICAMP
(CEEA 1534-2)**

Protocolo

nº1534-2

(versão atualizada abril/2008)

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

**Atenção: este formulário deverá ser preenchido, impresso e encaminhado a CEEA/IB-
Unicamp, localizada no Instituto de Biologia. Não é necessário envio de projeto de pesquisa.**

1. Finalidade: Pesquisa Controle de qualidade químico/biológico

2. Data: Início 01 / 08 / 2008 Término 01 / 05 / 2009

3. Pesquisador(es)

Executor: Christiane Laranjo Salgado
Nome do Orientador Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
(em caso de alunos)
Faculdade/Instituto: Faculdade de Engenharia Mecânica
Departamento: Departamento de Materiais
Telefone/Ramal: 13327 Fax: E-Mail: christiane@fem.unicamp.br

Colaboradores: Ana Beatriz Albino de Almeida, PhD – Sociedade Brasileira de
Pesquisa e Assistência para Reabilitação Craniofacial
(SOBRAPAR)

Agência Financiadora:

4. Título do Projeto

(em português): **Matrizes tridimensionais aplicadas em engenharia de tecido ósseo**

(em inglês): Threedimensional matrices for bone tissue engineering

5. Objetivo(s) da Pesquisa:

Existe planejamento estatístico? Sim Não

Qual o critério usado para definir o tamanho da amostra?

Planejamento Estatístico

Número de animais/grupo: 7

Nº de grupos: 6

Especificar cada Grupo:

Atividade Osteogênica: Grupo controle (7), Grupo implante (7) – sacrifício após 4 semanas;

Grupo controle (7), Grupo implante (7) – sacrifício após 8 semanas; Grupo controle (7), Grupo implante (7) – sacrifício após 12 semanas;

Atividade Antiinflamatória: Grupo controle (7), Grupo implante (7) – sacrifício após 4 semanas; Grupo controle (7), Grupo implante (7) – sacrifício após 8 semanas; Grupo controle (7), Grupo implante (7) – sacrifício após 12 semanas;

Os animais utilizados para medir a atividade osteogênica não serão os mesmos para avaliar a atividade inflamatória, estes animais receberão uma injeção subcutânea contendo o gel a base do polímero (policaprolactona e ácido sebácico), já os animais da atividade osteogênica receberão o gel do mesmo material dentro do osso.

Quantidade total de animais: 84

7.2. Condições de manutenção

Biotério onde será mantido o animal: SOBRAPAR

Número de animais/gaiola: 5
especificar

Ambiente de contenção: gaiola baia jaula Outro: _____

Tipo de cama: maravalha estrado Outra: _____

Água:

| | | |
|----------|---|---|
| Filtrada | <input type="checkbox"/> Sim | <input checked="" type="checkbox"/> Não |
| Clorada | <input checked="" type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |

Autoclavada Sim Não
Destilada/Deionizada Sim Não

Alimentação:

Ração industrial Sim Não Qual: Nuvilab
Suplemento Sim Não Qual:

Dieta Específica: _____
(especificar)

8. Procedimentos Experimentais

Jejum Sim Não Duração: _____ (horas)
Especificar
Restrição hídrica: Sim Não Duração: _____ (horas)
Especificar
Imobilização do animal: Sim Não Como: _____
especificar

Anestesia: Sim Não Nome genérico Ketamina cloridrato (10%) e Xilasina cloridrato (2%)
Dose: 85 mg/Kg e 12 mg/Kg Via: Intramuscular
respectivamente
(expressar a concentração em mg/kg)

Cirurgia: Sim Não Como: Administração subcutânea do material e implante do material em defeito ósseo produzido na tibia
especificar

Recuperação pós-clínica Sim Não Duração: 4, 8 ou (semanas)
12

Usará analgésico Sim Não Nome genérico Dipirona sódica
Dose: 500mg/mL Via: Oral (gavagem)

Justificar o não uso do analgésico:

Usará antibiótico Sim Não Nome genérico Flotril (2,5%) - Enrofloxacino
Dose: 25 mg/mL Via: Intramuscular

O experimento é específico para:

| | | | | |
|----------|--------------------------|-----|-------------------------------------|-----|
| Dor | <input type="checkbox"/> | Sim | <input checked="" type="checkbox"/> | Não |
| Estresse | <input type="checkbox"/> | Sim | <input checked="" type="checkbox"/> | Não |
| Anorexia | <input type="checkbox"/> | Sim | <input checked="" type="checkbox"/> | Não |

Observação :

Para qualquer um dos três itens acima envie cópia de 2 (dois) trabalhos referentes a mesma metodologia empregada, preferencialmente de autores não envolvidos nesse projeto.

Resumo do procedimento experimental e justificativa da finalidade do uso de animais em caso de executar experimentos que envolvem dor, estresse ou anorexia:

Exposição a agentes químico/físico/biológico/mecânico:

Sim Não Qual: _____
Especificar

Dose/Tempo: _____
Especificar

Extração de fluídos:

Sim Não Qual: _____
Especificar

Via: _____ Volume: _____
Especificar Especificar

Extração de órgãos:

Sim Não Qual(is): Tíbia da perna operada
Especificar

Inoculação de substâncias, drogas, medicamentos ou outros:

Sim Não Qual: Gel de Polímero biodegradável a base de policaprolactona e ácido sebácico
Especificar

Via: subcutânea Dose/frequência: 1
Especificar Especificar

9. Destino dos Animais

Re-aproveitado Sim Não Como: _____
especificar

Morte:

| | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Deslocamento cervical | <input type="checkbox"/> | Decapitação |
| <input type="checkbox"/> | Perfusão sob anestesia | <input type="checkbox"/> | Aprofundamento da anestesia |
| <input type="checkbox"/> | Exsanguinação sob anestesia | <input type="checkbox"/> | Halotano |
| <input type="checkbox"/> | * CO ₂ | <input type="checkbox"/> | concussão |
| <input type="checkbox"/> | Outros | _____ especificar | |

* descrever o sistema da câmara de CO₂ detalhando o fluxo e se há mistura com ar.

10. Resumo do Procedimento Experimental

Serão administrados nos animais ketamina (85mg/kg, i.m) e xilasina (12 mg/kg, i.m.). A parte interior da tíbia será exposta e um defeito de formato oval será produzido (2x3mm) na parte distal aproximadamente 10 mm da região final proximal da tíbia com o uso de uma broca. 1 a 1,5 mL de gel de polímero a base de policaprolactona e ácido sebácico será inserido nessa região. Como controle será realizado o mesmo procedimento sem administração de substância. Em ambos defeitos serão retirados a medula óssea. Os animais serão sacrificados após 4, 8 e 12, semanas após a cirurgia. Em relação aos ensaios subcutâneos a substância será administrada no dorso do animal para verificar reação inflamatória, e os sacrifício segue o mesmo cronograma mencionado anteriormente.