



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

**Sabrina Dick**

**Produção e Avaliação de Arcabouços de  
Poli-hidroxi-alcanoatos para  
Bioengenharia de Cartilagem Humana**

Rio de Janeiro

Setembro de 2009.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

# **Produção e Avaliação de Arcabouços de Poli-hidroxi-alcanoatos para Bioengenharia de Cartilagem Humana**

**Sabrina Dick**

TRABALHO APRESENTADO AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO, COMO PRÉ-REQUISITO PARA  
OBTENSÃO DO GRAU DE DOUTOR.

**ORIENTADORES:** PROF. RADOVAN BOROJEVIC  
PROF. LEONARDO RODRIGUES ANDRADE

**Rio de Janeiro**

**2009**

D547a

Dick, Sabrina.

**Produção e Avaliação de Arcabouços de Poli-hidroxi-alcanoatos para Bioengenharia de Cartilagem Humana /** Sabrina Dick; orientador, Radovan Borojevic; co-orientador, Leonardo Rodrigues Andrade – Rio de Janeiro, 2009. xiii, 67p.

Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, 2009.

Orientador: Radovan Borojevic

Co-Orientador: Leonardo Rodrigues Andrade

1. Bioengenharia. 2. Cartilagem. 3. Poli-hidroxi-alcanoatos. 4. Células-tronco. I. Borojevic, Radovan (Orient.). II. Andrade, Leonardo Rodrigues. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. IV. Título.

CDU: 576

**EXAMINADORES**

Dr. José Mauro Granjeiro  
**Instituto de Biologia, UFF**

Dra. Glória de Almeida Soares  
**Metalmat – COPPE - UFRJ**

Dra. Maria Isabel Doria Rossi  
**ICB - UFRJ**

---

Dra. Márcia Cury El-Cheikh  
**ICB - UFRJ; *Suplente interno***

Dra. Valéria de Mello Coelho  
**ICB - UFRJ; *Revisora e Suplente externo***

---

Dr. Radovan Borojevic  
**UFRJ; *Orientador***

Dr. Leonardo Rodrigues Andrade  
**UFRJ; *Co-Orientador***

---

Dr. Vivaldo Moura Neto  
**UFRJ; *Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas (PCM)***

Às minhas amadas mãe e irmã, Vera Olinda Scherer e Priscila Dick, que apesar da saudade, nunca me deixaram desistir.

Ao meu avô, Estevão Ordy Scherer, *in memoriam*.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, inicialmente, ao querido Mestre e orientador, Professor Radovan Borojevic, pela honra e grande prazer que tive de fazer parte de seu grupo de pesquisa. O senhor é um exemplo de retidão, simpatia e competência.

À minha colega e grande amiga Fernanda Matias, do Departamento de Microbiologia – ICB - USP, que foi a verdadeira “culpada” por eu trabalhar com polímeros naturais e por eu ter me aventurado a morar no Rio de Janeiro. Obrigada, amiga, por abrir meus horizontes.

À Márcia Sader, da COPPE, que me ajudou a entender melhor e a trabalhar com PHB. Sua experiência foi valiosa.

À Lea Maria de Almeida Lopes, à Márcia Regina Benzi e à Bárbara Maria da Cunha Regis, do LAPIN – IMA, pela presteza na realização das análises térmicas dos polímeros. Pelas suas imensas paciências em me explicar todos aqueles dados, que pra mim não faziam nenhum sentido, e pelas suas amizades.

À colega e grande amiga Jaiesa Zich. Foi um alento ter uma amiga que gosta de chimarrão no Rio de Janeiro, para amenizar a saudade da “terrinha”. Obrigada pelas conversas, pela companhia e, principalmente, por sua amizade.

À minha prima e “segunda-mãe” Maria Elizabeth Rosa Scherer. Obrigada pelo colo, por cuidar de mim, pela sua amizade e dedicação sem fim. Tudo que você fez não tem preço. Você é preciosa!

À minha cadelinha Neneca, que resistiu bravamente à minha falta de tempo para brincar e me deu todo seu amor incondicional que só um cão é capaz de dar. É muito bom saber que vai ter um rabinho agitado me esperando ao voltar para casa, feliz só por me ver.

Ao meu co-orientador Leonardo Rodrigues Andrade, que me ensinou muito sobre microscopia eletrônica; e ao Professor Marcos Farina de Souza, pelo seu apoio científico.

À revisora deste trabalho e minha “mãe-científica-adotiva” Dra Valéria de Mello Coelho. Não tenho palavras para agradecer toda a colaboração e apoio que me deste gratuitamente durante boa parte deste trabalho. Sua amizade é inestimável.

À Professora Maria Eugênia Leite Duarte, do INTO, e demais integrantes do seu laboratório que colaboraram nas coletas e processamentos de cartilagens humanas.

Ao Professor Marcos Lopes, do IMA – UFRJ, e a todos do seu laboratório, que nos permitiram e ajudaram a utilizar alguns equipamentos para otimizar o trabalho com os polímeros.

À Tatiana Faria Pereira, aluna da Professora Rossana Mara da Silva Moreira Thiré que gentilmente me cedeu alguns horários no microscópio eletrônico da COPPE. Sem sua ajuda, esta Tese não teria terminado no prazo.

À Maria Gorete Lima de Carvalho e à Edna Aleixo dos Santos pela atenção e amizade. Sem vocês, o laboratório não seria o mesmo.

À Tânia Regina Pontes Cordeiro, da Secretaria de Pós-Graduação e ao Professor Vivaldo Moura Neto, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas (PCM). Agradeço muito a vocês pelo empenho e por não terem desistido de mim junto ao CNPq.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e em especial ao Ministro da Ciência e Tecnologia, Dr. Sérgio Resende, e ao Dr. José Roberto Drugovich – CNPq, pelo apoio nas questões burocrático-administrativas relacionadas à minha bolsa de estudos.

A ACECIL - Central de Esterilização Com. Ind. Ltda., localizada em Campinas / SP, que realizou todas as esterilizações com Óxido de Etileno gratuitamente para esta pesquisa e em especial ao Sr. Manoel Marcos Quattrer, nosso contato na empresa.

A todos os membros dos Laboratórios de Proliferação e Diferenciação Celular, de Biomineralização e de Patologia Celular, do Departamento de Histologia e Embriologia; do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Departamento de Biofísica; e do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica – LABMIC/ METALMAT/ COPPE/ CT.

E a todos aqueles que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento desta Tese.



"As grandes idéias são aquelas nas quais a única coisa que nos surpreende é que não nos tivessem ocorrido antes. "

**Noel Clarasó**

"A ciência serve para nos dar uma idéia de quão extensa é a nossa ignorância."

**Félicité Robert de Lamennais**

"Você pode ficar segundos sem ar, horas sem água, dias sem comida e uma vida sem respostas."

**Autor Desconhecido**

"Façamos uma lista de nossas certezas. Descobrimos o tamanho de nossa incerteza?"

**Marcia Angelita Tiburi**

**RESUMO**

Dick, Sabrina. **Produção e Avaliação de Arcabouços de Poli-hidroxi-alcanoatos para Bioengenharia de Cartilagem Humana**. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

Problemas nas cartilagens articulares são comuns, dolorosos e de difícil tratamento com as técnicas atualmente disponíveis. A bioengenharia de tecidos tem se mostrado muito promissora na medicina regenerativa, em especial no reparo de lesões nas cartilagens hialina. Os Poli-hidroxi-alcanoatos (PHA) são polímeros termoplásticos biodegradáveis que vêm apresentando bons resultados como arcabouços para a bioengenharia. Nós produzimos arcabouços porosos 3D de P3HB, PHBV e 4 novas blendas denominadas I29B1, I29B2, I29B5 e I29B6, para experimentação *in vitro* e *in vivo*. Devido às dificuldades de obtenção de condroblastos autólogos, as culturas de células-tronco mesenquimais são uma importante fonte alternativa de células. Neste trabalho, condroblastos articulares e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (condro-induzidas) humanos foram cultivadas *in vitro* nos arcabouços de PHA's para avaliar e comparar os materiais quanto a sua capacidade de manter a morfologia arredondada das células e da produção de matriz extracelular pelas células em tais condições. Para o estudo da resistência *in vivo* dos polímeros e a resposta do tecido hospedeiro, implantamos os arcabouços subcutaneamente em camundongos Swiss por 01, 04 e 12 semanas. Os arcabouços produzidos apresentaram poros interconectados e homoganeamente distribuídos, indicando condições adequadas para seu uso em ensaios de bioengenharia. Ambas as células cultivadas apresentaram morfologia esférica em nosso sistema tridimensional de cultura sugerindo a preservação do fenótipo celular pretendido, fator crucial para o sucesso da regeneração de cartilagem. A presença de algumas estruturas fibrilares próximas às células pode ainda indicar a possibilidade de produção de matriz extracelular. Na experimentação *in vivo*, não observamos significativa reação inflamatória local, e

sob luz polarizada em MO, a refração das paredes dos arcações mostra a resistência temporal do polímero. Assim, de acordo com nossos dados os novos PHA's estudados neste trabalho apresentam bom potencial para serem utilizados sob a forma de arcações 3-D para a bioengenharia de cartilagem em medicina regenerativa.

**ABSTRACT**

Dick, Sabrina. **Produção e Avaliação de Arcabouços de Poli-hidroxi-alcanoatos para Bioengenharia de Cartilagem Humana. (Production and avaluation of Poly-hydroxi-alkanoates scaffolds for Human Cartilage Bioengineering)** Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

Articular cartilage problems are common, painful and difficult to be treated by currently available techniques. The tissue bioengineering has been promising results in regenerative medicine, especially in injuries repair of hyaline cartilage. Poly-hydroxy-alkanoates (PHA) are thermoplastic biodegradable polymers that recently are presenting good results as scaffold for bioengineering. We produced 3-D porous scaffolds of P3HB, PHBV and others novel blends called I29B1, I29B2, I29B5 and I29B6, to *in vitro* and *in vivo* experiments. Because of restricted autologus chondrocyte donor areas, use of mesenchimal stem cells is a good alternative source of cells. In this work, human articular chondroblast and human adipose derived mesenchimal stem cells (chondro-induced) were seeded and cultured *in vitro* in our 3-D PHA's constructs for 07 days to evaluate and compare the potential of the scaffolds to maintain round cell morphology and, possibly, the extracellular matrix production by cells. To study polymer temporal resistance *in vivo* and host tissue response, scaffolds were subcutaneously implanted in Swiss mice for 01 or 04 weeks. Our scaffolds presented interconnected pores homogeneously distributed, thus indicating appropriate conditions for bioengineering assays. Round chondrocytes and human chondro-induced adipose derived mesenchimal stem cells was present inside all scaffolds suggesting that their phenotype might be preserved in these conditions, which is crucial to the success of cartilage regeneration. The presence of some fibrillar structures near some cells, can indicate the possibly of extra cellular matrix production. In addition, at *in vivo* experiments, no significant inflammatory reaction was locally observed

and the refringence of scaffold walls could be evidenced by polarized OM indicating that these biopolymers have enough temporal resistance. Conjointly, our data support that our novel PHA 3-D scaffolds have potential to be used for cartilage bioengineering in regenerative medicine.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ad-MSC - Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells)

CGP – Cromatografia de Gel Permeação

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry)

MAPC – Células Adultas Progenitoras Multipotentes (Multipotent Adult Progenitor Cells)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Óptica

MSC – Células-tronco Mesenquimais (Mesenchymal Stem Cells)

Mw – Peso Molecular

PGA – Ácido Poli-Glicólico

PHA – Poli-Hidroxi-Alcanoato

PLGA - Ácido Poli-Glicólico-co-Poli-L-Lático

PLLA – Ácido Poli-L-Lático

PHALCL ou lcl-PHA - Poli-Hidroxi-Alcanoato de cadeia longa (long chain length)

PHAMCL ou mcl-PHA - Poli-Hidroxi-Alcanoato de cadeia média (medium chain length)

PHASCL ou scl-PHA - Poli-Hidroxi-Alcanoato de cadeia curta (short chain length)

P3HB ou PHB - Poli-3-Hidroxi-Butirato ou apenas Poli-Hidroxi-Butirato

P4HB - Poli-4-Hidroxi-Butirato

PHBHHX - Poli-Hidroxi-Butirato-co-Hexanoato

PHBV ou P3HB-3HV - Poli-Hidroxi-butirato-co-Valerato

PHD - Poli-Hidroxi-Decanoato

PHDd - Poli-Hidroxi-Dodecanoato

$\Delta$ PHDd - Poli-Hidroxi-Dodecanoato insaturado

PHHp - Poli-Hidroxi-Heptanoato

PHHx - Poli-Hidroxi-Hexanoato

PHN - Poli-Hidroxi-Nonanoato

PHO - Poli-Hidroxi-Octanoato

P3H4P - Poli-3-Hidroxi-4-Pentanoato

PHV - Poli-Hidroxi-Valerato

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TAL – Tecido Adiposo de Lipoaspirado

T<sub>c</sub> – Temperatura de Cristalização

T<sub>g</sub> – Temperatura de Transição Vítreia

TGA – Análise termogravimétrica (Thermogravimetric Analysis)

T<sub>m</sub> – Temperatura de Fusão

TA – Tecido Adiposo

## **SUMÁRIO**

<b><u>1 INTRODUÇÃO</u></b> .....	1
1.1. Bioengenharia de Tecidos.....	1
1.2. Biomateriais utilizados em Bioengenharia Tecidual.....	2
1.2.1. Poli-Hidroxi-Alcanoatos.....	3
1.3. Tecido Cartilaginoso.....	7
1.3.1. Lesões em cartilagens hialinas.....	10
1.4. Células – Tronco.....	12
1.4.1. Células – Tronco Adultas.....	12
1.4.2.a. Células –tronco de Tecido Adiposo.....	13
<b><u>2 OBJETIVOS</u></b> .....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
<b><u>3 METODOLOGIA</u></b> .....	16
3.1. Produção do PHA's .....	16
3.2. Caracterização dos PHA's.....	17
3.2.1 Análises Físico-Químicas .....	17
3.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	18
3.2.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	18
3.3. Preparação de membranas e arcabouços 3-D de PHA's.....	19
3.3.1. Dissolução dos PHA's.....	19
3.3.2. Produção de membranas de PHA's.....	19
3.3.3. Produção de estruturas porosas 3-D de PHA's.....	20
3.4 Testes <i>in vivo</i> de interação de arcabouços 3D com tecido hospedeiro.....	21
3.5. Isolamento e cultura de condroblastos humanos.....	21
3.6. Isolamento e cultura das Ad-MSCs humanas.....	22
3.7. Culturas celulares sobre os biomateriais.....	22
3.8. Preparo das culturas celulares nos arcabouços de PHA's para observação por microscopia óptica – Histologia .....	23



3.9. Preparo das culturas celulares nos arcabouços de PHA's para observação por MEV .....	24
3.10 Quantificação das células nos arcabouços de PHA's.....	24
<u>4 RESULTADOS</u> .....	25
4.1. Caracterização dos polímeros – Composição monomérica e peso molecular.....	25
4.2 Caracterização dos polímeros – Propriedades térmicas.....	25
4.3 Caracterização morfológica das membranas e arcabouços de PHAs através de MEV.....	27
4.4 Avaliação da biocompatibilidade <i>in vitro</i> das membranas de PHA's utilizando condroblastos humanos.....	28
4.5 Avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> dos arcabouços 3D de PHA's.....	31
4.6 Avaliação da estabilidade fenotípica de condroblastos humanos cultivados <i>in vitro</i> em arcabouços 3D de PHA's de diferentes porosidades.....	33
4.7 Avaliação da interação das Ad-MSc humanas com arcabouços 3D de PHA's de diferentes porosidades, condro-induzidas <i>in vitro</i> .....	37
<u>5 Discussão</u> .....	40
5.1 Características físico-químicas dos novos PHA's.....	40
5.2 PHA's como arcabouços para a bioengenharia de cartilagem.....	42
5.3 Condroblastos e Ad-MSc para a bioengenharia de cartilagem.....	46
<u>6 CONCLUSÕES</u> .....	49
<u>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	50

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Bioengenharia de Tecidos**

A Bioengenharia de Tecidos é uma nova área da ciência que visa alternativas de tratamento para diversas enfermidades ou para a reparação de tecidos danificados. As estratégias de tratamentos baseados na implantação de biomateriais celularizados possuem grande potencial na prática da medicina reparadora, trazendo grandes inovações para o tratamento de doenças comuns como infarto do miocárdio, diabetes, queimaduras de pele, osteoartrites, dentre outras (Alsberg *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003). Além disso, as técnicas utilizadas na Bioengenharia permitem investigar, em laboratório, as relações entre estrutura e função, associadas à formação de um novo tecido, contribuindo para o sucesso do tratamento clínico específico (Shin *et al.*, 2003).

Há três importantes objetos relacionados com a Bioengenharia de Tecidos: as células, o arcabouço ou matriz de material biocompatível e os fatores bioativos. Para a funcionalidade de biopróteses, precisamos aliar tipos celulares específicos a polímeros biocompatíveis e, preferencialmente, biodegradáveis, que formem o arcabouço que irá carrear as células para o local do implante (Lu *et al.*, 2001; Alsberg *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003).

As células utilizadas nesses tratamentos podem ser células diferenciadas específicas, isoladas a partir de biópsias, ou células progenitoras que possuam capacidade de se diferenciar no tipo celular de interesse sob condições específicas. De maneira geral, as células são expandidas em cultura e, após a formação do novo tecido funcional, são re-implantadas no paciente, de forma que se restabeleçam as funções normais. Muitas das células utilizadas em processos de Bioengenharia precisam ser cultivadas em arcabouços tridimensionais para a manutenção do fenótipo característico (Lu *et al.*, 2001; Alsberg *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003). Um exemplo de célula que necessita do arcabouço 3D são as células de cartilagem, os condrócitos. Quando essas células são mantidas em monocamada sobre uma placa de cultivo, elas perdem suas formas esféricas

características e param de produzir moléculas específicas da matriz cartilaginosa, como colágeno tipo II, passando, então, a produzir o colágeno tipo I. No entanto, quando cultivados em arcabouços tridimensionais (3D), os condrócitos mantêm seu fenótipo diferenciado (Tememoff & Mikos, 2000).

O arcabouço ou matriz 3D atua como substrato para adesão, proliferação, migração celular, e também como suporte mecânico para a formação do novo tecido, proporcionando espaço definido e limitado para o desenvolvimento do tecido artificial, induzindo o processo de regeneração do tecido lesado (Shin *et al.*, 2003; Sittinger *et al.*, 2004).

Os biomateriais utilizados como arcabouço celular, podem ainda ser utilizados como carreadores de fármacos ou fatores bioativos que modulam funções celulares específicas e com a expressão do fenótipo desejado (Shin *et al.*, 2003). Existem diferentes materiais que estão sendo testados e utilizados para estes fins, mas apenas os ácidos poli-láctico (PLLA), poli-glicólico (PGA) e seus copolímeros - o ácido poli-co-glicólico-láctico (PLGA) - possuem autorização pela agência do governo americano, *Food and Drug Administration* (FDA), para uso em humanos (Tememoff & Mikos, 2000). No Brasil, o poli-3-hidroxi-butilato (P3HB), um dos nossos objetos de estudo, encontra-se em fase de aprovação, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como embalagem de cosméticos e alimentos, mas ainda sem requerimento de aprovação de uso médico animal ou humano.

## **1.2 Biomateriais utilizados em Bioengenharia Tecidual**

Os biomateriais, de uma maneira geral, são diferentes tipos de dispositivos que são utilizados para substituição ou reparação de um tecido lesado. Os biomateriais podem ter origem sintética ou biológica. Os de origem biológica são isolados de diferentes organismos como bactérias, algas, corais, plantas e alguns animais. São exemplos de biomateriais biológicos: colágenos, agar, alginato, ácido hialurônico, poli-hidroxi-alcanoatos, dentre outros. Os sintéticos são originados principalmente, de produtos do refino do petróleo ou de misturas de diferentes

compostos químicos. Como exemplos, podem ser citados: ácidos poli-láctico e poli-glicólico, fosfatos e carbonatos de cálcio, caprolactona, silicone, dentre outros (Alsberg *et al.*, 2002; Köse *et al.*, 2005).

A escolha do biomaterial ideal é de fundamental importância para o sucesso do tratamento. Fatores como composição química, biocompatibilidade, produtos e tempo de degradação no organismo, propriedades mecânicas e forma de apresentação (gel, membrana ou arcabouço) devem ser previamente conhecidos para escolha do biomaterial adequado a cada tipo de tecido. O arcabouço ideal precisa ser de material moldável, com porosidade controlada, e na maioria das vezes, possuir poros interconectados para facilitar o crescimento e migração celular, além de possibilitar o transporte de nutrientes e metabólitos. Ainda, precisa ser biocompatível e muitas das vezes bioabsorvível, com degradação controlada e com taxa de absorção compatível com o crescimento celular/tecidual *in vitro* ou *in vivo*; e ter sua superfície quimicamente modificável para induzir a adesão, proliferação e diferenciação celular; além de ter propriedades mecânicas compatíveis com o tecido e o local de implantação (Hutmacher, 2000).

Os biomateriais estudados neste trabalho são os poli-hidroxi-alcanoatos, família de materiais que tem se mostrado muito promissora, haja vista os resultados já publicados na literatura (Volova *et al.*, 2003; Shishatskaya *et al.*, 2004; Martin e Williams, 2003; Ying Deng, 2003; Novikov *et al.*, 2002).

### **1.2.1 Poli-Hidroxi-Alcanoatos**

Os Poli-hidroxi-alcanoatos (PHAs) são polímeros poliésteres naturais, termoplásticos e biodegradáveis. Eles são sintetizados e acumulados em grânulos intracelulares por uma grande variedade de microorganismos como reserva de energia e de carbono (Poirier *et al.*, 1995; Anderson e Dawes, 1990) podendo apresentar até 90% da massa seca total da célula (figura 1) (Anderson & Dawes, 1990; Poirier *et al.*, 1995; Lenz & Marchessault, 2005).

Esses grânulos são sintetizados na presença de excesso de fonte de carbono sob condições limitadas de crescimento, devido ao esgotamento de

nutrientes essenciais (Park *et al.*, 2002). Dependendo das condições de crescimento, da espécie de organismo e da fonte de carbono, diferentes tipos de moléculas podem ser produzidos.

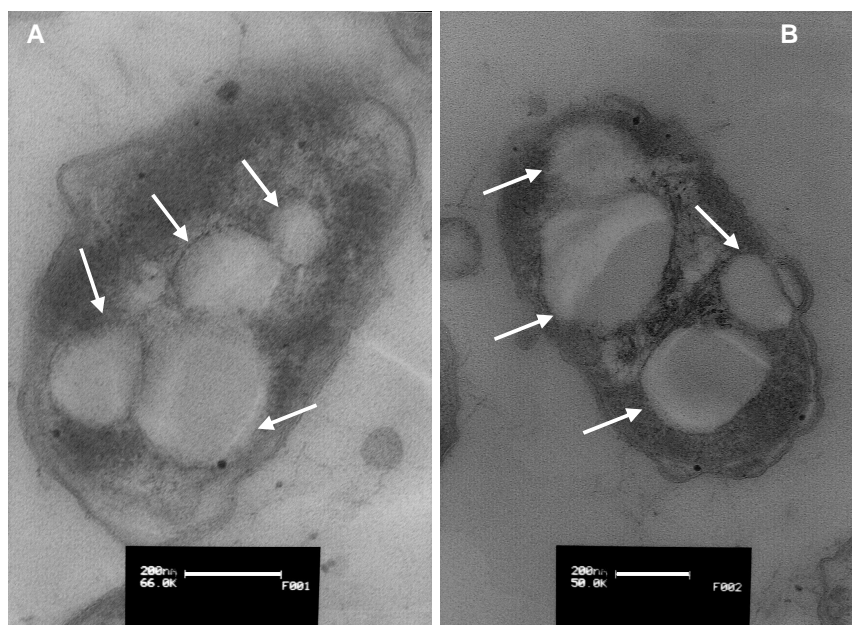


Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão da bactéria *Burkholderia contaminans* I29B cultivada em glicose/caseína. A e B demonstrando o acúmulo de polímeros na linhagem (setas). (barra corresponde a 200nm) (Matias, F; 2009)

A família dos PHA's é dividida em dois grandes grupos: os PHA's de cadeia curta ou SCL (*short chain length*) representados pelas siglas scl-PHA ou PHASCL que contém de 3 a 5 carbonos em sua molécula; e os de cadeia média ou MCL (*medium chain length*), representados pelas siglas mcl-PHA ou PHAMCL que contém de 6 a 16 carbonos em sua molécula. Embora ainda não tenham sido descritos, propõe-se a classificação dos monômeros de PHA em cadeias longas ou LCL (*long chain length*) se estes possuírem um número igual ou superior a 17 moléculas de carbono (Steinbüchel & Valentin, 1995).

O membro mais comum do grupo dos scl-PHA's, o poli-3-hidroxi-butilato (P3HB ou apenas PHB), com monômero constituído de 4 carbonos, foi identificado na década de 1920 por Lemoigne como substância de reserva em microorganismos (Müller e Seebach, 1993). Mas só recentemente, a importância e distribuição desses biopolímeros vêm se esclarecendo. Pesquisas em meados de

1990, mostraram que o P3HB não é exclusivo de procariotos, ocorrendo também nas membranas celulares de vários animais e plantas (Reusch, 1992; Müller e Seebach, 1993).

O P3HB tem sua estrutura química composta por átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio, possuindo cadeia lateral com CH<sub>3</sub> no radical R, como mostrado na figura 2.

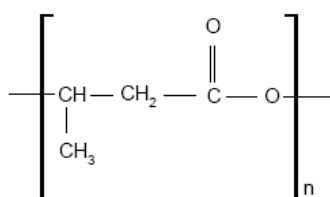


Figura 2. Fórmula estrutural da unidade monomérica de PHB.

Outros PHA's também muito estudados são o poli-4-hidroxi-butilato (P4HB - com 4 carbonos), o poli-hidroxi-valerato (PHV - com 5 carbonos), o poli-hidroxi-hexanoato (PHHX - com 6 carbonos) e o poli-hidroxi-octanoato (PHO - com 8 carbonos). Em geral, todos esses monômeros são produzidos naturalmente na forma de co-polímeros com o P3HB, e quanto maior a cadeia de carbonos, mais difícil é sua produção. O co-polímero PHBHHX (Poli-hidroxi-butilato-co-hidroxi-hexanoato) é um dos mais estudados para aplicações médicas (Chen & Wu, 2005) e é um dos PHA's que possui maior número de patentes tanto para a produção quanto para a aplicação médica (ESPACENET, 2009).

O tipo de monômero formador do polímero e/ou a combinação de diferentes monômeros influencia diretamente nas características químicas e mecânicas do material. O homopolímero de P3HB é cristalino, rígido e relativamente hidrofóbico, e como consequência, possui tempo de degradação *in vivo* na ordem de alguns anos (Lenz & Marchessault, 2005). Já o co-polímero formado por poli-3-hidroxi-butilato e poli-3-hidroxi-valerato (P3HB-3HV) possui propriedades semelhantes ao polipropileno, podendo ser termoplasticamente moldado e processado em folhas, fibras e objetos tridimensionais. Quando na proporção de 70% de P3HB/ 30% de P3HV (PHBV) é mais flexível que o P3HB e degrada-se mais rapidamente (Müller e Seebach, 1993). Assim, manipulando as proporções e os polímeros utilizados, pode-se adequar o biomaterial ao seu uso.

O P3HB, o PHBV e o PHBHHX são produzidos em escala comercial por algumas companhias que fazem plásticos biodegradáveis, sendo encontrados no mercado mundial (Shimao, 2001). Entre suas aplicações comerciais estão: matéria-prima de frascos e embalagens não poluentes, cápsulas para liberação gradual de pesticidas e herbicidas na agricultura, e como biomateriais para bioengenharia na medicina veterinária e humana (Müller e Seebach, 1993).

No Brasil, a produção de PHA começou a ser discutida e estudada somente partir de 1990. Em 1995, Rodrigues isolou, selecionou e caracterizou linhagens do gênero *Burkholderia* capazes de acumular poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) e poli-3-hidroxi-4-pentenoato (P3H4P) a partir de sacarose (Rodrigues, 1995). Em 2000, Bonatto isolou a linhagem 61A6 de *Ralstonia pickettii* que se mostrou bastante promissora para produção de bioplástico em escala industrial utilizando-se como fonte de carbono melação de cana-de-açúcar (Bonatto *et al.*, 2004).

Testes *in vitro* têm demonstrado que o PHB é compatível com vários tipos celulares, incluindo as epiteliais, osteoblásticas e condroblásticas (Zhao Kai *et al.*, 2003). Os PHAs não possuem toxicidade para o hospedeiro porque os produtos de degradação são componentes encontrados naturalmente nos tecidos (Reusch *et al.*, 1992), e por isso, vêm sendo testados como pele artificial, material de sutura cirúrgica (Volova *et al.*, 2003; Shishatskaya *et al.*, 2004), arcabouço em bioengenharia cardíaca e arterial como válvulas, implantes celularizados, *stents* e *patches* (Martin e Williams, 2003; Ying Deng, 2003), reparo de nervos periféricos (Novikov *et al.*, 2002), placas e pinos ortopédicos (Ying Deng, 2003), barreira oclusiva em extrações dentárias (Gotfredsen *et al.*, 1994), em cápsulas para microdispersão controlada de fármacos (Kang *et al.*, 2001; Martin e Williams, 2003) e como arcabouço para cultura de células, como fibroblastos, para implantes teciduais (Kang *et al.*, 2001). Já mostrou-se, também, a manutenção fenotípica de condrócitos cultivados em arcabouços 3-D de PHBHHx (poli-hidroxi-butirato-co-poli-hidroxi-hexanoato) (Ying Deng *et al.*, 2003) com a respectiva expressão de proteínas específicas de matriz extracelular (Ying Deng *et al.*, 2002).

Os PHA's investigados neste trabalho foram produzidos a partir de cepas bacterianas isoladas de solo do estado do Rio Grande do Sul. Os polímeros PHB

e PHBV foram produzidos pela bactéria *Alcaligenes eutrophus* e os demais polímeros foram produzidos pela linhagem bacteriana *Burkholderia contaminans* I29B que de acordo com a combinação de fontes de carbono produziu os 4 polímeros diferentes aqui denominados I29B1, I29B2, I29B5 e I29B6. Entre os polímeros produzidos, destacamos o I29B2 e o I29B6, por terem apresentado quantidades significativas de PHDd, nunca antes produzido utilizando-se fontes de carbono não relacionadas ao produto polimérico final. O PHDd, possui propriedades cristalinas e elastoméricas únicas que o tornam ainda mais promissor que os demais para a bioengenharia de tecidos.

### **1.3 Tecido Cartilaginoso**

O tecido conjuntivo cartilaginoso desempenha função de suporte mecânico para outros tecidos e reveste as superfícies articulares, absorvendo choques e facilitando o deslizamento entre ossos longos (Gartner & Hiatt, 2002). Existem três tipos de tecido conjuntivo cartilaginoso no corpo: hialino, elástico e fibrocartilaginoso. A cartilagem hialina, nosso tecido de interesse, é a mais abundante e pode ser encontrada nas superfícies articulares da maioria dos ossos; nos anéis da traquéia e nas cartilagens laríngea, nasal, dentre outras (Gartner & Hiatt, 2002). A cartilagem hialina articular, a qual recobre a superfície das articulações dos ossos, é um tecido relativamente rígido que sofre pequenas deformações devido às forças de compressão geradas durante os movimentos (Fig. 3) (Carvalho & Collares-Buzato, 2005). O tecido não apresenta vasos sanguíneos, vasos linfáticos ou nervos, e a nutrição dos condrócitos e o transporte dos seus metabólitos se faz por difusão através da matriz extracelular e dependem do líquido sinovial (Temenoff *et al.*, 2000; Carvalho & Collares-Buzato, 2005).



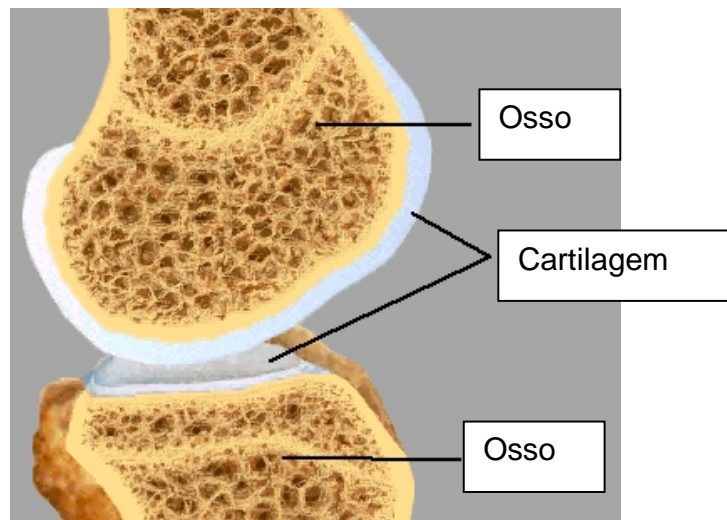


Figura 3. Localização das cartilagens hialinas na articulação do joelho. (Imagem modificada de <http://www.the-health-pages.com/images/artic0.jpg>)

A cartilagem possui poucas células (condroblastos e condrócitos) que se dividem lentamente e contribuem pouco para o volume total do tecido, aproximadamente 2 % na cartilagem articular adulta humana ou  $10^4$  células/mm<sup>3</sup> de cartilagem (Temenoff *et al.*, 2000). As células permanecem completamente envolvidas em abundante matriz extracelular sintetizada pelos próprios condrócitos, que possui moléculas específicas como os colágenos tipo II (90%), VI, IX, X, XI, agrecanas (condroitin 4-sulfato + condroitin 6-sulfato + queratan sulfato + proteína ligadora de proteoglicana + cerne de ácido hialurônico), fibronectina, tenascina, ancorina CII, condronectina, biglicana, decorina e fibromodulina. (Saldanha & Grande, 2000; Temenoff *et al.*, 2000; Gartner & Hiatt, 2002)(Figura 4).

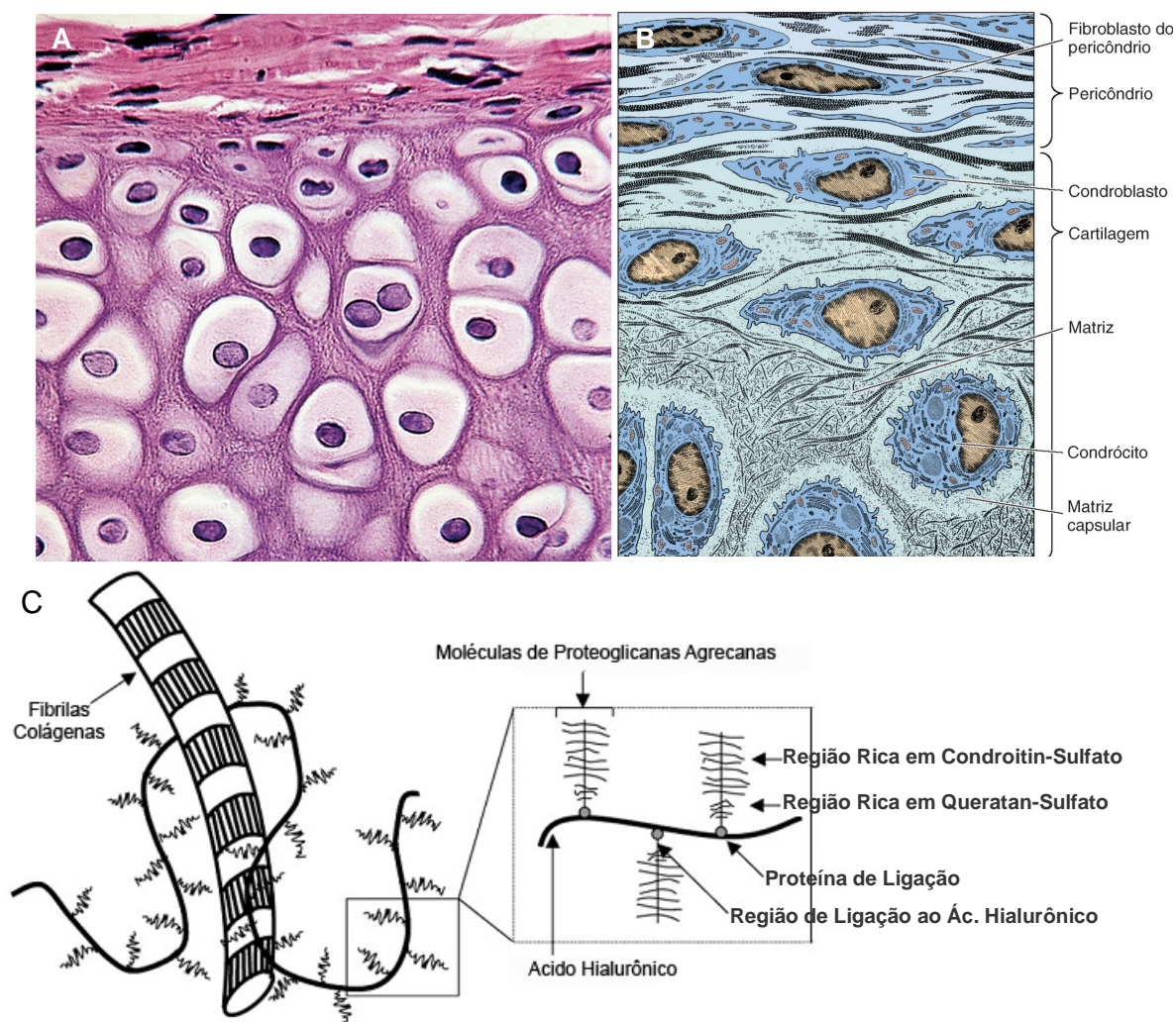


Figura 4. A. Fotomicrografia da cartilagem hialina evidenciando os condrócitos localizados nas lacunas da matriz extracelular. Na parte superior o pericôndrio aparece corado em rosa. Coloração HE. Pequeno aumento. B. Esquema da área de transição entre o pericôndrio e a cartilagem hialina. À medida que se diferenciam em condrócitos, as células alongadas do pericôndrio tornam-se globosas e sua superfície, irregular. A matriz da cartilagem contém fibrilas colágenas muito finas (colágeno tipo II), exceto na matriz capsular (região na periferia dos condrócitos), onde a matriz consiste principalmente em proteoglicanos. (adaptado de Junqueira & Carneiro; 2008). C. Desenho esquemático da matriz extracelular da cartilagem, composta de proteoglicanos ligados em hastes de ácido hialurônico entremendo as fibrilas de colágeno. Os proteoglicanos estão agrupados em regiões ricas tanto em condroitin-sulfato quanto em queratan-sulfato, e ligados a proteínas que facilitam a associação da agrecana ao ácido hialurônico (adaptado de Moreland, 2003).

Pela sua característica histológica e por ser desprovida de aporte sanguíneo, as lesões da cartilagem articular possuem pouca ou nenhuma capacidade de auto-reparação após uma lesão, por isso têm sido foco das atuais

pesquisas ortopédicas envolvendo biomateriais como alternativa dos processos já utilizados (Fragonas *et al.*, 2000; Saldanha & Grande, 2000; Sittinger *et al.*, 2004;).

### **1.3.1 Lesões em cartilagens hialinas**

Lesões em cartilagens ainda são problemas em cirurgias de reconstrução facial e ortopédica, já que este tipo de tecido não possui cicatrização natural eficaz, sendo substituída por tecido fibroso com características fisiológicas diferentes. Dores nas articulações são as maiores causas de inatividade de pessoas de meia idade, originadas a partir da degeneração das cartilagens articulares devido às osteoartrites, ou até em função de traumas com perda de cartilagem (O' Driscoll, 1998). A cartilagem hialina começa naturalmente a se degenerar quando os condrócitos hipertrofiam e morrem, sendo substituídos por cartilagem calcificada e osso, o que também pode acontecer com o aumento da idade. Isto resulta na diminuição de mobilidade e dor (Buckwalter & Mankin, 1998). Os processos degenerativos associados aos condrócitos são mais frequentes nas articulações e implicam em progressiva perda da estrutura e função (diminuição da mobilidade) e dor intra-articular. Os mais conhecidos são a artrite reumatóide e a osteoartrite. Em geral, essas degenerações são acompanhadas por uma tentativa de reparo e remodelação por parte dos condrócitos (Minas, 1999). Devido à baixa capacidade de auto-reparo do tecido, essas doenças podem se tornar crônicas e, eventualmente, chegar a uma degeneração avançada, a osteoartrite secundária (Temenoff *et al.*, 2000).

A osteoartrite é caracterizada pela erosão progressiva da cartilagem articular, fibrilação, exposição da superfície óssea e crescimento ósseo nas margens das articulações. Ela pode surgir sem nenhuma anormalidade aparente da articulação (idiopática), ou após trauma excessivo ou crônico, carga anormal e por instabilidade das articulações (Cohen *et al.*, 1998). Os condrócitos reagem a estas perturbações mecânicas da cartilagem e tentam restaurar o tecido sem sucesso.

Alteração no equilíbrio entre síntese e degradação das macromoléculas e, conseqüentemente, na integridade da matriz extracelular está entre as causas dessa doença. A síntese de metaloproteinases parece estar envolvida na degradação excessiva dos componentes da matriz (Eikenberry *et al.*, 1992). Em situações patológicas, os proteoglicanos sintetizados pelos condrócitos apresentam menos cadeias de condroitin-sulfato ou cadeias mais curtas. A resposta dos condrócitos a estímulos diversos, inclusive a fatores de crescimento, também diminui. Essas mudanças podem limitar a habilidade das células em manter as funções normais do tecido, contribuindo assim para o desenvolvimento de degenerações da cartilagem articular (Eikenberry *et al.*, 1992).

Durante décadas, cientistas e cirurgiões tentaram reparar ou regenerar cartilagens perdidas, com um mínimo de sucesso diante das complexas características mecânicas e funcionais exercidas no corpo (Temenoff & Mikos, 2000). A estratégia de utilizar matrizes biocompatíveis, degradáveis e celularizadas para a reposição de lesões de cartilagens tem sido alvo de interesse científico, pois permite a reconstrução e a implantação de tecido sadio e funcional.

Biomateriais, em teoria, são sempre mais atrativos para serem utilizados como arcabouço porque aprisionam as células e oferecem proteção contra rejeição imunológica e instabilidade fenotípica. Eles também podem apresentar vantagens para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e habilidade de síntese dos condrócitos, capazes então, de sintetizar componentes de matriz e reconstituir a arquitetura da cartilagem hialina (Dausse *et al.*, 2003).

A proliferação e a diferenciação celular *in vitro* proporcionam uma opção terapêutica, não só para reparação de defeitos em cartilagens articulares, mas em cartilagens tipo hialina encontrada em outras regiões do corpo como fossas nasais e traquéia. As células autólogas são sempre preferidas para os implantes por não apresentarem rejeição e pela maior probabilidade de pega do implante.

Entre as células autólogas para o reparo de cartilagens, as células mesenquimais derivadas de tecido adiposo e de medula óssea possuem mais fácil acesso para coleta e podem ser induzidas para se diferenciarem em cartilagem. Já os condroblastos autólogos apresentam maiores dificuldades de coleta, pois

necessitam de cirurgia e há poucos tecidos para extração. O uso de métodos de Bioengenharia Tecidual pode ser um caminho apropriado para a geração de peças de cartilagens *in vitro* em tratamentos de defeitos teciduais, tanto no uso veterinário como em humanos, no futuro próximo.

## **1.4 Células – Tronco**

As células-tronco são consideradas as unidades responsáveis pelos processos de geração e de regeneração do organismo adulto (Weissman, 2000). As células-tronco são definidas pela capacidade de auto-renovação e pela geração de células maduras de um tecido particular ao longo da diferenciação (Reya *et al.*, 2001). Elas podem ser encontradas em tecidos embrionários, principalmente na massa interna do blastocisto, onde são as responsáveis pela geração de todos os tecidos do organismo (Donovan & Gearhart, 2001), bem como em praticamente todos os tecidos de animais adultos, onde contribuem para os processos de reparo e homeostase tecidual (Kaplan *et al.*, 2007).

As células-tronco podem ser classificadas quanto a sua plasticidade como multipotentes, quando geram várias linhagens de células diferenciadas, ou oligopotentes, quando geram somente poucas linhagens (Krause *et al.*, 2001).

### **1.4.1 Células-Tronco Adultas**

As células-tronco adultas são células pouco diferenciadas que localizam-se em nichos específicos, distribuídos nos diferentes tecidos adultos (Kaplan *et al.*, 2007). Acredita-se que o nicho dessas células está intimamente relacionado com a regulação de suas propriedades de células-tronco (Spradling *et al.*, 2001).

As células-tronco adultas mais estudadas têm sido as da Medula Óssea (Prockop, 1997), mas também vêm sendo isoladas de diferentes tecidos tais como no Tecido Adiposo (Zuk *et al.*, 2001), na articulação sinovial (De Bari *et al.*, 2001), no músculo esquelético (Dellavalle *et al.*, 2007), na polpa dentária e no ligamento periodontal (Shi & Gronthos, 2003), no maxilar e na mandíbula (Akintoye *et al.*,

2006), na placenta (Kögler *et al.*, 2004), no couro cabeludo humano (Shih *et al.*, 2005) e, em muito menor número, no sangue de cordão umbilical (Wang *et al.*, 2004) e no sangue periférico (Kuznetsov *et al.*, 2001).

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes que são identificadas por suas propriedades de adesão ao plástico *in vitro*, imunofenótipo (expressão de antígenos de superfície específico) e potencial de diferenciação para as três principais linhagens mesodermiais: osteoblastos, adipócitos e condrócitos (Domonici *et al.*, 2006; Bernardo *et al.*, 2009). Elas possuem um grande potencial terapêutico e que podem ser isoladas de diversos tecidos.

#### **1.4.1.1.a Células –tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (Ad-MSC)**

De uma forma geral, a fonte de células-tronco mesenquimais autólogas mais presente na literatura como fonte alternativa aos condroblastos para a bioengenharia de cartilagem é a medula óssea. Isso ocorre pela facilidade de coleta e de condro-indução dessas células. Porém, assim como a medula óssea, o tecido adiposo (TA) é derivado do mesoderma embrionário e gera, quando colocado em cultura, uma fração celular aderente (estroma) (Ailhaud *et al.*, 1992). Tem-se demonstrado que no TA subcutâneo residem células progenitoras mesodermiais multipotentes (Zuk *et al.*, 2001), embora ainda não haja um consenso sobre a sua identidade tanto molecular como celular (Schäffler & Büchler, 2007).

As células progenitoras mesodermiais multipotentes (ou Células-Tronco Mesenquimais (MSC)) do TA (Ad-MSC) vêm demonstrando grandes semelhanças com as mais bem conhecidas MSC de Medula Óssea (Kaltz, N. *et al.*, 2008), podendo também assumir fenótipos de osso, cartilagem, músculo esquelético (Zuk *et al.*, 2001) bem como de células estromais capazes de sustentar a hematopoese *in vitro* (Corre *et al.*, 2006; Baptista *et al.*, 2007). A boa plasticidade, a simplicidade do procedimento cirúrgico de sua coleta e a baixa complexidade dos procedimentos enzimáticos de isolamento, tornam as Ad-MSC excelentes

candidatas para protocolos de medicina regenerativa de osso, cartilagem, distrofias musculares e reconstrução de tecidos moles (Schäffler & Büchler, 2007), e uma das mais atrativas fontes de MSC para pesquisadores e clínicos (Casteilla *et al.*, 2005).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Produzir arcabouços porosos de diferentes PHA's e verificar sua eficácia como biomaterial de suporte para bioengenharia de cartilagem hialina articular a partir de condroblastos ou células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterização de composição monomérica e propriedades térmicas dos novos PHA's estudados.
- Produzir membranas ou arcabouços porosos 3D de diferentes PHA's;
- Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de filmes de PHA's utilizando condroblastos humanos.
- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* dos arcabouços 3D de PHA's.
- Avaliar *in vitro* a estabilidade fenotípica de condroblastos humanos cultivados em arcabouços 3D de PHA's de diferentes porosidades.
- Avaliar a interação das Ad-MSc humanas condro-induzidas *in vitro* com arcabouços 3D de PHA's de diferentes porosidades.



### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Produção de PHA's**

Os PHA's utilizados foram produzidos e fornecidos pela Dra Fernanda Matias, do grupo de pesquisa da Dra. Elizabete J. Vicente, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo a partir de cepas bacterianas isoladas de solo do estado do Rio Grande do Sul. Os polímeros PHB e PHBV foram produzidos pela bactéria *Alcaligenes eutrophus* utilizando sacarose como fonte de carbono. Os demais polímeros foram produzidos pela linhagem bacteriana *Burkholderia contaminans* I29B cultivada sob 6 diferentes combinações de Meio Basal de Sais Minerais contendo sacarose (2%)/ caseína (0,2%) ou glicose (2%)/ caseína (0,2%) com ou sem alimentação de glicose ou sacarose como fontes de carbono (reagentes Sigma). Ambas bactérias foram cultivadas em fermentação líquida em biorreator tipo *New Brunswick Scientific* de 12 L contendo 10 L de meio de cultura total e após aproximadamente 24h de cultivo, liofilizadas para extração dos polímeros. A extração dos polímeros foi realizada utilizando-se Diclorometano P.A. (Vetec) aquecido a 50°C seguido de precipitação com Éter Etílico P.A. (Vetec) e 2 lavagens com Etanol P. A. (Vetec). Os polímeros sólidos obtidos destes processos foram analisados para determinação de pesos moleculares e composições monoméricas e posteriormente enviados ao Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular – UFRJ, onde as demais etapas foram realizadas.

O polímero designado como I29B1 foi produzido por ensaio com a linhagem I29B com sacarose (2%) e caseína (0,2%) como fontes de carbono sem alimentação posterior. Este ensaio apresentou acúmulo de PHA de 80% do peso total bacteriano. Os polímeros I29B2, I29B3 e I29B4 foram produzidos utilizando-se glicose e caseína (2% e 0,2%) como fontes de carbono com alimentação com glicose (2% do volume total) após 12h de cultivo. O acúmulo de PHA's nestes ensaios variou entre 15 e 40% e em virtude da pouca quantidade de material produzido dos polímeros 3 e 4, neste trabalho avaliamos apenas o I29B2. Os

polímeros I29B5 e I29B6 foram produzidos utilizando-se sacarose e caseína (2% e 0,2%) com alimentação de glicose (2% do volume total) e glicose e caseína (2% e 0,2%) com alimentação de sacarose (2% do volume total) respectivamente, sendo ambas alimentações após 12h de cultivo (Matias, F. 2009).

### **3.2 Caracterização dos PHA's**

#### **3.2.1 Análises físico-químicas**

Para a identificação qualitativa/comparativa, assim como para quantificação dos polímeros, foram realizadas análises em cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa através de quebra química dos polímeros e obtenção de propil-ésteres por propanólise de acordo com Riis & Mai (1988). Os ésteres obtidos foram analisados em cromatógrafo a gás da marca Hewlet Packard modelo 5890A com coluna HP-5 Agilent, acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM) de marca Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A. O gás da fase móvel utilizado foi o Hélio a uma vazão de 0,8 ml/min. Aproximadamente 2  $\mu$ l da fase orgânica foram analisados, usando-se como gás de arraste o N<sub>2</sub> (vazão 0,5 ml/min). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 300 °C, respectivamente. Utilizamos o programa de 100 °C por 1 min, aumentando a temperatura em 8 °C/min e mantendo como temperatura final 200 °C por 15 minutos e tendo como tempo total aproximado 30 minutos para uma eficiente separação dos ésteres. A fim de quantificar e identificar os polímeros obtidos foram utilizados como padrões os polímeros: poli-hidroxi-butilato (PHB), poli-hidroxi-valerato (PHV), poli-hidroxi-hexanoato (PHHx), poli-hidroxi-heptanoato (PHHp), poli-hidroxi-octanoato (PHO), poli-hidroxi-nonanoato (PHN), poli-hidroxi-decanoato (PHD), poli-hidroxi-dodecanoato (PHDd) e poli-hidroxi-dodecanoato insaturado (P $\Delta$ HDD).

Os polímeros foram caracterizados quanto à composição monomérica através de ressonância magnética nuclear (RMN), procedimento através do qual pode-se verificar a presença de PHAs dos tipos cadeia curta (SCL) e cadeia

média (MCL). Foi utilizado o equipamento espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300, da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os produtos e intermediários foram dissolvidos em clorofórmio deuterado. Todos os deslocamentos químicos foram registrados em partes por milhão (ppm).

Para as análises de peso molecular, amostras contendo 10 mg de polímero em 1 ml de clorofórmio foram injetadas em equipamento de Cromatografia de Gel Permeação (CGP) contendo detector Waters 2410 com bomba isocrática Waters 510, integrador Waters 746 e 3 colunas Phenogel 5 $\mu$  linear Phenomenex. Foi utilizado clorofórmio como fase móvel a 1 ml/min. A corrida teve duração de 45 min e padrões de poliestireno da marca Polymer Standards Service - Waters foram utilizados para construção de uma curva de peso molecular (MW): 5.480.000, 3.390.000, 1.260.000, 836.000, 464.000, 178.000, 37.600, 6.610, 2.630.

### **3.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)**

Os polímeros estudados foram submetidos à análise de TGA em equipamento Modelo TGA-Q500. (*T.A. Instruments, USA*). As análises foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 40ml/min na balança e 60ml/min na amostra, variando a temperatura de 25°C a 700°C com taxa de aquecimento de 10°C/min.

### **3.2.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

As amostras poliméricas foram avaliadas por DSC em equipamento Modelo DSC – Q1000 (*T.A. Instruments, USA*), em atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 50ml/min. O equipamento foi calibrado com Níquel. Foram realizados três ciclos de aquecimento para cada amostra. O primeiro aquecimento consistiu da elevação da temperatura de -35°C a 200°C com taxa de aquecimento de 10°C/min, para eliminar a história térmica das amostras e então podermos

compará-las em condições térmicas similares. A seguir, o sistema foi mantido na temperatura mais alta por 1 min e resfriado rapidamente até  $-35^{\circ}\text{C}$ , para possibilitar a máxima desorganização da estrutura, evidenciando, assim, a transição vítrea ( $T_g$ ) no aquecimento seguinte.

O segundo e o terceiro aquecimentos foram de  $-35^{\circ}$  a  $200^{\circ}\text{C}$  com velocidade de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  separados por um resfriamento à mesma velocidade, o que permite evidenciar as temperaturas de cristalização ( $T_c$ ) e fusão ( $T_m$ ) dos materiais.

### **3.3 Preparação de membranas e arcabouços 3-D de PHA's**

#### **3.3.1 Dissolução dos PHA's**

Os polímeros foram dissolvidos individualmente em Clorofórmio P.A. ( $\text{CHCl}_3$ ) (Vetec) a  $65^{\circ}\text{C}$ , sob agitação contínua. A solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº 03, para a eliminação de partículas não dissolvidas e impurezas, e concentrada em sistema de vácuo para a obtenção de solução final com concentração aproximada de 12%.

#### **3.3.2 Produção de membranas de PHA's**

Para a produção das membranas, lamínulas de vidro redondas (10 mm de diâmetro) foram recobertas com  $50\mu\text{l}$  da solução polimérica (previamente preparada) e mantidas em Câmara de Exaustão Química à temperatura ambiente até a total evaporação do solvente. As membranas poliméricas sobre as lamínulas de vidro foram devidamente embaladas e enviadas para esterilização em Óxido de Etileno pela empresa ACECIL – Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA (Campinas – SP).

### 3.3.3 Produção de estruturas porosas 3-D de PHA's

Na produção das estruturas porosas foi utilizada a Técnica de Lixiviação de Sal adaptada de Sader (2006). Partículas secas de cloreto de sódio (NaCl) nas faixas granulométricas de 150-75, 75-53 e 53-38  $\mu\text{m}$  foram dispersadas mecanicamente na solução polimérica na proporção de 80/20 (massa de sal/massa de polímero) diretamente em tubos cilíndricos de fundo chato de 2,5mm de diâmetro. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente sob fluxo contínuo de ar para a evaporação do solvente. A remoção total do solvente foi verificada pela pesagem das amostras sólidas. A seguir, as amostras foram imersas em água tri-destilada sob agitação magnética para a remoção das partículas de sal. A água foi trocada a cada 1 hora até que a condutividade da água após a agitação com os arcabouços se mantivesse inalterada em relação à medição feita antes da colocação dos materiais, mostrando não haver resíduos de sal. As estruturas de polímero poroso foram, então, centrifugadas a 1000 rpm, várias vezes, para retirar o máximo da água (diminuindo, assim, o tempo necessário para a sua secagem) e secas em temperatura ambiente. As estruturas porosas secas foram seccionadas em cilindros de 6mm de diâmetro e 2mm de espessura (Figura 5) e esterilizadas em Óxido de Etileno pela empresa ACECIL – Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA (Campinas – SP). Os arcabouços foram ambientados com meio de cultura por 24 horas antes da semeadura.



Figura 5. Aspecto macroscópico dos arcabouços tridimensionais de PHA's. À esquerda o arcabouço do tamanho no qual é produzido e à direita após redimensionamento.

### **3.4 Testes *in vivo* de interação de arcabouços 3D com tecido hospedeiro**

Os arcabouços 3D de PHB das 03 porosidades produzidas com aproximadamente 4 mm<sup>2</sup> foram implantados cirurgicamente sob o dorso de 18 camundongos Swiss de 02 meses e mantidos por 7 e 30 dias em gaiolas plásticas sob condições ambientais controladas no biotério do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (UFRJ). Dois camundongos adicionais também foram mantidos como controle. A implantação foi realizada com o animal sob anestesia (43 mg/mL de cetamina, 8,6 mg/mL de xilasina e 1,4 mg/mL de acepromazina, 2 mL/kg). Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, de acordo com os tempos experimentais, e os biomateriais implantados foram retirados e preparados para microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação das interações com o tecido do hospedeiro.

### **3.5 Isolamento e cultura de condroblastos humanos**

Os condroblastos humanos foram isolados de biópsias de cartilagens articulares de pacientes do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – INTO. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste hospital – portaria: 092/05. As peças de cartilagem isoladas foram removidas cirurgicamente, e sofreram digestão enzimática com 0,25 % de tripsina EDTA e 0,25 % de colagenase II (Gibco). As células isoladas foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio DMEM/F-12 (Sigma Chemical Co) com 10 % de soro fetal bovino (Gibco), 50 µg/mL de ácido ascórbico, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina G e 100 U/mL de estreptomicina, sendo o meio trocado a cada 02 dias. As garrafas foram mantidas em estufa incubadora com atmosfera úmida em 95 % contendo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após confluência, as células da cultura primária foram tripsinizadas e congeladas em soro fetal bovino/DMSO 5 % na concentração de 01 x 10<sup>6</sup> células/mL e armazenadas em freezer a -80°C.

### 3.6 Isolamento e cultura das Ad-MSCs Humanas

As amostras de tecido adiposo de lipoaspirado (TAL) da parede abdominal foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia estética no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF- UFRJ). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste hospital – portaria: 088/04. Todos os pacientes leram, concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os procedimentos seguintes, de isolamento das células de interesse, foram realizados sob a orientação da Dra. Maria Isabel Doria Rossi (ICB/UFRJ) por seu grupo de pesquisa.

O material obtido da lipoaspiração foi submetido à digestão enzimática com 1 mg/mL de collagenase IA (Sigma) por 20 minutos a 37°C. A suspensão obtida foi filtrada em malha de nylon com poro de 150 µm, centrifugadas a 300 g por 10 minutos e lavada duas vezes com PBS. As células foram ressuspensas em DMEM (Sigma) com 10% de SFB e antibiótico e 5 mL de suspensão com  $10^5$  células/cm<sup>2</sup> foram distribuídos em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, que foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após aproximadamente 16 horas, as células não aderentes foram retiradas e a fração aderente foi lavada com PBS, sendo mantida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para expansão. Quando confluentes, as células foram dissociadas com solução de tripsina 0,125% (Gibco) e 0,78 mM de EDTA (Gibco) e distribuídas numa densidade de  $0,8 - 1,3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para expansão ou criopreservação.

### 3.7 Culturas celulares sobre os biomateriais

Para as culturas sobre os filmes poliméricos foram semeadas  $01 \times 10^5$  células e sobre os arcabouços tridimensionais, foram semeadas  $05 \times 10^5$  células. Nos cultivos de condroblastos foi utilizado o meio DMEM-F12 (não indutor) (Sigma) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco), 50 µg/mL de ácido ascórbico, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina G e 100 U/mL de estreptomicina. Nos cultivos de Ad-MSC foi utilizado o kit de indução condrocítica

CDM Bulletkit (Cambrex) constituído de meio Condrocyte Differentiation Medium Bulletkit suplementado apenas com os componentes do kit (12,5 ml de soro fetal bovino, 0,5 mL de Transferrina, 0,25 ml de sulfato de gentamicina / anfotericina B, 0,5ml de insulina humana recombinante, 1,25ml de TGF $\beta$ -1 e 0,5ml de R<sup>3</sup>-IGF, 1 para cada 250ml de meio base) conforme orientação do fabricante. Os meios foram trocados a cada 02 dias e as culturas foram mantidas por 07 dias em estufa incubadora com atmosfera úmida em 95 % contendo 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C. Os ensaios foram estudados por colorações histológicas específicas e observadas por microscopia óptica e eletrônica de varredura convencional (MEV).

### **3.8 Preparo das culturas celulares nos arcabouços de PHA's para observação por microscopia óptica – Histologia**

Para análise por microscopia óptica, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por no mínimo 6 horas, lavadas no mesmo tampão, desidratadas em séries crescentes de etanol (50%, 80%, 90%, 100%, 100%), seguidas por série de xilol, e infiltradas com parafina a 58°C. Após o resfriamento, os blocos de parafina foram cortados com faca de aço acoplada a micrótomo rotativo manual (Leica) em seções de 4  $\mu$ m. Os cortes foram em seguida desparafinizados, re-hidratados e avaliados pelas seguintes colorações histológicas: Hematoxilina/Eosina (HE), Picro-Sirius/Hematoxilina, Alcian Blue (pH 1) ou Von-Kossa (protocolos em anexo). Todos os cortes foram desidratados com etanol absoluto, clarificados com xilol 50 % e absoluto e selados com Entellan (Merck). Os cortes corados foram observados no microscópio óptico Zeiss Axioplan equipado com sistema digital de captura de imagens com câmera CCD Evolution MP Color (Media Cybernetics), adquiridas na resolução de 1024 X 1024 pixels.



### **3.9 Preparo das culturas celulares nos arcabouços de PHA's para observação por MEV**

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 2 horas, pós-fixadas com 1 % de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) no mesmo tampão por 40 minutos, desidratadas em séries crescentes de etanol e secas pelo método do ponto crítico em aparelho Bal-Tec CPD 020 (IMPPG-UFRJ). Os materiais secos foram seccionados longitudinalmente com navalha de aço em fatias de aproximadamente 1mm, para expor as regiões internas, e em seguida depositados sobre fita condutora dupla-face de carbono que recobriam suportes de alumínio. O material foi ainda recobertos por fina camada de ouro em aparelho de metalizador Bal-Tec SCD 050. Os equipamentos utilizados foram os microscópios de varredura Jeol 5310 (IBCCF-UFRJ) e Jeol JSM6460LV ( LABMIC / METALMAT / COPPE – UFRJ ), operados em 15 kV. Imagens digitais com 1024 x 770 pixels de resolução foram obtidas pelo programa SEMafore (JEOL) acoplado ao MEV. Foram obtidas imagens em diversos aumentos de campos aleatórios de todas as frações longitudinais dos constructos, observando-se ao máximo a extensão tridimensional do material (altura X largura X profundidade).

### **3.10 Quantificação das células nos arcabouços de PHA's**

As células foram quantificadas a partir de 5 imagens aleatórias de MEV das frações longitudinais dos arcabouços (uma imagem de cada fração) sob o aumento de 250X. Foram calculados a média e desvio padrão do número de células presentes em cada material nos diferentes tamanhos de poro e os dados foram apresentados na forma de gráfico obtido no software Excel<sup>®</sup> (Microsoft).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1. Caracterização dos polímeros – Composição monomérica e peso molecular**

O primeiro objetivo deste trabalho, foi a caracterização dos polímeros a serem testados em cultura quanto à sua composição monomérica e peso molecular. Para tal, realizamos análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia de Gel Permeação (CGP). Os resultados gráficos obtidos nestas análises foram resumidos na tabela 1, no intuito de facilitar seu entendimento.

Tabela 1: Análise de peso molecular dos polímeros obtidos da linhagem bacteriana I29B por GPC e porcentagem de cada monômero presente nos polímeros produzidos\*.

<b>Amostra</b>	<b>Mw (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Mn (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>I.P.</b>	<b>PHB (mol%)</b>	<b>PHDd (mol%)</b>	<b>Outro polímero (mol%)</b>
PHB	413.623	-	-	100,00	0,00	0,00
PHBV	394.498	-	-	95,00	0,00	5,01(PHV)
I29B1	762 773	310 868	2,5	99,90	0,00	0,1 (PHV)
I29B2	950 393	565 326	1,5	85,02	14,9	0,08 (PHV)
I29B5	482 203	150 844	3,2	99,05	0,40	0,55 (PHV)
I29B6	695 404	391 582	1,8	93,37	6,00	0,63 (PHV)

\*A porcentagem de cada polímero foi calculada a partir das análise de RMNs. Mw, massa molecular ponderal média; Mn, massa molar numérica média; I.P. índice de polidispersão (relação entre a massa ponderal média e a massa molecular numérica (Mw/Mn)).

### **4.2 Caracterização dos polímeros – Propriedades térmicas**

O estudo de estabilidade térmica dos polímeros obtidos pela análise TGA indicou, pelo monitoramento da variação da massa durante a variação controlada de temperatura, a temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima ( $T_{peak}$ ), temperatura inicial de perda de massa ( $T_{onset}$ ) (temperatura a partir da qual não se pode mais reconhecer o material na amostra) e porcentagem de massa degradada ao final do processo (% de degradação), expressos pela tabela 2.

Tabela 2: Análises termogravimétricas dos PHA's e porcentagem de massa degradada ao final do processamento térmico.

Amostra	T <sub>peak</sub> (°C)	T <sub>onset</sub> (°C)	% de degradação
PHB	279,11	265,83	99,39
PHB-V	237,87	222,31	99,55
I29B1	249,88/ 259,44	231,22	99,75
I29B2	258,36	235,92	99,68
I29B5	269,69	252,94	99,01
I29B6	290,95	275,50	99,58

T<sub>peak</sub>: temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima; T<sub>onset</sub>: temperatura inicial de perda de massa, temperatura a partir da qual não se pode mais reconhecer o material na amostra.

As transições térmicas de cada polímero foram verificadas através das análises DSC (gráficos das curvas DSC anexos). Os gráficos das análises foram condensados na Tabela 3 que apresenta os resultados de temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>), as temperaturas de cristalização que ocorrem durante o aquecimento (T<sub>ch</sub>) e o resfriamento (T<sub>cc</sub>), e a temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) de cada polímero.

Tabela 3: Resumos dos dados obtidos nas análises de calorimetria diferencial de varredura.

Amostra	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>ch</sub> (°C)	T <sub>cc</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)
PHB	3,65	48,78	71,94	174,56
PHB-V	2,08	56,93	53,40	170,62
I29B1	2,82	53,73	78,96	174,64
I29B2	0,76	55,33	74,11	171,81
I29B5	2,65	45,65	72,70	175,32
I29B6	1,78	52,88	79,13	174,51
PP iso	--	--	112,33	159,17

T<sub>g</sub>: transição vítrea no segundo aquecimento; T<sub>ch</sub>: temperatura de cristalização no segundo aquecimento; T<sub>cc</sub>: temperatura de cristalização no resfriamento; T<sub>m</sub>: temperatura de fusão no terceiro aquecimento.

### 4.3 Caracterização morfológica das membranas e arcabouços de PHA's através de MEV

Sob a forma de membranas, apenas os polímeros PHB e de PHBV foram analisadas quanto à morfologia, pois a quantidade de material dos demais polímeros produzidos foi muito restrita. Os filmes apresentaram espessura média de 20  $\mu\text{m}$  e foram observados por MEV. Observações da superfície das membranas de P3HB indicam um aspecto rugoso de uma estrutura irregular (Figura 6a) e poros muito pequenos (Figura 6a - setas). Os filmes de PHBV apresentam superfície muito semelhante à do PHB, também com poros e estrutura rugosa irregular (Figura 6b). A técnica se mostrou perfeitamente reprodutível e estável.

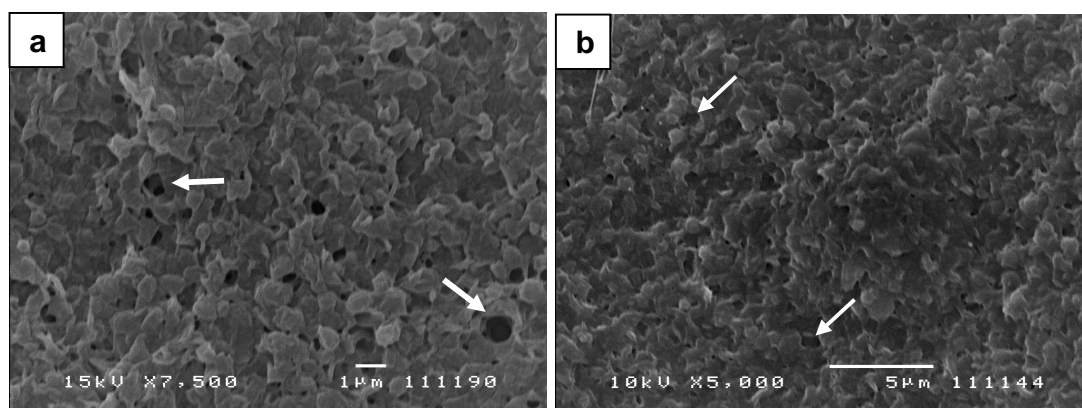


Figura 6. MEV de membrana de PHB (a) e PHBV (b) mostrando a rugosidade e evidenciando os poros (setas) e estrutura geral irregular.

As micrografias eletrônicas de varredura dos arcabouços porosos de PHB mostram a presença de poros compatíveis em dimensões com os cristais de sal utilizados como agente porogênico. Poros interconectados foram vistos em toda extensão dos arcabouços fraturados (Figura 7) e não se verificou a presença de resíduos de sal. Os arcabouços dos demais polímeros apresentaram as mesmas características (dados não mostrados).

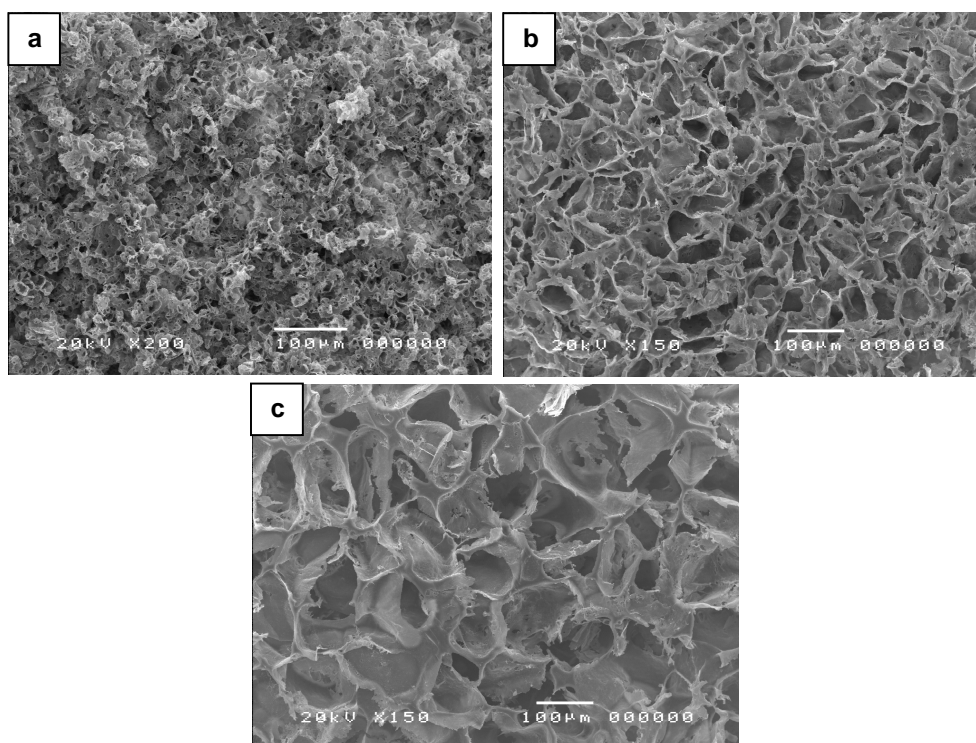


Figura 7. MEV de arcabouço 3D de PHB com 38-53 $\mu$ m (a), 53-75 $\mu$ m (b) e 75-150  $\mu$ m (c) de porosidade.

#### 4.4 Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* das membranas de PHA's utilizando condroblastos humanos

Para avaliar a biocompatibilidade dos materiais *in vitro*, comparamos culturas de condroblastos sobre lamínulas de vidro, já conhecidamente compatíveis, com culturas sobre membranas poliméricas de PHB e PHBV. Os condroblastos semeados sobre as lamínulas de vidro (experimento controle) apresentaram morfologia fibroblastóide semelhante aos condroblastos expandidos em cultura bidimensional com adesão ao plástico, observada através de MEV, e foram capazes de proliferar e alcançar a confluência em 07 dias experimentais (Figuras 8a e b). Já as células semeadas sobre as membranas de PHB foram capazes de aderir ao biomaterial, mantendo o formato fibroblastóide, embora discretamente menos alongadas que as do tratamento controle. Aparentemente,

sobre este material, as células se mostram mais espalhadas, cobrindo individualmente uma área maior do substrato que quando comparando ao grupo controle, além de não terem atingido confluência no mesmo tempo experimental (Figuras 8c e d). Pela imagem em maior aumento (Figura 8d), não se observam modificações na superfície da membrana de P3HB após cultivo.

Nas culturas sobre os filmes de PHBV, nota-se claramente um número menor de células com o mesmo tempo experimental. Há, também, células mais espalhadas, lembrando as culturas sobre o P3HB, concomitantemente com outras células de morfologia mais alongada (Figuras 8e e 8f). Também em maior aumento, não se notam modificações na superfície da membrana após o procedimento.

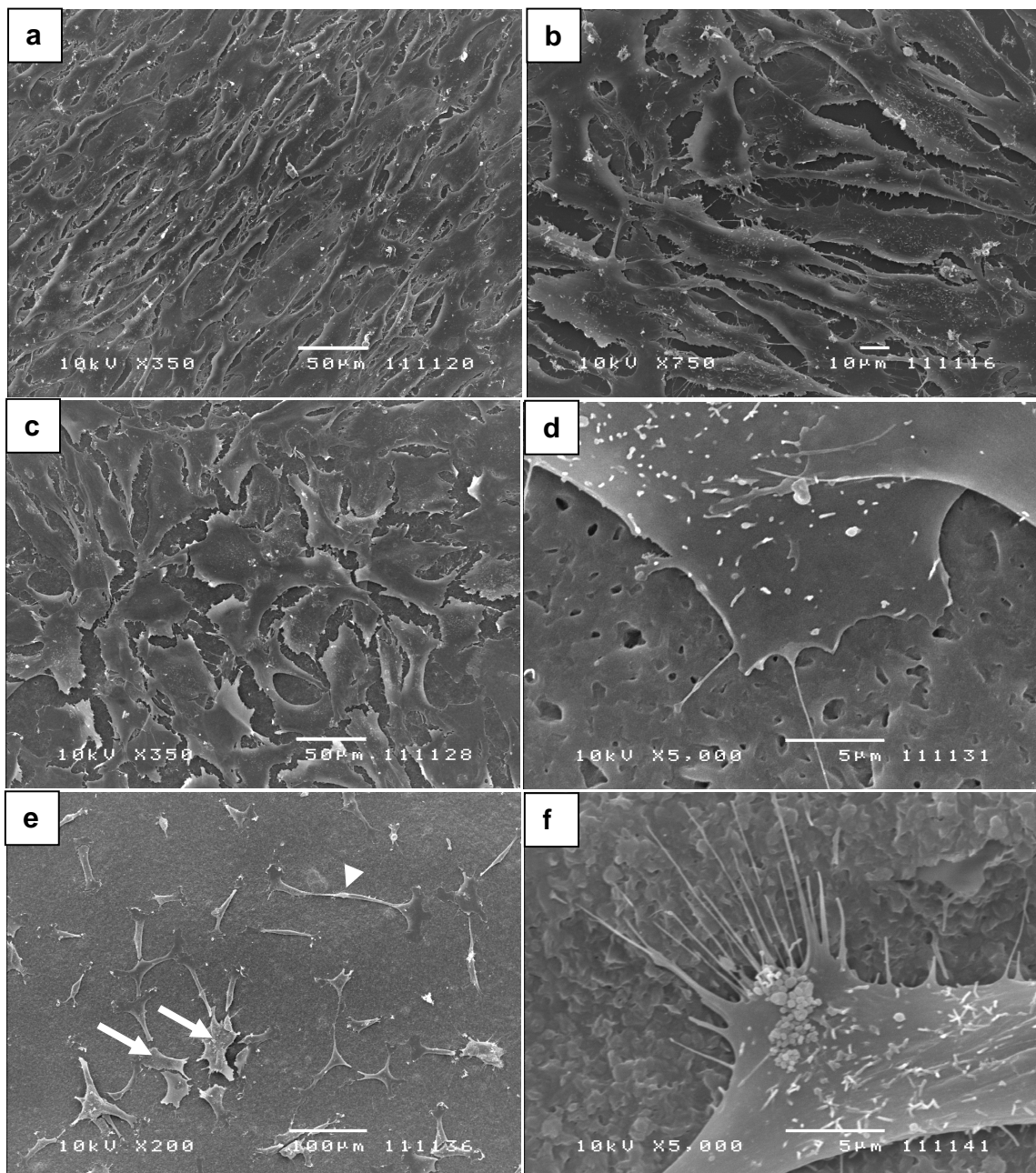


Figura 8. MEV de condroblastos em cultura bidimensional. a: morfologia fibroblastóide das células semeadas sobre lamínulas de vidro (tratamento controle). b: Detalhe das células em maior aumento. c: MEV dos condroblastos cultivados sobre filmes de PHB. d: detalhe da superfície do filme de PHB evidenciando sua aparência aplainada e porosidade. Partes de duas células podem ser observadas. e: MEV das culturas sobre filme de PHBV mostrando células fibroblastóides (ponta de seta) e células mais espalhadas (setas). f: Detalhe da superfície do filme de PHBV onde observa-se parte da célula emitindo projeções citoplasmáticas.

#### **4.5 Avaliação da biocompatibilidade *in vivo* dos arcabouços 3D de PHA's**

Para avaliar a biocompatibilidade *in vivo* dos polímeros, utilizamos a implantação subcutânea de arcabouços porosos tridimensionais de PHB no dorso de camundongos. Novamente o PHB foi o material escolhido por ser representativo dos demais em virtude de ser o componente mais abundante em todos os materiais estudados. Avaliamos, ainda, a implantação dos arcabouços das três diferentes porosidades, pois o tamanho do poro poderia modificar o acesso de células do hospedeiro ao interior dos materiais, alterando assim a reação de corpo estranho e a degradação do polímero.

Os animais foram avaliados clinicamente por veterinário quanto ao local da incisão três dias após as cirurgias de implantação dos materiais bem como no momento do explante e não foram observados indícios de inflamação ou formação de prurido. Após a extração do arcabouço do dorso do animal, observou-se macroscopicamente, a presença de uma cápsula de material fibroso recobrindo o implante, observada posteriormente sob microscopia.

Através das imagens de microscopia óptica de campo claro de cortes semifinos dos arcabouços observamos a presença de células e matriz extracelular em toda a extensão do interior dos arcabouços após a implantação, independentemente do tamanho de poro do arcabouço implantado, o que confirma a interconectividade dos poros e mostra que seu tamanho não influenciou na capacidade de migração celular como reação do organismo hospedeiro. Não observamos grandes infiltrados linfocíticos nas adjacências do material que sinaliza que o polímero é imunologicamente inerte durante o período experimental (Figura 9 A, C, E e F). A birrefringência das paredes do PHB observada sob microscopia de luz polarizada durante o período experimental evidencia sua resistência a degradação em curto prazo (Figura 9 B e D).



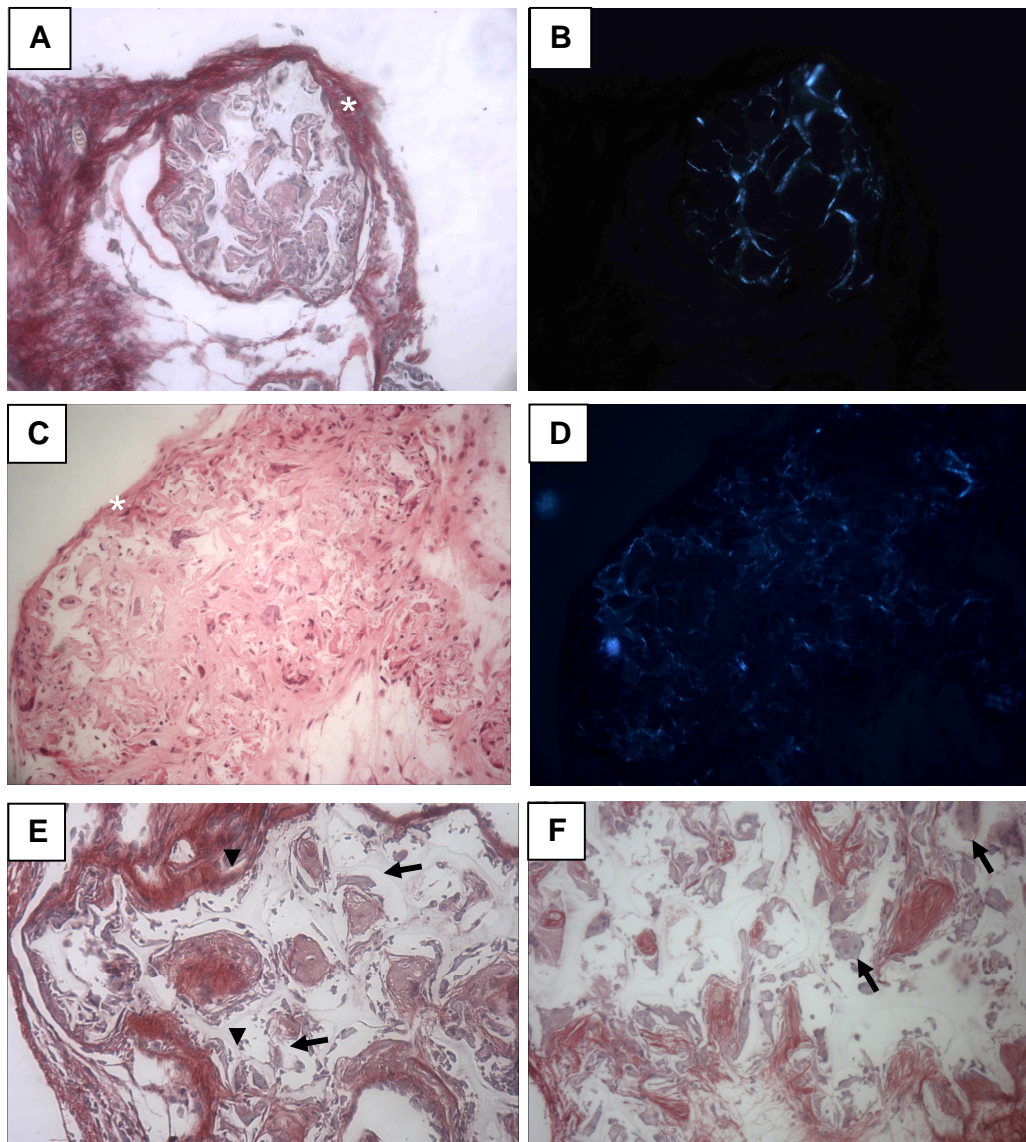


Figura 9. Fotomicrografias de arcabouço de PHB com 53-75  $\mu\text{m}$  de porosidade. A: após 07 dias de experimentação *in vivo*, podemos observar a presença da cápsula fibrosa (\*) recobrindo o implante (corada em vermelho), a ausência de infiltrado linfocítico e a presença de células por todo o interior do arcabouço (Picro-Sirius/Hematoxilina). B: a mesma região de (A) observada sob luz polarizada mostrando a birrefringência das paredes do polímero. C: após 30 dias de experimentação *in vivo*, podemos observar a manutenção da cápsula fibrosa recobrindo o material e novamente a ausência de infiltrado linfocítico e a presença de células por todo o interior do arcabouço (HE). D: a mesma região de (C) observada sob luz polarizada mostrando a birrefringência das paredes do polímero. E: após 07 dias de experimentação *in vivo*, as setas indicam células multinucleadas aderidas às paredes do PHB e as cabeças de seta, células fibroblastóides. Pela marcação em vermelho, observa-se a reação positiva para fibras de colágeno na cápsula no interior do material (Picro-Sirius/Hematoxilina). F: após 30 dias de experimentação *in vivo*, observa-se um maior número de células multinucleadas (setas) adjacentes ao PHB (Picro-Sirius/HE). Aumento original: 200 X.

Pudemos observar ainda a formação de uma cápsula fibrosa, constituída de células fibroblastóides e material de matriz fibrilar, com aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de espessura recobrimdo todo o arcabouço (Figuras 9A e C) e a presença de células fibroblastóides e células multinucleadas aderidas às paredes do PHB após 7 dias de implantação (Figura 9E). Após 30 dias de experimentação, as imagens mostram quantidade mais abundante de células multinucleadas adjacentes ao material em relação ao período de 7 dias (Figura 9F).

#### **4.6 Avaliação da estabilidade fenotípica de condroblastos humanos cultivados *in vitro* em arcabouços 3D de PHA's de diferentes porosidades**

Para a utilização dos arcabouços 3D dos PHA's na bioengenharia de cartilagem, os materiais, além de ser biocompatíveis, necessitam favorecer a estabilidade fenotípica dos condroblastos cultivados, pois em sistema de cultura bidimensional estas células tendem a diferenciar para um fenótipo fibroblastóide, no qual não são produzidas as moléculas de matriz desejáveis. Se o ambiente tridimensional por si só não for capaz de manter o fenótipo condrocítico, torna-se necessário avaliar a possibilidade de adição de fatores ao meio que influenciem as células neste sentido. Assim, o ideal é que, para economia de recursos, o arcabouço tenha as propriedades necessárias para influenciar as células na direção que se pretende.

As micrografias eletrônicas de varredura dos condroblastos humanos cultivados nos arcabouços de PHA's por 07 dias em meio não-indutor mostraram células com morfologia esférica (como na cartilagem articular) (Figuras 10 e 11), indicando a estabilidade do fenótipo condrocítico. Através das mesmas imagens, mostra-se que as células se distribuíram ao longo da estrutura, inclusive nas áreas mais internas dos arcabouços, independentemente do tamanho do poro (Figura.10), apenas através da sedimentação natural das células.

As quantificações a partir das imagens de campos aleatórios obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram que os arcabouços com porosidade

de 53-75 e 75-150  $\mu\text{m}$  tendem, mesmo que não significativamente, a apresentar um número de células ligeiramente maior que os de 38-53  $\mu\text{m}$  (Figura 12). Observou-se ainda maior número de células nos polímeros I29B2 e I29B6, apesar de também não haver significância estatística (Figura12). Em todos os polímeros pode-se observar, também sob microscopia eletrônica, estruturas fibrilares formando redes adjacentes a algumas células, similares a matriz extra-celular (imagens representativas na Figura 13).

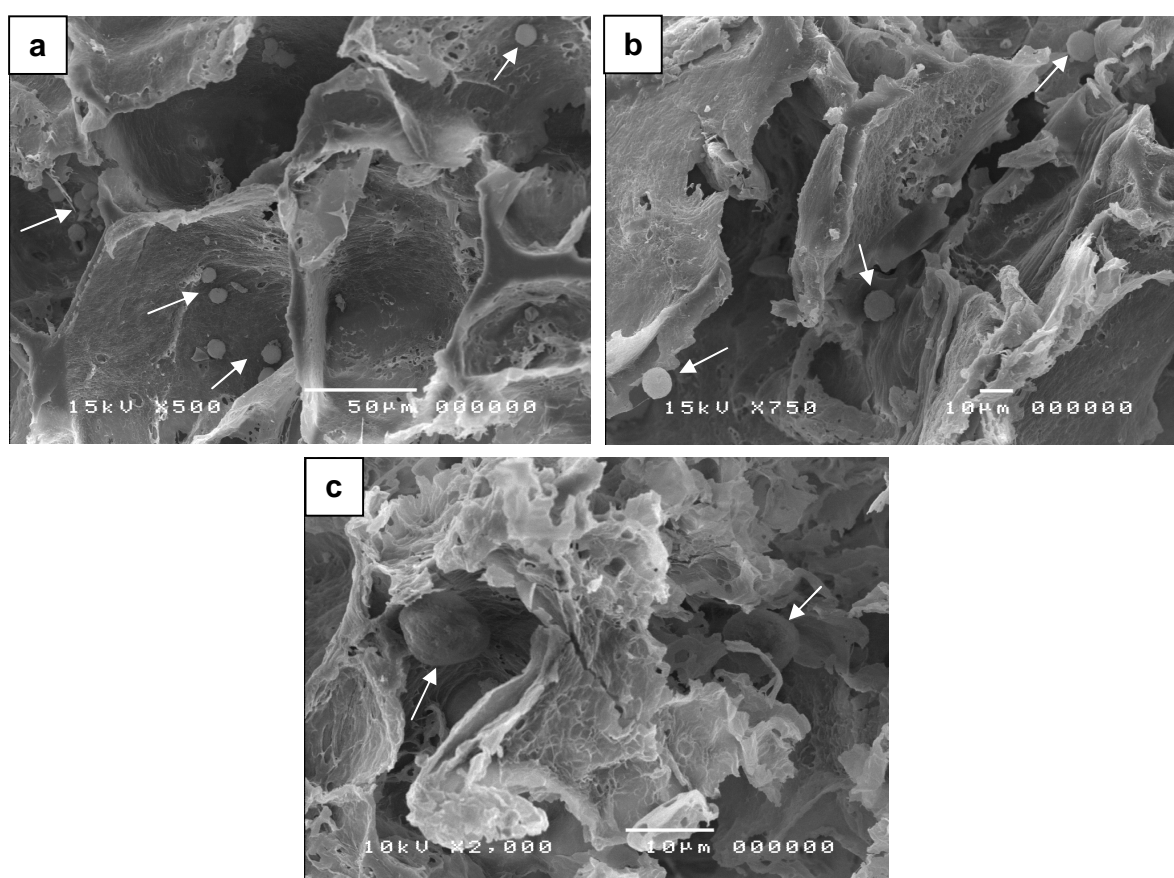


Figura 10. Micrografia eletrônica de varredura de regiões internas de arcabouços de PHB com 75 - 150  $\mu\text{m}$  (a) 53 - 75  $\mu\text{m}$  (b) e 38 - 53  $\mu\text{m}$  (c) de porosidade. Em todas as figuras as setas indicam os condroblastos, com morfologias esféricas.

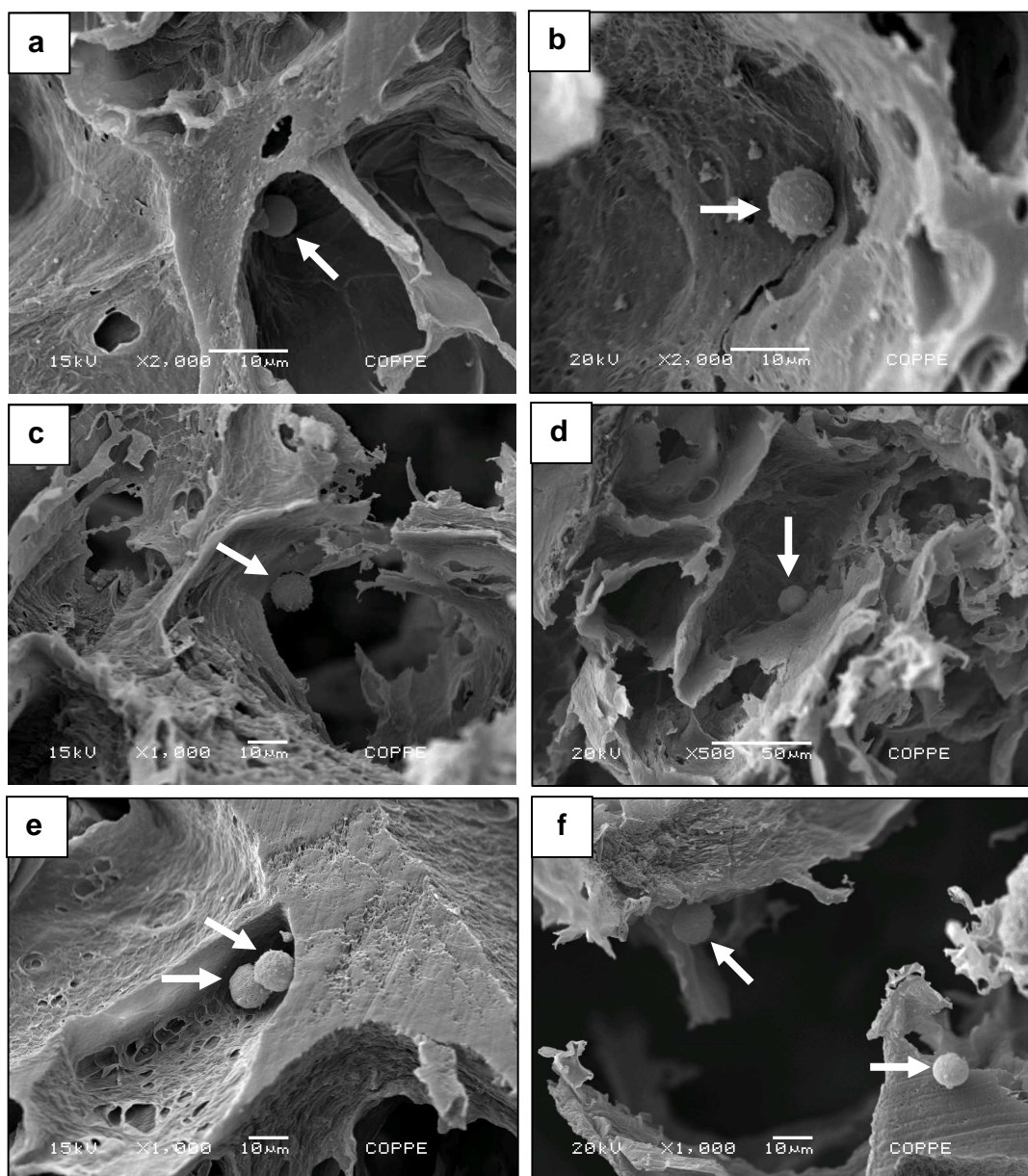


Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura de regiões internas de arcabouços de PHB (a), PHBV (b), I29B1 (c), I29B2 (d), I29B5 (e) e I29B6 (f) com poros de 75 - 150  $\mu\text{m}$ . com condroblastos cultivados *in vitro* por 7 dias. As setas indicam os condroblastos, com morfologias esféricas.

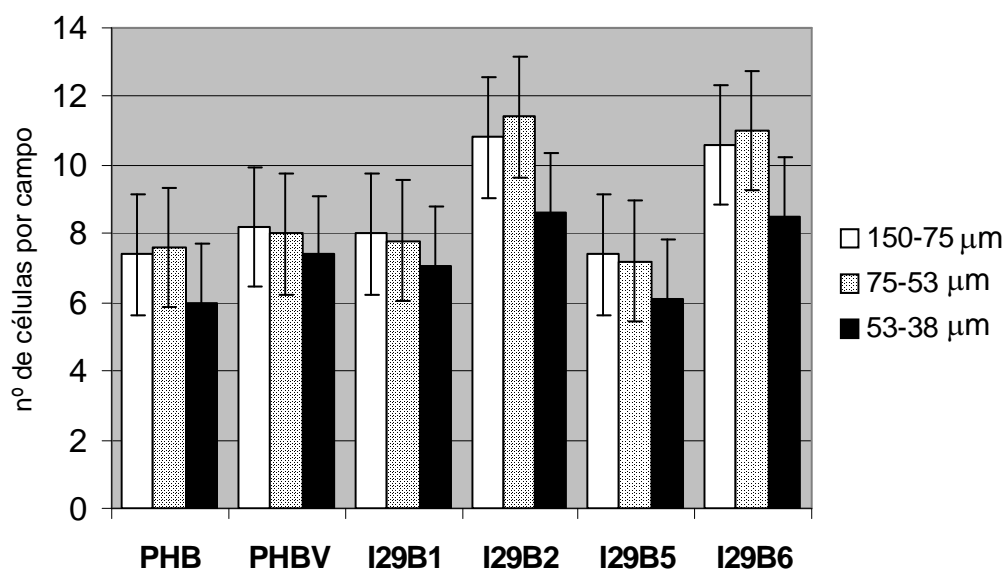


Figura 12. Gráfico do número de células presentes nas culturas *in vitro* de condroblastos humanos sobre os arcabouços dos 6 polímeros estudados. Quantificações de fotomicrografias sob baixo aumento (250X) de 5 campos aleatórios expressos como médias do número de células  $\pm$  desvio padrão para cada unidade experimental (n=3). Pode-se notar que os polímeros I29B2 e I29B6 apresentaram um número de células ligeiramente maior que os demais, mas sem diferença estatisticamente significativa. Se compararmos o número de células em relação ao tamanho dos poros dos arcabouços de cada um dos materiais, também podemos notar a discreta tendência de os arcabouços de poro de 53-38μm apresentarem número de células reduzido, independente do polímero estudado.

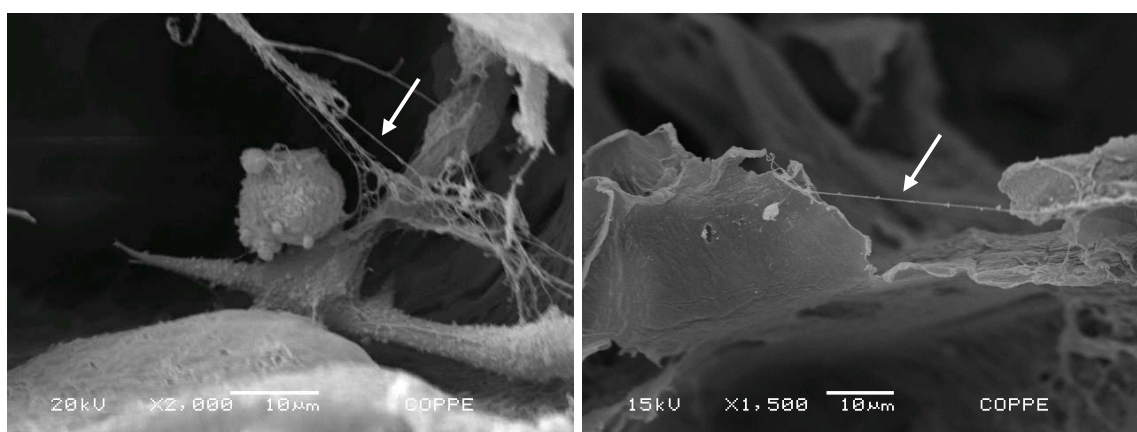


Figura 13. Micrografia eletrônica de varredura de arcabouços de PHBV com poros de 75 – 53μm com condroblastos cultivados *in vitro* por 7 dias em meio não-indutor. À esquerda célula de morfologia esférica com estruturas fibrilares (seta) ao redor. À direita, detalhe de estrutura fibrilar (seta).

#### **4.7 Avaliação da interação das Ad-MSC humanas condro-induzidas in vitro com arcabouços 3D de PHA's de diferentes porosidades.**

Tentando evitar novas lesões geradas da coleta de células das cartilagens do paciente e ainda utilizar células autólogas para a reposição de cartilagem lesada, as Ad-MSC surgem como alternativa viável na bioengenharia de tecidos. Embora a capacidade de condro-diferenciação induzida das Ad-MSC esteja bem descrita, é importante verificar se a interação com os arcabouços de PHA's interfere nessa capacidade para a validação da utilização destas células juntamente com o arcabouço polimérico para a bioengenharia de cartilagens.

As micrografias eletrônicas de varredura das Ad-MSC humanas cultivados nos arcabouços porosos 3D por 07 dias em meio condro-indutor mostraram células por toda extensão interna dos arcabouços (Figura 14) com morfologia esférica da mesma forma que os condroblastos cultivados nos arcabouços (Figura 14 - setas). Com estas células também notou-se um número de células um pouco menor nos arcabouços com poros de 38-53  $\mu\text{m}$  bem como nos polímeros I29B2 e I29B6, sem significância estatística (Figura 15). Não observamos estruturas fibrilares similares à matriz extracelular nestas culturas.

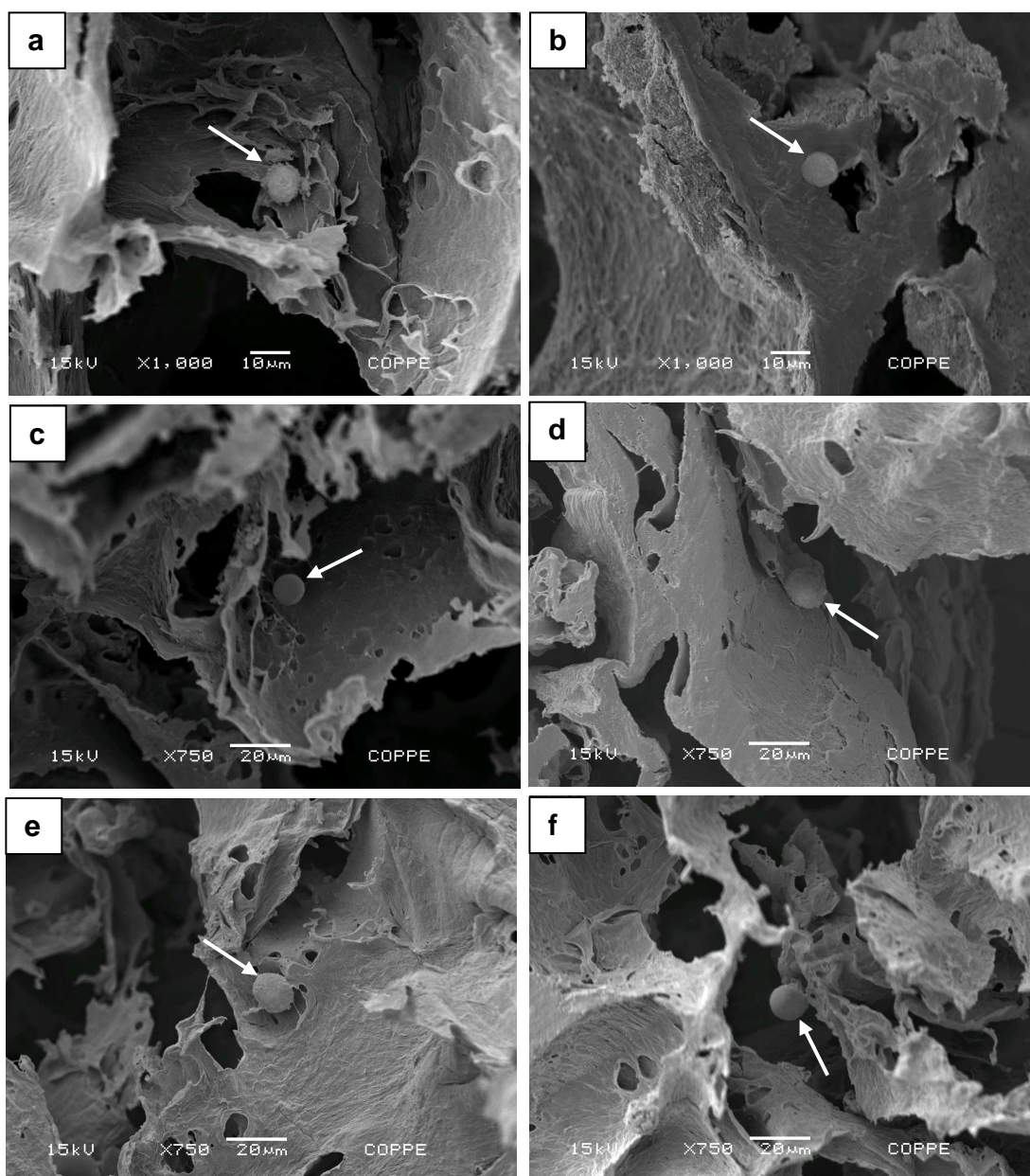


Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura de regiões internas de arcabouços de PHB (a), PHBV (b), I29B1 (c), I29B2 (d), I29B5 (e) e I29B6 (f) com poros de 75 - 150 µm. com Ad-MSC cultivados *in vitro* por 7 dias em meio condro-indutor. Em todas as figuras as setas indicam as células, com morfologias esféricas.

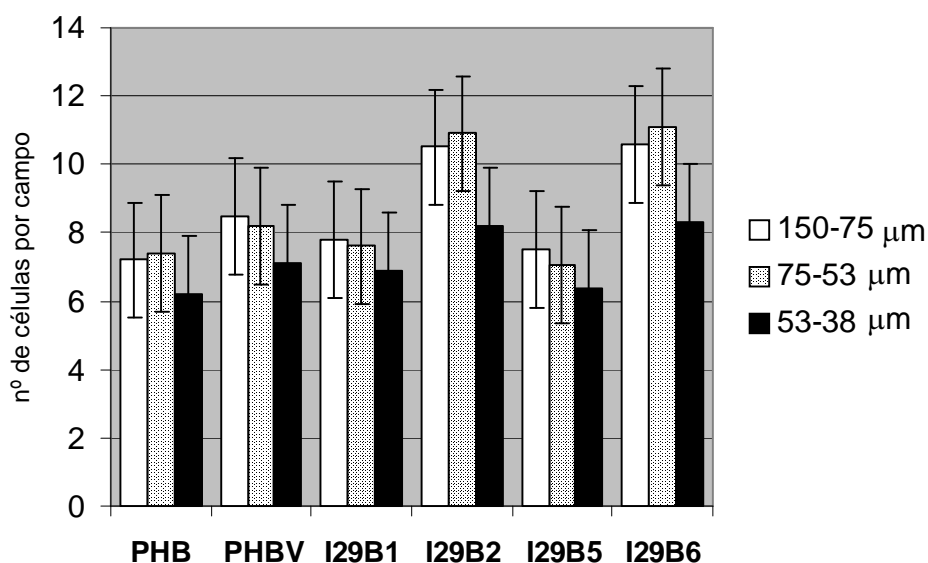


Figura 15. Gráfico comparativo do número médio de células presentes nas culturas *in vitro* de Ad-MSc humanos sobre os arcabouços dos 6 polímeros estudados. Quantificações de fotomicrografias sob baixo aumento (250X) de 5 campos aleatórios expressos como médias das células  $\pm$  desvio padrão para cada unidade experimental ( $n=3$ ). Pode-se notar que os polímeros I29B2 e I29B6 apresentaram um número de células ligeiramente maior que os demais, mas sem diferença estatisticamente significativa, da mesma forma que os condroblastos. Se compararmos o número de células em relação ao tamanho dos poros dos arcabouços de cada um dos materiais, também podemos notar a discreta tendência de os arcabouços de poro de 53-38µm apresentarem número de células reduzido, independente do polímero estudado.



## **5 DISCUSSÃO**

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos neste trabalho, dividimos a discussão em três partes:

5.1 Características físico-químicas dos novos PHA's: onde procuramos abordar os aspectos relativos às propriedades dos polímeros estudados.

5.2 PHA's como arcabouços para a bioengenharia de cartilagem: onde discutimos nossos dados na validação da utilização dos polímeros avaliados em bioengenharia de tecidos, com ênfase em tecido cartilaginoso.

5.3 Condroblastos e Ad-MSc para a bioengenharia de cartilagem: onde buscamos debater acerca do tipo celular mais adequado para a bioengenharia de cartilagem utilizando como arcabouços os biomateriais estudados neste trabalho.

### **5.1 Características físico-químicas dos novos PHA's**

Os polímeros produzidos pela bactéria *Burkholderia contaminans* I29B apresentaram novas combinações de scl-PHA e mcl-PHA, o que é um evento raro em culturas bacterianas a partir de fontes de carbono simples e não-relacionadas ao produto final (Steinbüchel, 1996). Embora o monômero mais evidente em todos os polímeros tenha sido o PHB, os monômeros presentes em menor quantidade podem ser suficientes para tornar o material mais apropriado a bioengenharia de tecidos. Salientamos ainda, entre os monômeros produzidos, a presença do PHDd nos polímeros I29B2 e I29B6, muito raramente produzido e ainda não estudado para fins de aplicações biomédicas.

Nossos resultados mostram que os maiores valores de massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) ocorrem em I29B2, I29B1 e I29B6, respectivamente. A amostra I29B2 possui a maior quantidade de PHDd (14 mol%), seguida da amostra I29B6 (6 mol%). De maneira geral, os valores de  $M_w$  são mais relacionados às propriedades mecânicas do material que a massa molar numérica média ( $M_n$ ) (Tsuge et al., 2007). Mas Tung e Buckser (1959) verificaram que um aumento no número de  $M_n$  pode provocar uma diminuição na cristalinidade, o que deixaria o polímero mais elástico e, por conseqüência, menos quebradiço. Nossos

dados corroboram com estes últimos, pois os maiores Mn são obtidos nos polímeros com maior quantidade de PHDd.

Na análise termogravimétrica, como esperado, os dados mostram que todas as amostras são completamente orgânicas, apresentando degradação térmica total ao final do procedimento, sem deixar resíduos. Apenas as amostras de PHB e I29B5 apresentaram seus processos de degradação térmica em uma única etapa de perda de massa. As demais amostras apresentam regiões com diferentes velocidades de degradação (visível nos gráficos das curvas TG anexos), possivelmente por serem misturas de diferentes polímeros, com diferentes massas molares. As regiões onde a degradação ocorre em temperaturas mais altas indicam que parte da amostra é mais resistente à ação térmica.

Na análise de calorimetria de varredura diferencial todas as amostras apresentaram dois picos de temperatura de fusão (somente visível nos gráficos) o que pode significar a presença de diferentes tamanhos de cristais. Da mesma forma, todas as amostras apresentaram Tg, Tc e Tm na mesma curva (no segundo aquecimento), padrão em poliésteres como PET (Poli-tereftalato de etileno). As amostras contendo diferentes PHA's, além do PHB, apresentaram Tg mais baixas quanto maior a quantidade dos diferentes polímeros. As amostras contendo maior quantidade de PHDd apresentaram as menores Tg, sendo estas as amostras I29B6 que apresentou Tg em 1,6 °C e I29B2 apresentando Tg em 0,76 °C. Todas as Tc ficaram em torno de 70-80 °C, exceto o PHBV que apresentou Tc em torno de 50 °C. Já as entalpias de cristalização apresentaram grande variação entre as amostras. Todas as amostras apresentaram Tm entre 168 – 175 °C, com entalpias de fusão muito próximas.

A temperatura de fusão (Tm) normalmente depende da composição do polímero (Asrar *et al.*, 2002; Gorenflo *et al.*, 2001). Entretanto a microestrutura cristalina do polímero também pode influenciar na Tm (Barbuzzi *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 1989). Serafim e colegas (2008) mostraram que a Tg e a Tm dos polímeros naturais podem variar de acordo com o microorganismo que o produziu e com a fonte de carbono oferecida ao microorganismo. Neste trabalho, pode-se

observar que as menores temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) são relacionadas aos polímeros I29B2 e I29B6 que apresentam as maiores quantidades de PHDd (Tabela 3) o que confirma sua menor cristalinidade. Assim, considerando-se as propriedades mecânicas da cartilagem hialina articular humana, bem como o impacto e pressão que sua bioprótese necessita suportar, e dos polímeros estudados, o esperado é que o I29B2 e o I29B6 se adaptem melhor à bioengenharia de cartilagem que os demais.

## **5.2 PHA's como arcabouços para a bioengenharia de cartilagem**

Embora já esteja bem descrito na literatura a biocompatibilidade do PBH e do PHBV (Shishatskaya & Volova, 2004), consideramos importante validarmos este dado em nosso estudo, primeiramente em sistema de cultura bidimensional, pois apesar dos cuidados com a purificação dos polímeros, o material pode apresentar resíduos provenientes de seu processo de produção e/ou extração, potencialmente tóxicos às células. Consideramos os estudos de biocompatibilidade do PHB e do PHBV como representativos dos materiais estudados, tendo em vista que estes são os constituintes majoritários dos mesmos e o processo de extração de todos os polímeros seguiu rigorosamente o mesmo protocolo.

Estudos prévios de culturas bidimensionais de condroblastos demonstraram a perda do fenótipo condrocítico dessas células o que levou a diminuição da síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II e aumento da expressão de colágeno tipo I (Schnabel et al, 2002; Murphy & Sambanis, 2001; Stewart et al, 2000). A suplementação do meio com soro fetal bovino ou humano (Stewart et al, 2000), a adesão celular ao substrato de cultura (Häuselmann et al, 1994) e a tensão de oxigênio (Murphy & Sambanis, 2001) são as principais causas desta diferenciação dos condroblastos em sistema bidimensional. Por outro lado, sabe-se que a informação espacial recebida pelas células em sistemas de cultura tridimensional também representa um importante fator para a manutenção do fenótipo celular em sistemas de cultura *in vitro* ou ainda para a diferenciação dos condroblastos (Benya & Shaffer, 1982). Em todas as nossas condições experimentais de cultura

bidimensional as células apresentaram diferenciação fenotípica, adquirindo morfologia não-esférica.

Mesmo com as diferenças observadas na adesão e proliferação celular nos dois polímeros em relação ao tratamento controle, as células semeadas foram capazes de sobreviver sobre os filmes poliméricos pelo período experimental de 7 dias, em concordância com a literatura a respeito da citocompatibilidade dos materiais. Sobre a superfície do filme de PHB os condroblastos se mostram mais espalhados que no tratamento controle. Esta característica pode refletir uma maior afinidade das células pelo substrato de PHB do que pelo vidro. Já sobre a superfície do filme de PHBV os condroblastos apresentam tanto algumas formas fibroblastóides (mais alongadas) quanto algumas mais espalhadas. Mesmo as células mais espalhadas sobre o PHBV, parecem ter menos pontos de ancoramento do que sobre o vidro ou sobre o PHB, o que pode ser explicado pela menor afinidade das células pelo substrato de PHBV do que pelos demais. É possível ainda que essa adesão muito fraca das células também seja impeditiva de seu estado proliferativo, pois a sinalização recebida pela célula através da adesão em sistema de cultura bidimensional desempenha um importante papel na capacidade de divisão celular (Lee *et al.*, 1994). Com base neste raciocínio, a pouca adesão mostrou-se um fator mais crítico para a proliferação de condroblastos do que a adesão excessiva, notando-se que nas culturas sobre o PHB pudemos observar algumas células em processo de divisão e não as observamos sobre o PHBV (dados não mostrados). Assim, nossos resultados estão de acordo com a literatura mostrando um maior número de células nos materiais onde elas são capazes de aderir de forma moderada, fator geralmente determinado pela hidrofiliabilidade moderada da superfície (Lydon *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1994).

A rugosidade da superfície dos filmes poliméricos também pode ter influenciado o comportamento celular de maior ou menor adesão. Embora o PHB e o PHBV tenham apresentado morfologia de superfície semelhantes e diferentes condições morfológicas das células cultivadas sobre eles, este aspecto parece ser importante, pois o tratamento controle deste ensaio foi utilizando culturas sobre

uma lamínula de vidro, que apresentam superfícies lisas, embora não tenhamos encontrado dados disponíveis na literatura para comparação de dados.

Com relação aos arcabouços tridimensionais porosos, verificamos inicialmente que a técnica de evaporação do solvente com lixiviação de sal é, embora trabalhosa, de fácil execução e de excelente reprodutibilidade. Esta técnica foi escolhida entre diversas outras, como a *fiber bonding* (Mikos *et al.*, 1993), injeção de gases (Mooney *et al.*, 1996), utilização de esferas de cera de diferentes diâmetros (Belyakova *et al.*, 1984) e inversão de fases (Mooney *et al.*, 1996), por ser a que apresenta melhor controle da quantidade e do tamanho dos poros produzidos no arcabouço (Mikos *et al.*, 1994). Ao utilizarmos um solvente orgânico de alta qualidade e certificarmos-nos de sua total evaporação bem como da completa retirada do sal, evitamos a permanência de resíduos nos arcabouços que pudessem influenciar negativamente a biocompatibilidade do material, o que, para Mikos *et al.* (1994), representa uma das grandes desvantagens desta técnica. Todos os arcabouços produzidos, independentemente do polímero utilizado, apresentaram poros interconectados com tamanhos fixos e dentro da faixa granulométrica do sal utilizado como agente porogênico, e sem apresentar resíduos de sal.

Entretanto, para que um material possa ser utilizado como arcabouço celular na bioengenharia de tecidos, as características físico-químicas do material, a capacidade de produção de um bom arcabouço e sua não citotoxicidade não são suficientes. Faz-se necessário, ainda, verificarmos como o organismo hospedeiro reage ao material. Essa relação de biocompatibilidade entre um biomaterial e o organismo animal é verificada através da reação à implantação na cápsula renal, no peritônio, intramuscular ou subcutâneamente da estrutura a ser estudada, onde ainda pode-se verificar a degradação e/ou transformação do material em condições fisiológicas.

Sevastianov *et al.* (2003) já mostraram que filmes de PHB e PHBV em contato com sangue ativam o sistema de coagulação e as reações de complemento, mas sem ativar a resposta celular. Suturas de PHB e PHBV implantadas intramuscularmente em animais por até um ano também não

causaram reação vascular aguda no local do implante e nenhum evento adverso como inflamação supurativa, necrose, calcificação da cápsula fibrosa ou formação de tumor maligno. (Chen & Wu, 2005). Também é descrito um estágio prolongado de macrófagos pronunciados como reação tecidual à implantação de PHA's, que apresenta células dos tipos fagocítico e células gigantes (Volova *et al*, 2003).

De maneira geral, as reações do tecido do hospedeiro à implantação de um biomaterial incluem: a injúria local pela cirurgia, interação sangue-material, formação de uma matriz provisional, inflamação aguda, inflamação crônica, formação de tecido de granulação, reação de corpo estranho e desenvolvimento de cápsula fibrótica. A degranulação de mastócitos com liberação de histamina e adsorção de fibrinogênio é conhecida por mediar a inflamação aguda em resposta a biomateriais implantados, mas se extingue rapidamente, não perdurando por mais de uma semana (Tang *et al.*, 1998; Zdosek *et al.*, 2007). Seguindo a inflamação aguda, a inflamação crônica é identificada pela presença de células mononucleares como monócitos e linfócitos, além de plaquetas. A reação de corpo estranho, onde monócitos, macrófagos e células gigantes estão presentes na interface de um material implantado *in vivo*, é utilizada para avaliar a biocompatibilidade deste. Em materiais biocompatíveis, as respostas inflamatórias aguda e crônica se extinguem em poucas semanas.

Em nosso modelo experimental *in vivo* não observamos grandes infiltrados linfocíticos nas adjacências do material que sinaliza ausência de resposta imune adaptativa (reação inflamatória imunogênica) durante o período experimental. A formação da cápsula fibrosa, constituída de células fibroblastóides e material de matriz fibrilar, recobrimdo todo o arcabouço e a presença de células fibroblastóides e células multinucleadas aderidas às paredes do polímero representam uma reação aceitável e estão de acordo com as respostas inflamatórias esperadas para materiais biocompatíveis.

Não foram observadas diferenças entre os arcabouços com diferentes tamanhos de poros quanto à reação de corpo estranho ou à degradação do biomaterial embora Stock *et al.* (2000) descrevam a relação direta entre o tamanho do poro com a velocidade de degradação do material. A birrefringência

das paredes do PHB observada sob microscopia de luz polarizada, independente da porosidade do arcabouço, evidencia sua resistência à degradação em curto prazo. Acreditamos que nossos resultados possam se aproximar mais dos dados da literatura ao aumentarmos o tempo de experimentação, pois de acordo com Martin & Williams (2003), a partir de 6 meses de implantação já é possível observar sinais da degradação de PHA's. Durante a degradação dos PHA's, eles ainda sofrem perdas graduais em suas propriedades mecânicas, o que pode ser considerado como uma das vantagens da sua utilização em relação aos polímeros sintéticos absorvíveis, como o PGA, que perdem abruptamente suas características (Stock *et al.*, 2000). Essa característica é especialmente desejada quando o material do implante é degradado concomitantemente ao crescimento de um novo tecido especializado, como as cartilagens articulares, que sofrem pressões constantes.

### **5.3 Condroblastos e Ad-MSc para a bioengenharia de cartilagem**

Os condrócitos são células especializadas na produção única da matriz da cartilagem hialina o que não favorece a proliferação em condições naturais de reparação do tecido em condições de injúria. Para contornar esta limitação, o número inicial de células semeadas numa bioprótese deve ser superior ou próximo das condições *in vivo* da cartilagem, o que por si só esbarra na necessidade de coleta de um grande número de células sadias, gerando uma nova lesão. Na condição de cultura bidimensional, estas células possuem alta taxa de proliferação, porém perdem o fenótipo condrocítico. Por outro lado, a manutenção do fenótipo na condição 3D restringe o potencial de proliferação destas células de maneira adequada para sua utilização em protocolos de terapias celulares. A solução encontrada é a retirada do menor número possível de células sadias, a proliferação bidimensional das mesmas e a posterior recuperação fenotípica em ambiente tridimensional. Em virtude de sua conhecida possibilidade de diferenciação condrocítica, as AD-MSCs surgem como alternativa de fonte

abundante de células autólogas adquiridas por método pouco invasivo e cuja coleta não gera lesão nas cartilagens saudáveis.

Tanto os condroblastos não induzidos quanto as Ad-MSC induzidas cultivadas nos arcabouços de PHA's, foram capazes de colonizar toda extensão interna dos arcabouços, apresentado um número de células ligeiramente maior nos arcabouços de maiores poros (tamanho). Nossos dados, demonstrando a organização dessas estruturas com poros interconectados, nos mostra o tamanho dos poros como um fator importante para a colonização do arcabouço e sobrevivência das células semeadas. Estes resultados corroboram com Mikos *et al.* (1993), que propuseram que a taxa de migração e proliferação celular em suportes porosos está diretamente relacionada ao tamanho e distribuição dos poros bem como com a cristalinidade do material utilizado devido à facilidade de difusão dos nutrientes e gases teciduais.

Ambos tipos celulares testados neste trabalho apresentaram morfologia esférica, quando cultivados nos arcabouços 3D. Observamos ainda um pequeno número de células, de ambos tipos também, que aderiu na superfície dos arcabouços sem penetrar na sua estrutura adquirindo forma fibroblastóide (dados não mostrados). A mudança de morfologia dos condroblastos e das Ad-MSCs induzidas, de fibroblastóide (apresentada durante o isolamento e a expansão bidimensional) para esférica, é um fator indicativo da adequada re-diferenciação/diferenciação celular, indicando a possibilidade de essas células produzirem matriz celular de cartilagem hialina. Esses resultados reforçam a idéia de que o ambiente tridimensional auxilia na manutenção da morfologia esférica típica dos condrócitos, que somente assim expressam as moléculas da matriz extracelular da cartilagem hialina. Desta forma a escolha do arcabouço 3D pode ter um papel crucial no sucesso da bioengenharia de cartilagens.

Condroblastos animais foram previamente testados quanto ao seu uso em arcabouços de PHBV (Köse *et al.*, 2005) e PHB-HHx (Deng *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008) para a bioengenharia de cartilagens e recentemente Chuan *et al.* (2009) publicaram seus experimentos de condro-indução de Ad-MSCs humanas em arcabouços de PHB-HHx. Estes trabalhos também descrevem a



formação de matriz extracelular específica de cartilagem hialina, apresentando bons resultados de regeneração de lesões após implantação *in vivo*. Mas em nenhum dos casos já descritos se avaliou conjuntamente a influência do tipo celular, do tamanho do poro e do tipo de polímero do arcabouço. Além deste diferencial, em nosso trabalho ainda testamos novos polímeros exclusivos (I29Bs), e no caso dos I29B2 e I29B6, com a presença de consideráveis quantidades de PHDd, nunca testado para esses fins. Acreditamos que com o aumento do período de cultivo *in vitro* possamos obter maior produção de matriz extracelular em nossos sistemas 3D de cultura, de modo a serem detectados pelas técnicas de detecção que utilizamos. Por fim, nosso ideal é que, após o menor tempo possível de cultivo em laboratório, possamos produzir peças híbridas de cartilagem/PHA's com células do próprio paciente e que com a degradação gradual do polímero após a implantação, a nova cartilagem possa regenerar o tecido lesado.

## **6 CONCLUSÕES**

- Os PHA's estudados se mostraram atóxicos e biocompatíveis com nossos sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo*, evidenciando a ausência de resíduos provenientes dos processos de produção, extração e preparação dos polímeros.

- A técnica de produção de arcabouços porosos tridimensionais pela evaporação de solvente com lixiviação de sal é adequada para a utilização dos PHA's estudados para a bioengenharia de cartilagem.

- Entre os três tamanhos de poros estudados, os de 53-75 $\mu$ m e de 75-150 $\mu$ m apresentaram melhor quantidade de células em todos os polímeros.

- Tanto os condroblastos quanto as Ad-MSC humanos condro-induzidas cultivados nos arcabouço de PHA's apresentaram morfologia esférica, sugerindo a manutenção/ obtenção do fenótipo de cartilagem hialina e a possibilidade de produção de matriz extracelular adequada.

- Entre todas as variações testadas neste trabalho, os arcabouços com poros de 53-75 $\mu$ m e de 75-150 $\mu$ m dos novos polímeros I29B2 e I29B6 (que contém PHDd), utilizando Ad-MSCs condro-induzidas como fonte de células autólogas, mostram-se os mais promissores para a bioengenharia de cartilagens, pois apresentaram células de morfologia esférica, que sugere a obtenção do fenótipo pretendido (semelhante aos condroblastos cultivados em 3D), e utilizando uma fonte de células abundante que não acarretaria a criação de uma nova lesão articular de explante no paciente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ailhaud, G.; Grimaldi, P.; Négrel, R. (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr.* 12: 207-233.
- Akintoye, S. O.; Lam, T.; Shi, S.; Brahim, J.; Collins, M. T.; Robey, P. G. (2006). Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone* 38:758-768.
- Alsberg, E.; Anderson, K.W.; Albeiruti, A.; Rowley, J.A. and Mooney, D. (2002). Engineering growing tissues. *PNAS*, 99 (19): 12025-12030.
- Anderson, A. J. & Dawes, E. A. (1990). Review: Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol.*, 54 (4): 450-472.
- Asrar, J.; Valentin, H. E.; Berger, P. A.; Tran, M.; Padgett, S. R.; Garbow, J. R. (2002) Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) polymers. *Biomacromol.* v. 3, p. 1006–1012.
- Baptista, L. S.; Pedrosa, C. G. S.; Silva, K. R.; Otazú, I. B.; Takyia, C. M.; Dutra, H. S.; Cláudio-da-Silva, C.; Borojevic, R.; Rossi, M. I. D. (2007). Bone Marrow and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: How Close Are They? *J Stem Cells.* 2: issue 2.
- Barbuzzi, T.; Giuffrida, M.; Impallomeni, G.; Carnazza, S. (2004) Microbial synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from fatty acids: identification of higher monomer units and structural characterization. *Biomacromol.*, v. 5, p. 2469–2478.
- Belyakova, L. D.; Kiselev, A. V.; Platonova, N. P. and Shevchenko T. I. (1984). Porous organic polymers: Structure, surface chemistry and adsorption of certain gases. *Advances in Colloid and Interface Science*, 21 (1-2): 55-118.
- Benya, P. D. & Shaffer, J. D. (1982). Dedifferentiate chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 30: 215-224.
- Bernardo, M. E. , Locatelli, F., Fibbe, W. E. (2009). Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Treatment Modality for Tissue Repair. *Ann N Y Acad Sci.* 1176:101-117.
- Bianco, P. & Robey, P. G. (2000). Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.*;105: 1663-1668.

- Bonatto, D.; Matias, F.; Lisboa, M. P.; Bogdawa, H. M.; Henriques, J. A. P. (2004). Production of short side chain-poly(hydroxyalkanoate) by a newly isolated *Ralstonia picketti* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 20: 395-403.
- Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. (1998). Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect.* 47:487-504.
- Carvalho, H. F. & Collares-Buzato, C. B. (2005). Células- Uma abordagem multidisciplinar. Ed. Manole.357-371.
- Casteilla, L.; Planat-Bénard, V.; Cousin, B.; Silvestre, J. S.; Laharrague, P.; Charrière, G.; Carrière, A.; Pénicaud, L. (2005). Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Arch Mal Coeur Vaiss.* 98: 922-926.
- Chen, G. Q. & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26: 6565-6578.
- Cohen, N.P.; Foster, R.J. and Mow, V.C. (1998). Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther.*, 28 (4): 203-215.
- Corre, J.; Barreau, C.; Cousin, B.; Chavoin, J. P.; Caton, D.; Fournial, G.; Penicaud, L.; Casteilla, L.; Laharrague, P. (2006). Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol.* 208: 282-288.
- Dausse, Y.; Grossin, L.; Miralles, G.; Pelletier, S.; Mainard, D.; and Payan, E. (2003). Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterial: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11: 16-28.
- De Bari, C.; Dell'Accio, F.; Tvizanowski, P.; Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44: 1928-1942.
- Dellavalle, A.; Sampaolesi, M.; Tonlorenzi, R.; Tagliafico, E.; Sacchetti, B.; Perani, L.; Innocenzi, A.; Galvez, B. G.; Messina, G.; Morosetti, R.; Li, S.; Belicchi, M.; Peretti, G.; Chamberlain, J. S.; Wright, W. E.; Torrente, Y.; Ferrari, S.; Bianco, P.; Cossu, G. (2007). Pericytes of human skeletal

- muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol.* 9:255-267.
- Deng, Y.; Zhao, K.; Zhang, X. F.; Hu, P.; Chen, G. Q. (2002). Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds. *Biomaterials* 23(20):4049-4056.
- Deng, Y.; Lin, X.S.; Zheng, Z.; Deng, J.Q.; Chen, J.C. and Chen G.Q. (2003). Poly(hydroxybutyrate-co-valerate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials* 24: 4273-4281.
- Dominici, M. L.; Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D. J.; Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8: 315-317.
- Donovan, P.J. & Gearhart J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature.*414: 92-97.
- Eikenberry, E. F.; Mendler, M.; Burgin, R.; Winterhalter, K. H.; Bruckner, P. (1992). Articular cartilage and osteoarthritis (Kuettner, K.E.; Schleyerbach, R.; Peyron, J.G.; Hascall VC., eds.). *New York, Raven Press*, 133-149.
- Fragonas, E.; Valente, M.; Pozzi-Mucelli, M.; Toffanin, R.; Rizzo, R.; Silvestri, F.; Vittur, F. (2000). Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 21(8):795-801.
- Gartner, L. P.& Hiatt, J. L. (2002). Atlas colorido de Histologia. 3º Ed. Guanabara Koogan. 464 págs.
- Gorenflo, V.; Schmack, G.; Vogel, R.; Steinbuchel, A. (2001). Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4-Hydroxyvalerate-Containing Polyesters and Characterization of Their Physical and Mechanical Properties. *Biomacromol.*, v. 2, p. 45–57.
- Gotfredsen, K.; Nimb, L. and Hjorting-Hansen, E. (1994). Immediate implant placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforce with polygalactin 910. *Clin. Oral Impl. Res.*, 5: 83-91.
- Häuselmann, H. J.; Fernandes, R. J.; Mok, S. S.; Schmidt, T. M.; Block, J. A.; Aydelot, M. B.; Kuettner, K. E.; Thonar, E. J.-M. (1994). Phenotypic stability

- of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell. Sci.*, 107: 12-27.
- Hutmacher, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21 (24): 2529-2543.
- Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L.; Schwartz, R. E.; Keene, C. D.; Ortiz-Gonzalez, X. R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W. C.; Largaespada, D. A.; Verfaillien, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418: 41-49.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica – Texto/ Atlas*. Ed. Guanabara Koogan. 11<sup>o</sup> edição. 542 págs.
- Kaltz, N.; Funari, A.; Hippauf, S.; Delorme, B.; Noël, D.; Riminucci, M.; Jacobs, V. R.; Häupl, T.; Jorgensen, C.; Charbord, P.; Peschel, C.; Bianco, P.; Oostendorp, R. A. J. (2008). In Vivo Osteoprogenitor Potency of Human Stromal Cells from Different Tissues Does Not Correlate with Expression of POU5F1 or Its Pseudogenes. *Stem Cells*; 26 (9): 2419-2424.
- Kamiya, N.; Yamamoto, Y.; Inque, Y.; Chujo, R.; Doi, Y. (1989). Microstructure of bacterially synthesized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromol.*, v. 22, p. 1676–1682.
- Kang, I. K.; Choi, S. H.; Shin, D. S. and Yoon, S. C. (2001). Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibroblasts. *Int. J. of Biol. Macromol.* 28: 205-212.
- Kaplan, R. N.; Psaila, B.; Lyden, D. (2007). Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med.* Feb;13:7 2-81.
- Köse, G. T.; Korkusuz, F.; Ozkul, A.; Soysal, Y.; Ozdemir, T.; Yildiz, C. and Hasirci, V. (2005). Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials*, 26 (25): 5187-5197.
- Kögler, G.; Sensken, S.; Airey, J. A.; Trapp, T.; Müschen, M.; Feldhahn, N.; Liedtke, S.; Sorg, R. V.; Fischer, J.; Rosenbaum, C.; Greschat, S.; Knipper, A.; Bender, J.; Degistirici, Ö.; Gao, J.; Caplan, A. I.; Colletti, E. J.; Almeda-Porada, G.; Müller, H. W.; Zanjani, E.; Wernet, P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 200:123-35.

- Krause, D.S.; Theise, N. D.; Collector, M. I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S.; Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.
- Kuznetsov, S. A.; Mankani, M. H.; Gronthos, S.; Satomura, K.; Bianco, P.; Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.*153:1133-40.
- Lee, J. H.; Jung, H. W.; Kang, I. K. and Lee, H. B. (1994). Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. *Biomaterials*, 9 (15): 705-711.
- Lenz, R. W. & Marchessault, R. H. (2005). Review: Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*, 6 (1):1-8.
- Lydon, M .J.; Minett, T. W. and Tighe, B. J. (1985). Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. *Biomaterials*, 6:396-402.
- Lu, L.; Zhu, X.; Valenzuela, R. G.; Currier, B. L. and Yaszemski, M.J. (2001). Biodegradable polymer scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Clin Orthop.and Rel.*, 391: 251-257.
- Matias, F. (2009). Caracterização de linhagens bacterianas isoladas da biodiversidade brasileira quanto à produção de biopolímeros. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade de São Paulo, São paulo. 165p.
- Martin, D. P. & Williams, S. F. (2003). Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal* 16: 97–105.
- Mikos, A. G.; Sarakinos, G.; Leite, S. M.; Vacanti, J. P.; Langer, R. (1993). Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 14:323-330.
- Mikos, A. G.; Thorsen, A. J.; Czerwonka, L. A.; Bao, Y.; Langer, R.; Winslow, D. N.; Vacanti, J. P. (1994). Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams. *Polymer*, 35:1068-1077.
- Minas, T. (1999). The role of cartilage repair techniques, including chondrocyte transplantation, in focal chondral knee damage. *AAOS Inst Course Lect.*, 48: 629-643.

- Mooney, D. J.; Baldwin, D. F.; Suh, N. P., Vacanti, J. P.; Langer, R. (1996). Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents *Biomaterials*, 17 (14): 1417-1422.
- Moreland, L. W. (2003). Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanism of action. *Arthritis Res. Ther.* 5: 54-67.
- Müller, H. M. & Seebach, D. (1993). Poly(hydroxyalkanoates): A fifth class of physiologically important organic biopolymers. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 4 (32): 477-502.
- Murphy, C. L., Sambanis, A. (2001). Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng*, 7(6): 791-803.
- Novikov, L. N.; Novikova, L. N.; Mosahebi, A.; Wiberg, M.; Terenghi, G. and Kellerth J. O. (2002). A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials*, 23: 3369-3376.
- O'Driscoll, S. W. (1998). The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 80(12):1795-1812.
- Park, S. J.; Park, J. P. and Lee, S. Y. (2002). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. *FEMS Microbiology Letters*, 214: 217-222.
- Poirier, Y.; Nawrath, C. and Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnol*, 13: 142-150.
- Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276(5309):71-74.
- Reusch, R. N.; Sparrow, A. W. and Gardiner, J. (1992). Transport of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in human plasma. *Bioch. et Bioph. Acta*, 1123: 33-40.
- Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414: 105-111.
- Riis, V. & Mai, W. (1988). Gas chromatography determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J. Chromatogr.*, 445: 285-289.



- Rodrigues, M. F. A. (1995). Isolamento e caracterização de bactérias quanto à produção de poli-hidroxi-alcenoatos (PHAs) e clonagem dos genes de biossíntese de PHA de *Burkholderia sp.*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 151 f.
- Sader, M. S.; Ferreira, M.; Dias, M. L. (2006). Preparação e caracterização de estruturas porosas de Poli(3-hidroxi-butirato). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 16 (1): 12-18.
- Saldanha, V. & Grande, D. A. (2000). Extracellular matrix protein gene expression of bovine chondrocytes cultured on resorbable scaffolds. *Biomaterials*, 21: 2427-2431.
- Schnabel, M.; Marlovits, S.; Eckhoff, G.; Fichtel, I.; Gotzen, L.; Vé csei, V.; Schlegel, J. (2002). Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis and Cartilage*. 10: 62-70.
- Schäffler, A. & Büchler, C. (2007). Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 25: 818-827.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Torres, C.; Reis, M. A. M.; Ramos, A. M. (2008). The Influence of Process Parameters on the Characteristics of Polyhydroxyalkanoates Produced by Mixed Cultures. *Macromol. Biosci.* v. 8, p. 355–366.
- Sevastianov, V, I.; Perova, N. V.; Shishatskaya, E. I.; Kalacheva, G. S.; Volova, T. G. (2003). Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 14 (10):1029-1042
- Shi, S. & Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.*18:696-704.
- Shih, D. T.; Lee, D. C.; Chen, S. C.; Tsai, R. Y.; Huang, C. T.; Tsai, C. C.; Shen, E. Y.; Chiu, W. T. (2005). Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*. 23:1012-20.
- Shimao, M (2001). Biodegradation of plastics. *Curr. Op. of Biotechnol.* 12: 242-247.

- Shin, H.; Jo, S. and Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 24: 4353-4364.
- Shishatskaya, E. I.; Volova, T. G.; Puzyr, A. P.; Mogilnaya, Efremof, S. N. (2004). Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate suture. *J. Mat. Sci.: Mat. In Med.* 15: 719-728.
- Shishatskaya, E. I. & Volova, T. G. (2004). A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. *J. Mat. Sci.: Mat. In Med.* 15: 915-923.
- Sittinger, M.; Hutmacher, D. W. and Risbud, M. V. (2004). Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr. Op. in Biotechnol.* 15 (5): 411-418.
- Spradling, A.; Drummond-Barbosa, D.; Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*. 414: 98-104.
- Steinbüchel, A. & Valentin, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.128, p. 219-228,.
- Steinbüchel, A. (1996). PHB and other Polyhydroxyalkanoic acids. In: Rehm, H. J.; Reed, G.; Roehr, M. (Ed.). *Products of primary metabolism*. Weinheim: Willey VCH, p.405- 464.
- Stewart, M. C.; Saunders, K. M.; Burton-Wurster, N.; Macleod, J. N. (2000). Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J. Bone Miner. Res.* Jan; 15(1): 166-174.
- Stock, U. A.; Sakamoto, T. U.; Stock, T.; Hatsuoka, S.; Martin, D. P.; Nagashima, M.; Moran, A. M.; Moses, M. A.; Kahlil, P. N.; Schoen, F. J.; Vacanti, J. P.; Mayer, J. E. Jr. (2000). Patch augmentation of the pulmonary artery with bioabsorbable polymers and autologous cell seeding. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120: 1158-1167.
- Tang, L.; Jennings, T. A.; Eaton, J. W. (1998). Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci US A.*, 95 (15):8841–8846.
- Temenoff, J. S. & Mikos, A. G. (2000). Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21: 431-440.
- Tsuge, T.; Watanabe, S.; Shimada, D.; Abe, H.; Doi, Y.; Taguchi, S. (2007). Combination of N149S and D171G mutations in *Aeromonas caviae*

- polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 277, p. 217–222.
- Tung, L. H. & Buckser, S. (1958). The Effects of Molecular Weight on the Crystallinity of Polyethylene. *J. Phys. Chem.*, v. 62, p. 1530–1534.
- Volova, T.; Shishatskaya, E.; Sevastianov, V.; Efremov, S. and Mogilnaya, O. (2003). Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochem. Eng. J.* 16:125-133.
- Ye, C.; Hu, P.; Ma, M. X.; Xiang, Y.; Liu, R. G.; Shang, X. W. (2009). PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 30(26):4401-4406.
- Wang, Y.; Bian, Y. Z.; Wu, Q.; Chen, G. Q. (2008). Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials.* 29(19):2858-68.
- Wang, J. F.; Wang, L. J.; Wu, Y. F.; Xiang, Y.; Xie, C. G.; Jia, B. B.; Harrington, J.; McNiece, I. K. (2004). Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support or ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica.* 89:837-44.
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 287: 1442-1446.
- Zdolsek, J.; Eaton, J.W.; Tang, L. (2007). Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. *J Transl Méd.* 1;5:31.
- Zhao, K.; Deng Y. and Chen, G. Q. (2003). Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. *Biochem, Eng. J.*, 16 (2): 115-123.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7: 211-228.

**Online Websites**

HEALTH PAGES. [<http://www.the-health-pages.com/images/artic0.jpg>]  
acessado em 03/ago/2009.

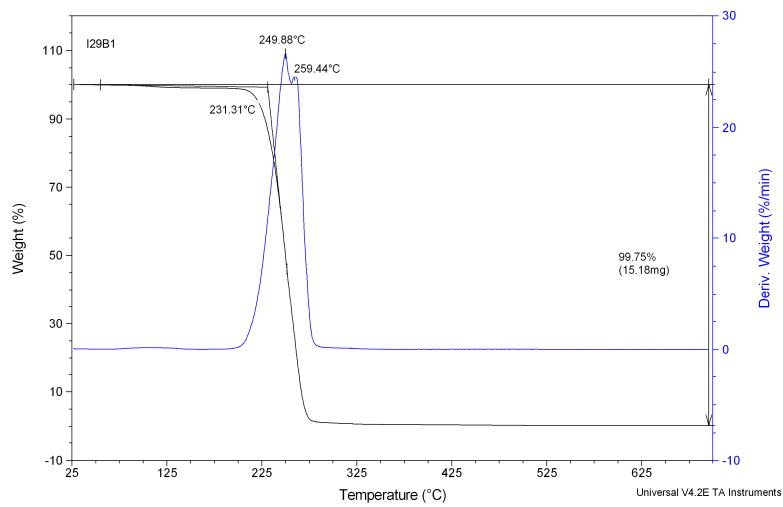
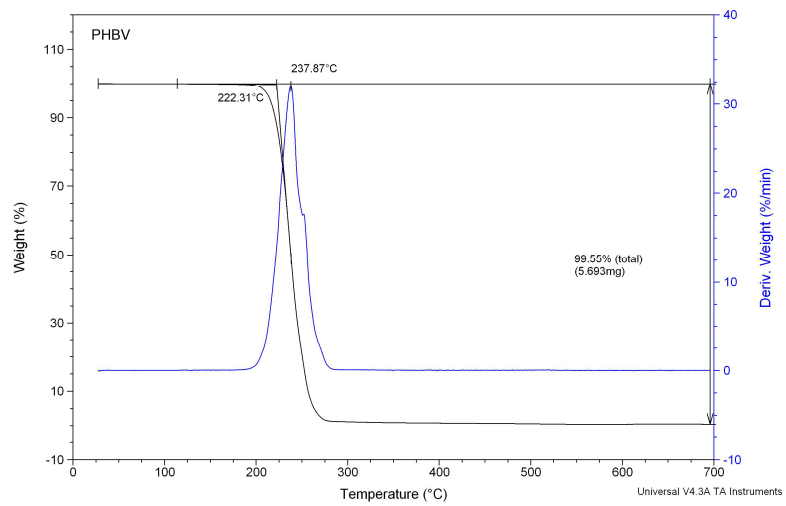
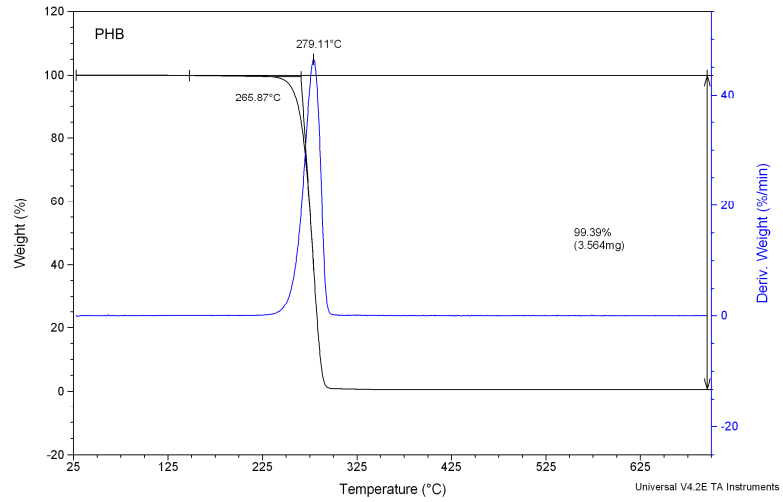
ESPACENET. [<http://ep.espacenet.com/>] acessado em 20/jul/2009.

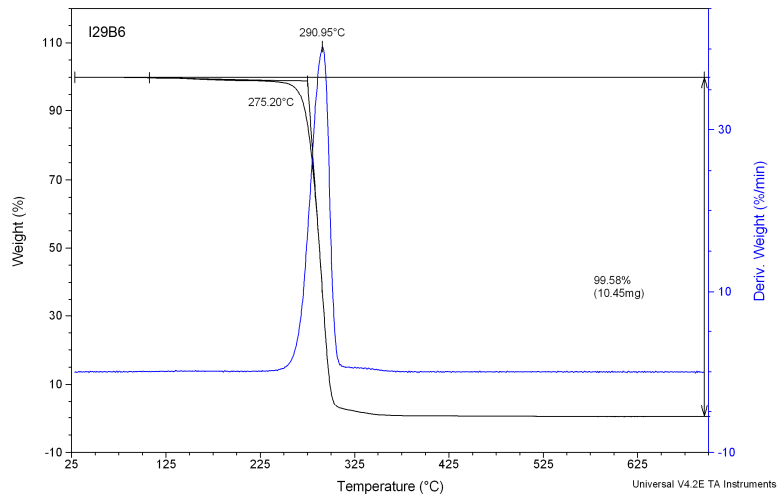
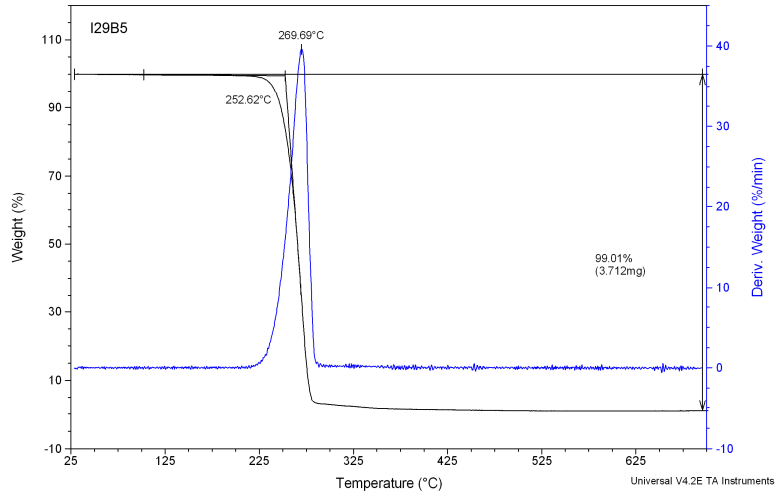
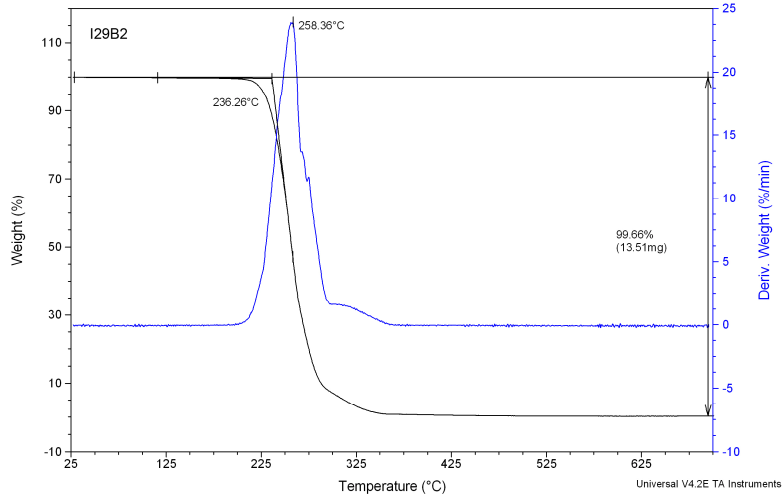
# Anexos

### **Protocolo de propanólise**

Para a propanólise, a cerca de 20 mg de células liofilizadas, foram adicionados 0,2 ml de padrão interno (ácido benzóico 4% em propanol), 2 ml de uma solução de n-propanol com ácido clorídrico numa proporção de 4:1 e 2 ml de 1,2 dicloroetano. O sistema fechado foi incubado a 100 °C por 3 horas. Findado o tempo de fervura, os tubos foram retirados do banho e deixados atingir a temperatura ambiente e só então foram adicionados 4 ml de água MILLI-QR. A solução foi agitada vigorosamente por 1 minuto e posteriormente mantida em repouso. Quando as duas fases se separaram, foi retirada a fase superior ou aquosa e então foi adicionado à fase orgânica sulfato de sódio anidro. A fase orgânica (contendo o dicloroetano e os propilésteres dos ácidos hidroxialcanóicos) foi transferida para um tubo de cromatografia a gás (Riis & Mai, 1988).

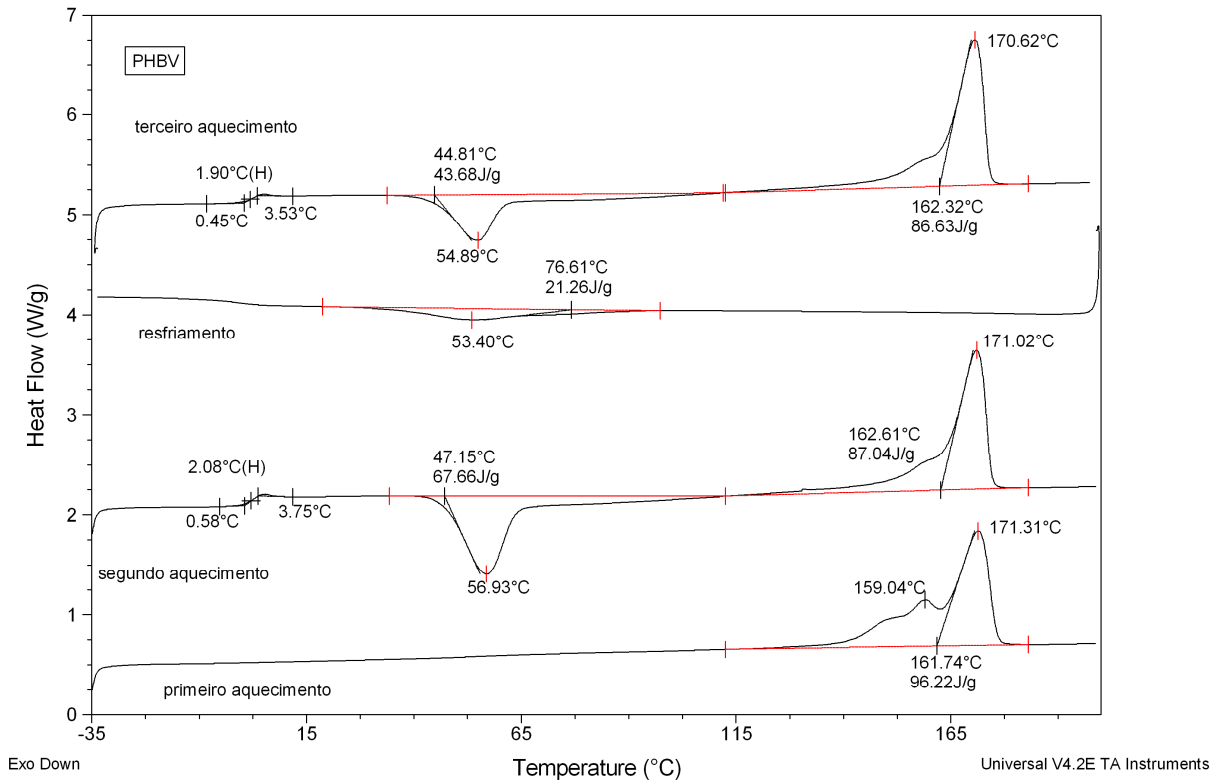
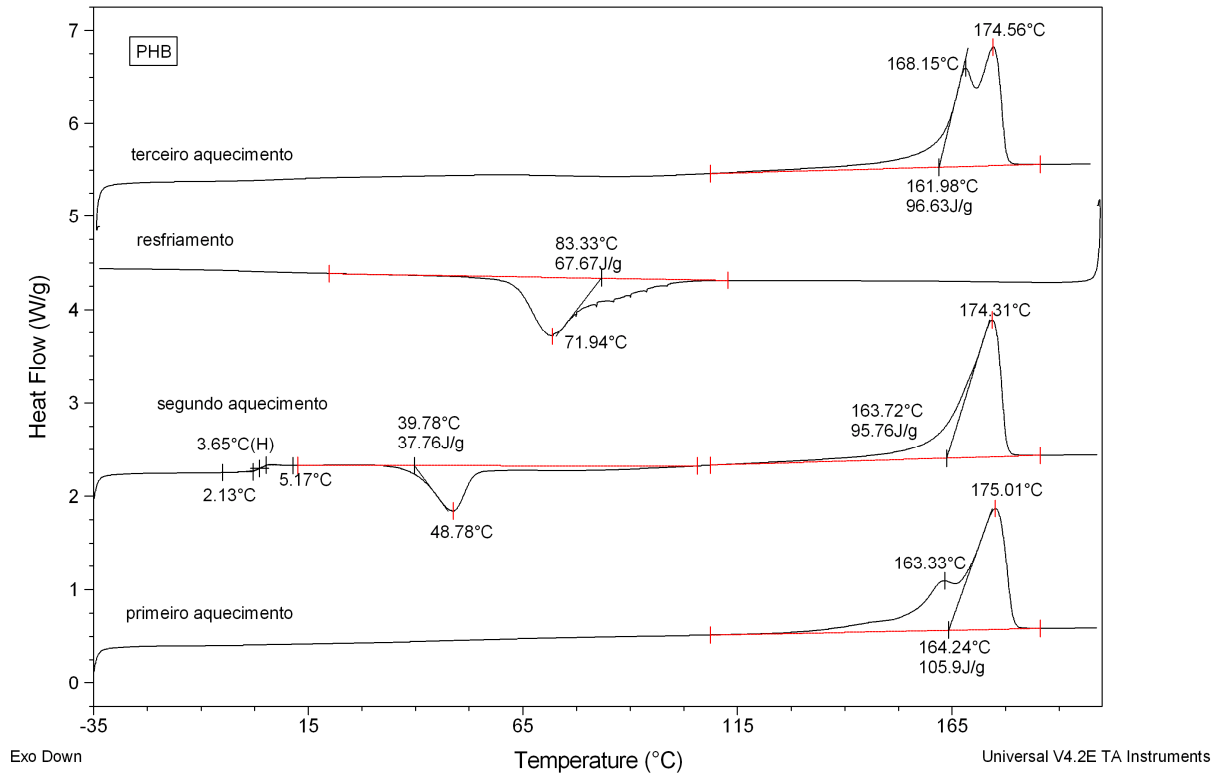
**Curvas Termogravimétricas (TG):** Curva termogravimétrica (preto) e primeira derivada da curva de perda de massa (azul).



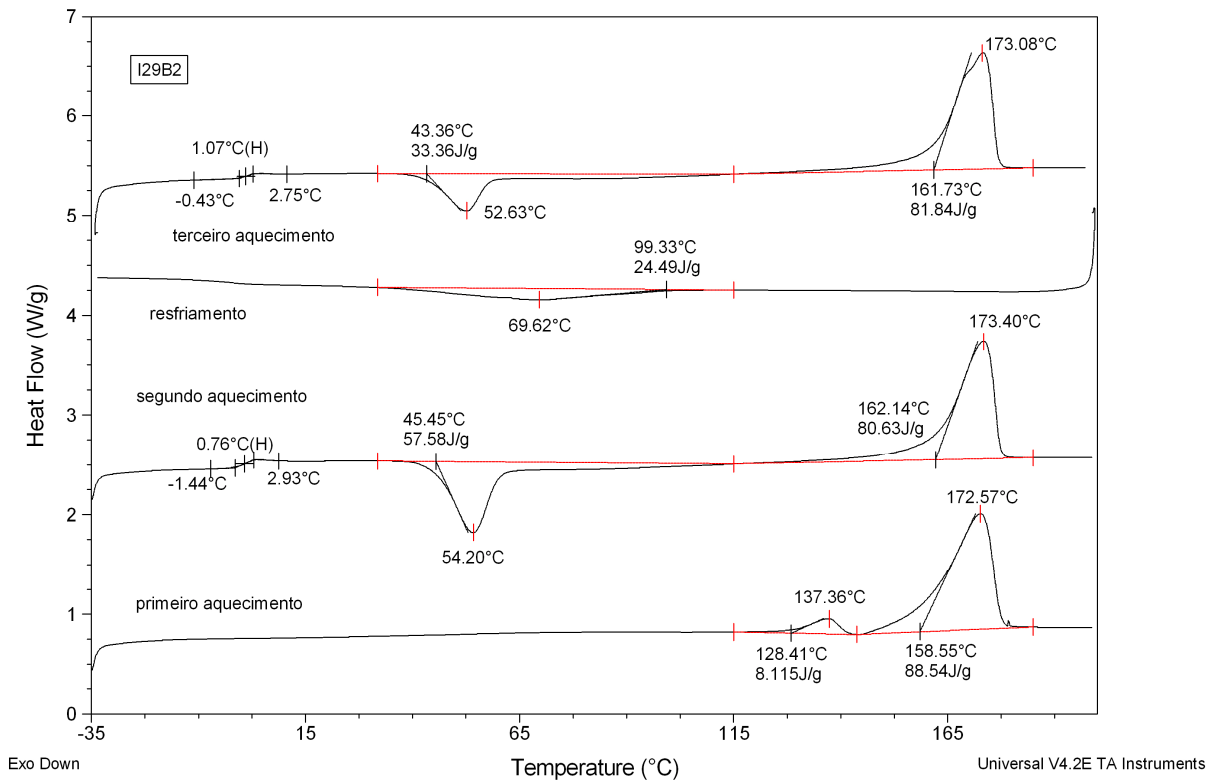
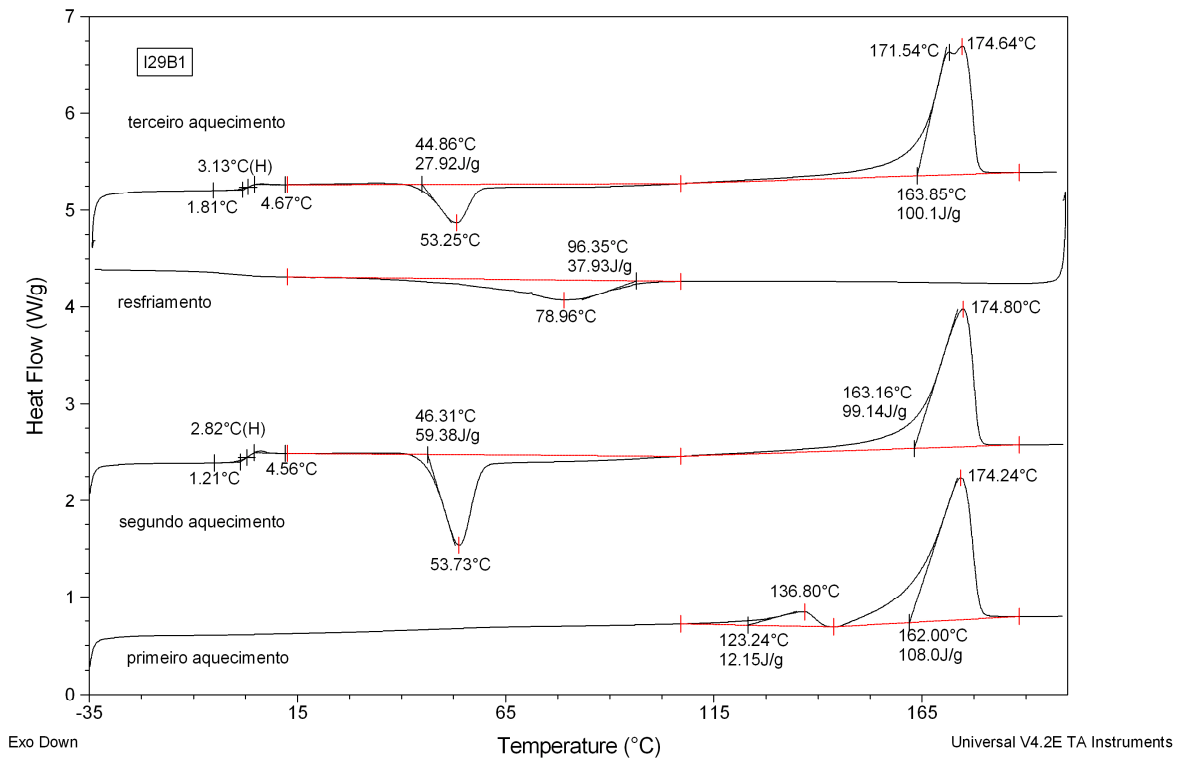


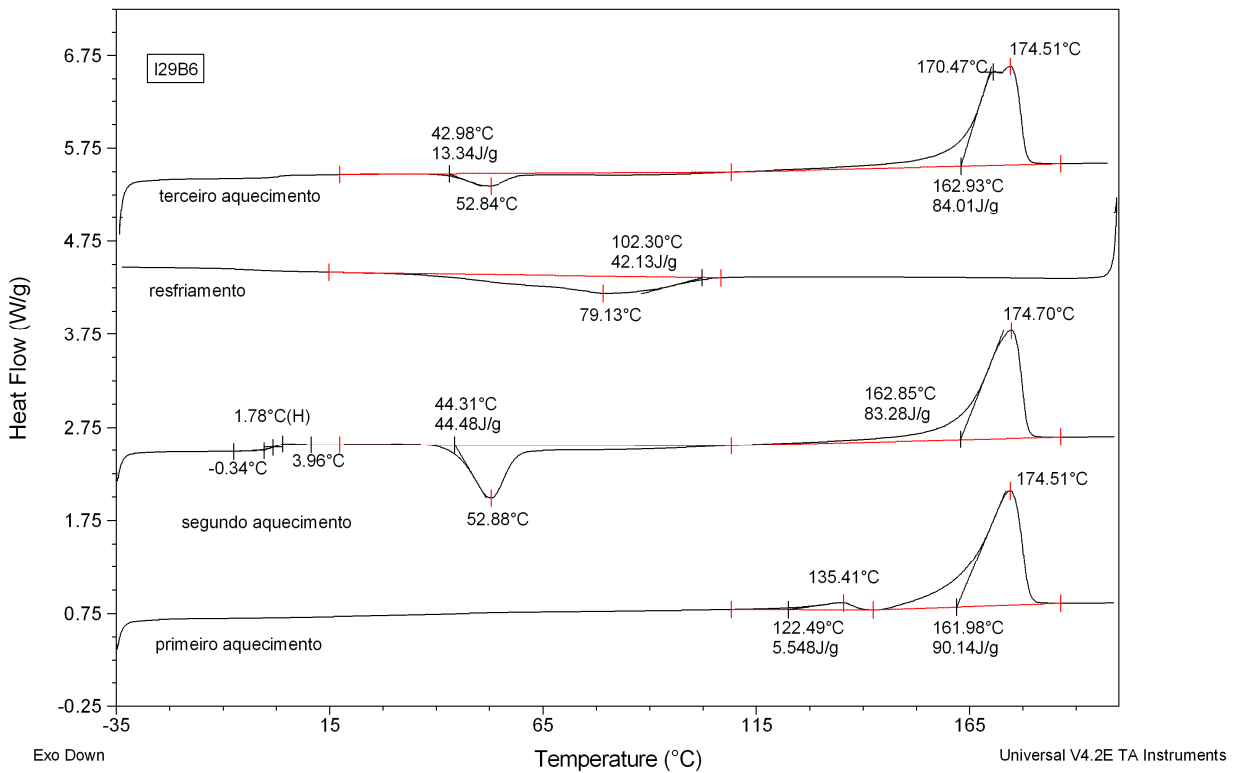
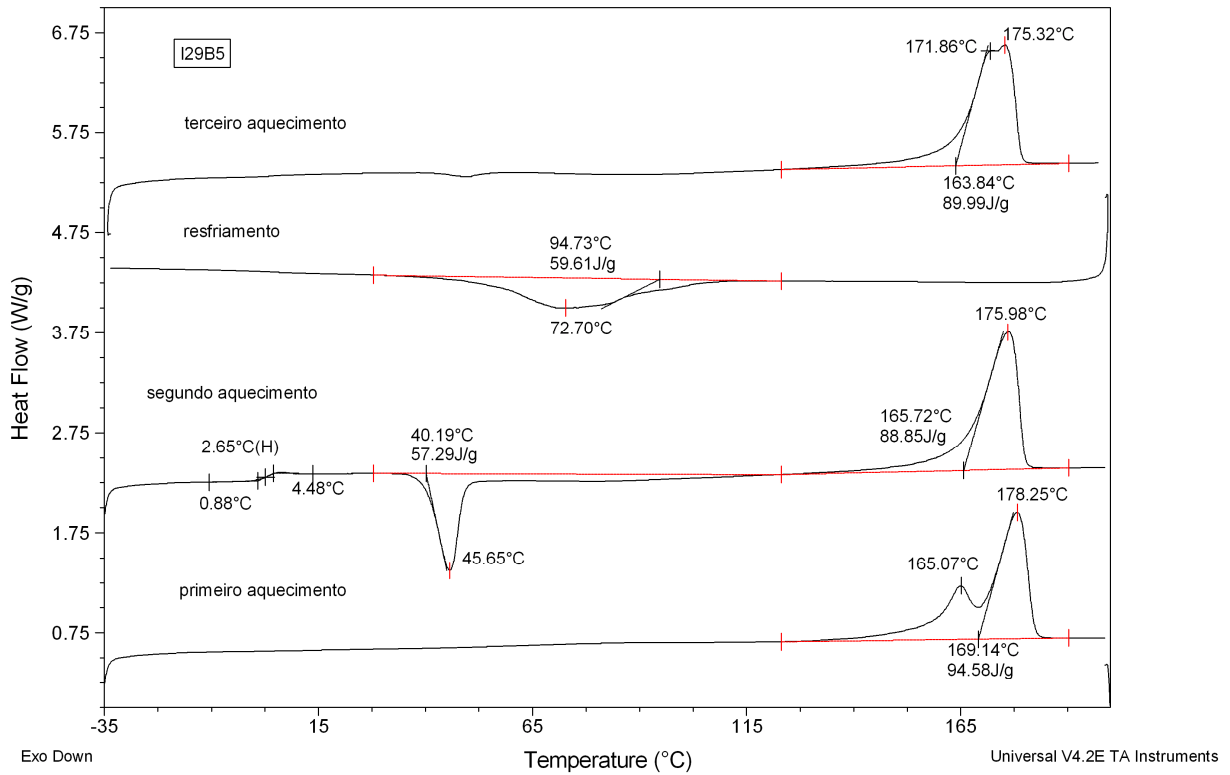


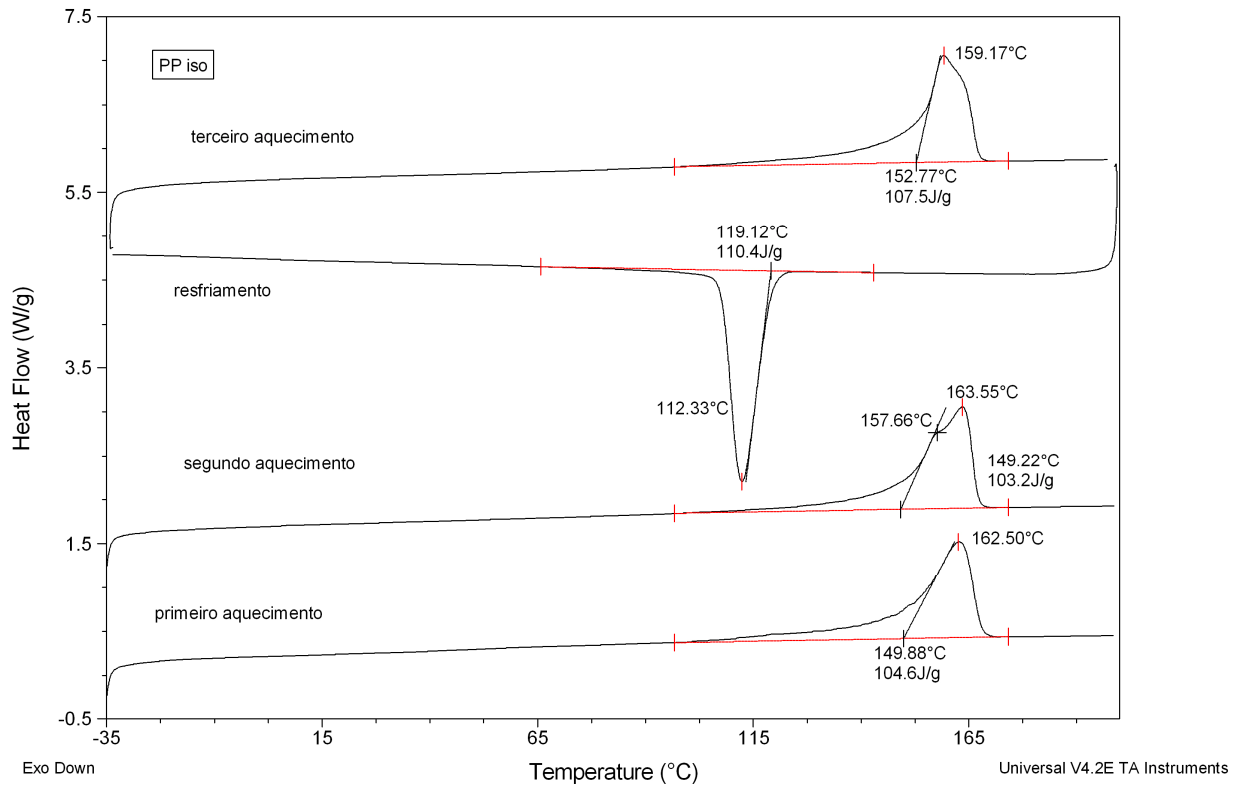
## Calorimetria Diferencial de Varredura (Curvas DSC)











# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)