UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ESTHER RIEKO TAKAMORI

Avaliação de Matrizes Tridimensionais Colagênicas como
Carreadores Celulares para a Bioengenharia Óssea

ESTHER RIEKO TAKAMORI

**Avaliação de Matrizes Tridimensionais Colagênicas como
Carreadores Celulares para a Bioengenharia Óssea**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Co-Orientadora: Dra. Ana Paula Campanelli

**BAURU
2008**

Takamori, Esther Rieko

T139a Avaliação de Matrizes Tridimensionais Colagênicas
como Carreadores Celulares para a Bioengenharia
Óssea / Esther Rieko Takamori. – Bauru, 2008.
176 p.:il.; 30 cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e
científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por
processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB – USP
Protocolo nº: 121/2006
Data: 15/02/2007

FOLHA APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Esther Rieko Takamori

<i>Nascimento</i>	09 de março de 1973 Campinas, S.P.
<i>Filiação</i>	Mario Nobuyuki Takamori e Toshie Otani Takamori
<i>1993-1996</i>	Graduação em Odontologia FOAr – UNESP Araraquara, S.P.
<i>1997</i>	Atualização em Cirurgia EPO – Escola Paulista de Odontologia Campinas, S.P.
<i>2002-2004</i>	Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular Área de concentração: Bioquímica, Nível Mestrado IB - UNICAMP Campinas, S.P. Agência Financiadora: Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
<i>2004-2008</i>	Pós-Graduação em Biologia Oral, Nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP Bauru, S.P. Agência Financiadora, Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
<i>Associações</i>	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IADR – International Association of Dental Research

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Toshie Takamori e Mario Takamori

*Por toda dedicação e apoio. Por acreditarem comigo, torcerem por mim. Obrigada pelo
amparo em todas as horas e pelo amor incondicional. Sem vocês o caminho seria muito
mais difícil.*

Às minhas irmãs Evelyn e Julie

*Amigas e Companheiras para a vida toda, obrigada pelo ombro amigo, constante apoio
e carinho*

À minha irmã Anne e meu cunhado Leonardo

*Obrigada por todo o apoio, amizade e companheirismo, por ouvirem os meus desabafos
e me aconselharem... e por me abrigarem sempre de maneira tão amável em sua casa.
Vocês são um exemplo de família para mim*

A minha sobrinha Helena

*Minha princesinha querida, com o seu olhar terno, sorriso solto e maroto tem tornado os
dias mais alegres e de um colorido mais que especial*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus

Por me dar saúde, uma família maravilhosa e tantos amigos “para a vida inteira”. Pelas tantas oportunidades e privilégios, não há agradecimentos suficientes.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Mais que um orientador, um amigo. Se os nossos caminhos não tivessem se cruzado, provavelmente este trabalho não existiria. Você me “pegou pela mão” e, com muita paciência e carinho, apresentou-me o mundo da ciência e da pesquisa. Admiro toda a sua bondade e generosidade em compartilhar conhecimentos acadêmicos ou “da vida” com os alunos ou qualquer pessoa que esteja a sua volta. Tenha certeza de que você tem papel fundamental nos rumos que a minha vida tomou. Sou lhe eternamente grata.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Uma pessoa muito ESPECIAL. De uma honestidade e integridade admiráveis. Obrigada por toda a atenção e por se preocupar com a nossa formação profissional e pessoal. Aprendi muito com você, admiro toda a sua dedicação e profissionalismo. Você é uma pessoa em que eu me espelho !

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do seu Excelentíssimo diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro,
pelo apoio durante as atividades exercidas durante o curso de Doutorado.

Aos professores, Dra. Marília Buzalaf e Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, técnicos, Thelma e Ovídio e aos “inúmeros” amigos do laboratório de Bioquímica FOB, Tati Furlani, Claudinha, Flavinha, Aline, Flávia Iano, Flávia Levy, Helô, Juliane, Juliano,

Obrigada por toda a convivência, apoio, e por tornar mais alegres cada dia no laboratório. Durante muito tempo a “Bioquímica” foi, literalmente, a minha casa.

Aos amigos do laboratório de Histologia da FOB-USP, especialmente ao Prof. Dr. Rumio Taga e ao Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, a Danielle Ceolim, a Tânia Mary Cestari e ao Bruno,

Por todo o apoio nos trabalhos realizados e pela convivência sempre tão amistosa e incentivadora.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOB-USP, Eduardo, Tati, Thaís, Valéria, Dalva, André,

Obrigada por toda a convivência sempre tão amistosa e gentil, e por toda a boa energia do laboratório

Aos amigos do laboratório do Pof. José Mauro Granjeiro na UFF: Ingrid, Carol, Paty, Tereza, Letícia, Igor, Adriana, Rosana, Fábio Mitri, Monica, Gustavo, Rafael, Aline, Neusa, Luis Felipe, R. Bonato, Cristina

Obrigada por me receberem de maneira tão carinhosa e pela convivência tão agradável.

Aos amigos da turma de doutorado em Biologia Oral: Ariadne, Flávia, Heloísa, Rejane, Tânia, Renato, Anna Elisa, Silvia, Claudia,

Obrigada por toda amizade e convivência.

Ao Prof. Dr. Renato Cruz (in memoriam),

Um ser humano de tanta alegria, tanta sabedoria e ao mesmo tempo tanta simplicidade. Obrigada por toda a ajuda neste trabalho, de maneira tão prestativa e atenciosa. Você faz muita falta.

Ao Prof. Dr. Radovan Borojevic (CCS- UFRJ),

Minha gratidão pela maneira tão gentil e atenciosa com que permitiu que eu executasse parte deste trabalho em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Alex Balduino (INTO),

Por ter viabilizado e possibilitado parte da execução neste trabalho no laboratório do Prof. Dr. Radovan Borojevic. Agradeço imensamente a gentileza de ter disponibilizado as células FOST, utilizadas nesta tese.

À Profa. Dra. Ana Plepis e à Dra. Virgínia Martins,

Por terem cedido tão gentilmente as membranas colagênicas utilizadas neste trabalho

Ao Prof. Dr. Alexandre Rossi (CBPF),

Pela valiosa ajuda na análise de etapas importantes deste trabalho e por toda simplicidade e gentileza com que sempre nos atende

Ao Willian Querido (CCS-UF RJ),

Por toda fundamental ajuda na execução laboratorial neste trabalho, sempre com muita calma e paciência. Sou lhe imensamente grata por toda a pronta colaboração.

À Ingrid Russoni (UFF),

Por toda amizade e preocupação comigo, sempre muito prestativa e atenciosa. Obrigada por toda a ajuda e disponibilidade na fase final desse trabalho.

À Letícia de Castro (UFF),

Obrigada por toda a sua prestatividade, sempre com muita delicadeza, alegria e entusiasmo. Agradeço toda a sua pronta ajuda neste trabalho.

À Profa. Dra. Carolina Spiegel (UFF, FIOCRUZ),

Pela colaboração em etapas importantes deste trabalho, principalmente com a Microscopia Eletrônica de Transmissão, e por todo o seu entusiasmo e alegria sempre tão contagiantes.

À Silvia Albuquerque (CBPF),

Por toda a ajuda na execução deste trabalho, inclusive fazendo “hora extra”. Obrigada por toda a atenção com que você sempre responde às minhas perguntas “básicas”.

À Thaís Helena (FOB-USP),

Obrigada por toda a sua pronta colaboração nos ensaios de imuno, toda a atenção e disponibilidade em estar sempre ajudando.

Ao Técnico Antonio Carlos (histologia – Hospital Antonio Pedro - UFF),

Minha gratidão pela ajuda na execução deste trabalho, sempre com tanto carinho e com imenso bom humor. Admiro muito a sua alegria e leveza de espírito.

À Márcia Sader (COPPE),

Pela valiosa ajuda na parte de Microscopia Eletrônica de Varredura deste trabalho, e a maneira tão alegre e entusiasmada com que “procura as imagens certas”. Obrigada por toda a disponibilidade em estar sempre nos ajudando.

Ao Renato Hassunuma,

Sempre quis ter um irmão e acabei ganhando um em Bauru. Obrigada pela constante preocupação comigo. Por sempre me ligar para saber como estou. Por toda a paciência e atenção.

À Tatiana Salles, Eduardo Figueira, Juliano Pessan e Willian Zambuzzi,

Quantas saudades dos nossos “papos-cabeça”... Obrigada por compartilharem comigo cada esforço, cada alegria. Vocês são muito especiais, o lugar de vocês está eternamente guardado no meu coração.

À Patrícia Chelini, Renata Marques, Ronney Ribeiro e Archimedes,

Sem vocês os dias em Niterói não teriam sido os mesmos, obrigada pelos tantos momentos alegres e de descontração que tornaram os dias muito mais leves.

Ao Prof. Dr. Ariel Lenharo e dona Neide Plaza Lenharo,

*Por confiarem no meu trabalho e me receberem com tanto carinho na **SIN**. Agradeço toda a compreensão e apoio nessa fase de finalização da tese.*

À Laura Rodrigues,

*Por acreditar no meu trabalho e ter se empenhado para que eu fosse para a **SIN**. Tenho aprendido muito com você. Agradeço a compreensão nessa fase final de tese.*

À Vera Rufino Rosa (FOB-USP),

Por toda a simpatia, prestatividade e bom humor com que resolve os nossos problemas burocráticos: matrícula, qualificação, defesa.

Às funcionárias da Pós-graduação (FOB-USP), Giane, Margareth e Letícia,

Por toda atenção, paciência e boa vontade em nos atender.

À Comissão de Pós-Graduação da FOB-USP, através de sua presidente, Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado,

pelo apoio durante as atividades exercidas durante o curso de Doutorado.

À CAPES,

Pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de Doutorado.

A todos que colaboraram na execução desta tese, meu Muito Obrigada!

"A diferença entre a maioria dos homens e eu, reside no fato de que em mim as "paredes divisórias" são transparentes. É uma particularidade minha. Nos outros, elas são muitas vezes tão espessas, que lhes impedem a visão; eles pensam, por isso, que não há nada do outro lado. [...] Quem nada vê não tem segurança, não pode tirar conclusão alguma, ou não confia em suas conclusões."

JUNG

"É necessário ter o caos aqui dentro para gerar uma estrela." [Friedrich Nietzsche]

RESUMO

A terapia de perdas ósseas constitui um dos grandes desafios da área médico-odontológica. Apesar de o enxerto autógeno ainda ser considerado o “gold standart”, apresenta limitações como a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, limitação da quantidade de osso disponível e falta de previsibilidade. A Bioengenharia surgiu como um elemento promissor no tratamento de defeitos ósseos críticos conjugando três elementos principais: as células do paciente, um material carreador e moléculas sinalizadoras. Os materiais carreadores devem ser biocompatíveis, possibilitar a proliferação e diferenciação dos tipos celulares desejados, além de apresentar baixo potencial em desencadear resposta inflamatória. O colágeno tipo I constitui um dos principais produtos da matriz extracelular (MEC) do tecido ósseo sendo, posteriormente, mineralizada. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial carreador de matrizes de colágeno, obtidas de pericárdio bovino submetido a diferentes tempos de hidrólise (24h e 48h). A hipótese foi de que os tempos de hidrólise, a que foram submetidos os materiais, gerando matrizes colagênicas aniônicas, pudessem interferir nos processos de proliferação, diferenciação e mineralização. O potencial em desencadear resposta inflamatória foi avaliado após 24h, 48h e 72h de contato entre as diferentes membranas e macrófagos humanos. As dosagens de mediadores inflamatórios (IL-10, TNF-alfa, TGF-beta e Óxido Nítrico -NO), demonstraram aumento significativo de TGF-beta, em relação ao controle, que desativa macrófagos e estimula proliferação de células e cicatrização. A análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) e ao microscópio de luz (ML) mostrou que as células osteoprogenitoras, provenientes do endóstio de fêmur de camundongo Balb/c (FOST), proliferaram ao longo dos tempos experimentais sobre a superfície das matrizes colagênicas estudadas. Entretanto, não foram observadas células no interior destas ao longo de todos os tempos experimentais estudados. A observação de picos na dosagem da atividade da fosfatase alcalina (membrana nativa, 28 dias para membrana hidrolisada por 24h e por 48h) e dosagem da presença de cálcio nas membranas (28 dias para membrana nativa e 21 dias para as hidrolisadas), assim como a observação por MET de vesículas compatíveis com o processo de mineralização (21 dias), indicam que houve a diferenciação das células osteoprogenitoras ao longo dos tempos experimentais estudados. Verificou-se maior produção de fosfatase alcalina e cálcio

nos materiais hidrolisados em relação à membrana não hidrolisada. A análise por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) mostrou a presença de ligações fosfato em membranas sem células, independente do tempo experimental, indicando que podem ser decorrentes do tratamento químico necessário para sua obtenção e não do processo de mineralização. A avaliação da capacidade biomimética por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) das membranas indicou presença de P e Ca nas membranas avaliadas, mas estes podem não estar associados ao processo de mineralização fisiológica. Concluiu-se que as membranas de pericárdio bovino são biocompatíveis, permitem a proliferação de células osteoprogenitoras em sua superfície. Há indícios de diferenciação celular, mineralização e nucleação de Ca e P. Entretanto, a deficiência na formação de uma porosidade interconectada nas matrizes colagênicas limita a indicação dessas matrizes como carreadores para a bioengenharia óssea.

Palavras-chave: Colágeno. Cicatrização de Feridas. Engenharia Biomédica. *In vitro*. Osso.

ABSTRACT

Evaluation of three-dimensional collagenic matrices as cellular scaffolds to bone bioengineering

The therapy of bone defects constitutes one of the great challenges of the medicine and dentistry. Although autogenous is considered "gold standart", presents limitations as the necessity of second surgical site, limitation of bone availability and lack of previsibility. Tissue bioengineering appeared as a promising treatment for critical bone defects conjugating three main elements: the patient's cells, a scaffold and signaling molecules. The biomaterials used as scaffolds must be biocompatible to possibilite proliferation and differentiation of desired cell types, besides presenting low potential to promote inflammatory response. Collagen type I constitutes one of the main products of the extracellular matrix (ECM) of bone tissue, being later mineralized. The objective of this work was to evaluate the carrier potential of anionic collagen matrices, obtained of bovine pericardium submitted to different hydrolysis times (24h and 48h). The hypothesis was that the hydrolysis times, could influence the processes of proliferation, differentiation and mineralization. The potential activation of inflammatory response was evaluated after 24h, 48h and 72h of contact among the different membranes and human macrophages. The quantification of inflammatory mediators (IL-10, TNF-alpha, TGF-beta and NO^{-2}) demonstrated significant TGF-beta increase in relation to the control, that disactivates macrophages and stimulates proliferation of cells and wound healing. Scanning electron microscope (SEM) and light microscope (LM) showed that osteoprogenitor cells, obtained from the endosteum of femur of Balb/c mouse (FOST), had proliferated on the surface of the studied collagenic matrices. However, at the studied experimental times, cells were not observed in the pores of these matrices. The peaks in the quantification of alkaline phosphatase (native membrane, 28 days for matrices hydrolysed for 24h e48h) and quantification of calcium in the membranes (28 days for native membrane and 21 days for the hydrolysed), and vesicles compatible with the mineralization process by transmission electron microscopy - TEM (21 days) indicated differentiation of the FOST cells at the studied experimental times. It was verified higher amount of alkaline phosphatase and calcium in hydrolysed materials in relation to the not hydrolysed. The analysis of Fourier

transformed infra red (FTIR) showed phosphate peaks in cell-free membranes, independent of the experimental time, indicating that phosphate could be from membrane chemical treatment and not by mineralization process. The evaluation of biomimetic capacity of the membranes by spectroscopy of dispersive energy (EDS) indicated presence of P and Ca in the evaluated membranes, but they can not be associate to biomineralization. It was concluded that the biomembranes are biocompatible and allow FOST proliferation in its surface. There was an indication of cellular differentiation, mineralization and nucleation of Ca and P. However, the deficiency in interconnected porosity in the collagenic matrices limits its indication as scaffolds for tissue bioengineering.

Keywords: Biomedical engineering. Bone. Collagen. *In vitro*. Wound healing

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS	36
2.2 COLÁGENO	38
2.3 UTILIZAÇÃO DE MATRIZES COLAGÊNICAS COMO CARREADORES	39
2.4 COLÁGENO POLIANIÔNICO	39
2.5 AVALIAÇÃO DE MATERIAIS COMO CARREADORES PARA ENGENHARIA DE TECIDOS	41
2.6 POTENCIAL INFLAMATÓRIO	42
2.7 ADESÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	43
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 MATERIAL	51
4.2 MÉTODOS	51
4.2.1 Caracterização morfológica e físico-química das membranas	51
4.2.1.1 Microscopia de Luz.....	51
4.2.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	52
4.2.1.3 Infravermelho por Transformada de Fourier.....	52
4.2.2 Células.....	53
4.2.3 Dosagem de mediadores inflamatórios.....	54
4.2.4 Ensaios de adesão celular.....	55
4.2.4.1 Microscopia de Luz.....	55
4.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	55
4.2.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	56
4.2.5 Ensaios de diferenciação celular	56
4.2.5.1 Atividade da fosfatase alcalina	57
4.2.5.2 Dosagem de cálcio	57
4.2.5.3 Coloração de depósitos de fosfato de cálcio (Von Kossa)	58
4.2.5.4 Identificação de ligações químicas compatíveis com processo de mineralização	58
4.2.6 Potencial Biomimético das membranas.....	58

5 RESULTADOS	61
5.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS MEMBRANAS COLAGÊNICAS .	63
5.1.1 Microscopia de Luz.....	63
5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	67
5.1.3 Infravermelho por transformada de Fourier.....	71
5.2 CAPACIDADE OSTEOGÊNICA DA FOST	75
5.3 DOSAGEM DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	79
5.4 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	89
5.4.1 Microscopia de luz da adesão e proliferação das FOST sobre as membranas.....	89
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	99
5.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	109
5.5 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR	119
5.5.1 Dosagem da atividade da fosfatase alcalina	119
5.5.2 Dosagem de cálcio	123
5.5.3 Coloração dos depósitos de fosfato de cálcio pelo método de coloração de Von Kossa.....	127
5.5.4 FTIR das membranas colagênicas com células.....	131
5.6 CAPACIDADE BIOMIMÉTICA DAS MEMBRANAS COLAGÊNICAS.....	139
6 DISCUSSÃO	147
7 CONCLUSÕES	163
REFERÊNCIAS	167

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nas próximas décadas, o custo social da saúde no Brasil deverá enfrentar um crescimento potencialmente perigoso. A evolução do perfil demográfico e social aponta para o aumento progressivo da idade média das populações humanas, em particular das urbanas. Impõe-se, assim, cada vez mais, a necessidade de garantir a qualidade da vida, compatível com um custo e uma carga social aceitáveis. O número de habitantes de terceira idade triplicará nos próximos 50 anos e o número de pessoas em senectude avançada será multiplicado por seis. O segundo desses dois grupos consome vinte vezes mais custos da assistência médica e duas vezes mais internação hospitalar do que o primeiro. As doenças degenerativas são a causa essencial e crescente dessa carga social, causando a deterioração da qualidade de vida e aumento dos custos da assistência médica. Por outro lado, as populações jovens, vivendo em aglomerações de alta densidade, estão a cada dia mais expostas a lesões traumáticas. Embora numericamente menos significativas, essas lesões têm um altíssimo custo social, gerando pessoas, ainda jovens, debilitadas ou permanentemente incapacitadas para uma vida normal e produtiva.

Em populações urbanas do Brasil, as lesões traumáticas são as primeiras causas tanto da internação hospitalar quanto da morte na segunda e terceira décadas da vida dos jovens. Em 2004, foram gastos no SUS 585 milhões de reais somente com órteses e próteses, sendo 295 milhões referentes à região Sudeste. Somente o procedimento de artroplastia total de quadril cimentada, que tem grande aplicação na população idosa, gerou, no Brasil, um gasto de 17,8 milhões de reais com internações (correspondendo a 5551 internações) dos quais 8 milhões se referem aos gastos com as próteses. Paralelamente, foram gastos mais 4,1 milhões de reais com internações para a realização cirurgias de revisão de quadril (921 internações) no país (DATASUS, 2005). O número mundial de pacientes suscetíveis de receber uma terapia ortopédica associada com bioengenharia foi estimado em 2003 a 11.750.000, com o valor de biomateriais usados em terapias de 3.250.000 U\$ (Medtech Insight Report, 2004). A produção de biomateriais no Brasil é muito limitada e, em muitos casos, inexistente (p.ex., biopolímeros). O mercado interno médico-odontológico é dependente da importação o que limita o emprego destes materiais e aumenta os custos das cirurgias.

Tanto os processos degenerativos quanto as lesões traumáticas exigem terapias que possam preservar, melhorar e/ou restaurar as funções teciduais. Contrastando com a produção de fármacos, antibióticos ou vacinas, que podem ser usados indistintamente por um grande número de pacientes, a medicina regenerativa é individual, dirigida especificamente a cada um dos casos atendidos, no seu contexto particular. Trata-se, portanto, de uma medicina individualizada, cuja ação envolve as seguintes etapas, independentes ou associadas:

- Obtenção e manipulação *ex vivo* de células do próprio paciente, seguidas em muitos casos da sua expansão e diferenciação *in vitro*.
- Re-introdução de células no corpo do paciente, seguida da sua integração em tecidos regenerados e funcionais (terapias celulares).
- Desenvolvimento e produção de estruturas ordenadas (biomateriais), e a sua implantação nas regiões lesadas. Assim, procura-se propiciar *in vivo* a formação de estruturas semelhantes aos elementos de matriz extracelular e de mediadores intercelulares associados, facilitando a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas internas, fomentando o reparo de lesões ou de regeneração e renovação de tecidos degenerados (biomimética, bioengenharia ou engenharia tecidual).

A engenharia de tecidos é um termo originalmente usado para descrever a produção de tecido em cultura por células semeadas sobre matrizes absorvíveis porosas. Recentes estudos têm mostrado que vários tipos de células, como os osteoblastos, podem proliferar e manter o seu fenótipo quando mantidas *in vitro*, primariamente em substratos bidimensionais, matrizes porosas tridimensionais e géis. (WIEDMANN-AL-AHMAD et al., 2005, YEFANG et al., 2007). Isto constitui uma das bases da engenharia de tecidos que envolve a implantação de matrizes porosas isoladas ou associadas a células para auxiliar a regeneração tecidual *in vivo* (SPECTOR, 1999).

Recentemente, no Brasil, algumas empresas vêm trabalhando no desenvolvimento de tecnologia nacional para a produção de biomateriais xenogênicos com vistas a auxiliar o reparo ósseo e a regeneração tecidual guiada. Dentre os materiais em desenvolvimento há membranas derivadas de osso desmineralizado e liofilizado (OLIVEIRA et al., 2004), do tendão (BET et al., 2001) e de pericárdio (ROSA et al., 2003), todos de origem bovina.

O colágeno é um dos biomateriais mais utilizados. A sua excelente biocompatibilidade e segurança, devido às suas características biológicas, tais como biodegradabilidade e baixa antigenicidade, a torna um dos principais materiais utilizados nas aplicações médicas. (LEE; SINGLA; LEE, 2001, WIEDMANN-AL-AHMAD et al., 2005).

Biomateriais a base de colágeno polianiônico acelular foram desenvolvidos a partir de colágeno tipo I presente no pericárdio de origem bovina, submetidos a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln), promovida por condições alcalinas em soluções dimetil sulfóxido, na presença de sais, bases e metais alcalinos. (BET et al., 2001, GOISSIS et al., 2003). O aumento dos grupos carboxílicos foi diretamente relacionado com o tempo de hidrólise. Apesar da estrutura em tripla hélice dos materiais polianiônicos ser preservada em todos os casos, um decréscimo na estabilidade térmica e uma perda gradual das moléculas de colágeno em formar fibrilas foram detectados com o aumento do conteúdo de carboxilas, provavelmente como resultado das mudanças no padrão de interação eletrostática. Os materiais resultantes foram matrizes de colágeno polianiônico associadas com conteúdo de elastina dependente do tempo de hidrólise. (BET et al., 2001).

Os biomateriais desenvolvidos a partir da hidrólise seletiva de colágeno tipo I de pericárdio bovino (BET et al., 2001, BET et al., 2003, GOISSIS et al., 2003), devido às suas características físico-químicas, apresentam-se, potencialmente, como carreadores dentro da Bioengenharia. Dessa maneira, esse potencial deve ser avaliado, inicialmente por meio de estudos *in vitro*.

Para se analisar um biomaterial quanto ao seu potencial carreador dentro da Bioengenharia, deve-se avaliar a sua biocompatibilidade, verificando-se capacidade de adesão e proliferação celular sobre o material e determinando o potencial em desencadear uma resposta inflamatória (produção de proteínas pró-inflamatórias). Além disso, deve-se estudar a função (e manutenção do fenótipo) de osteoblastos semeados sobre o material carreador.

O objetivo deste estudo, portanto, foi determinar o potencial inflamatório e as propriedades osteogênicas de biomateriais obtidos de pericárdio bovino, submetido a 24h e 48h de hidrólise, utilizando células osteoprogenitoras FOST. (BALDUINO et al., 2005). Foram avaliadas a adesão e diferenciação dos pré-osteoblastos sobre as matrizes carreadoras, a produção e liberação de mediadores inflamatórios por

macrófagos humanos em resposta às membranas, bem como a capacidade biomimética das mesmas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Perdas ósseas significativas podem ocorrer em função de acidentes e/ou patologias como cistos ou tumores. Dependendo da extensão, da localização e das características da lesão, o organismo consegue regenerar o tecido ósseo. Entretanto, em defeitos ósseos extensos ou perenes, o organismo consegue apenas reparar o local com um tecido fibroso que não é compatível com a função do tecido ósseo. (MISCH et al., 1996, UEDA et al., 2000).

Vários tratamentos têm sido propostos para auxiliar a regeneração óssea. O enxerto autógeno é o material utilizado normalmente e com melhores resultados, sendo considerado como “gold standard”. Nesse tipo de tratamento, obtém-se tecido ósseo do próprio paciente, tendo como área doadora, freqüentemente, a região da crista ilíaca e, em alguns casos de cirurgias orais, as regiões do túber da maxila, retromolar e mentoniana. Apresenta vantagens como ausência de resposta imune e a possibilidade de se levar células osteoprogenitoras, juntamente com fragmentos ósseos que atuam como condutores das células de reparo para o tecido lesado (MISCH, 1998). Entretanto, existem desvantagens na utilização desse tratamento como a limitação da quantidade e qualidade do tecido a ser removida, a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, o pós-operatório desagradável, a morbidade, o custo da internação e possibilidade da ocorrência de seqüelas. (OREFFO; TRIFFIT, 1999, ZÁRATE-KALFÓPULOS; REYES-SÁNCHEZ, 2006, HIERHOLZER et al., 2006, PEELLE; RAWLINS; FRELINGHUYSEN, 2007).

Como alternativa ao enxerto com osso autógeno, têm-se utilizado os enxertos alógenos, obtidos de doadores da mesma espécie. Não possuem células osteoprogenitoras, mas têm capacidade de osteoindução e osteocondução. Este material possui características próximas às do tecido do paciente a ser tratado, além de maior facilidade de obtenção do que o enxerto autógeno, sem a necessidade de um segundo sítio cirúrgico. Porém, existe a possibilidade de resposta imune e transmissão de doenças como AIDS e hepatite, por exemplo, sendo necessário um controle rigoroso, além de um tratamento adequado desse tipo de enxerto. (ROSENBERG; ROSE, 1998). A utilização de enxertos alógenos exige, ainda, a existência de um banco de ossos, cuja manutenção demanda um grande custo. (WIN et al., 2000).

Diante dos inconvenientes apresentados tanto pelo enxerto autógeno como pelo enxerto alógeno, muitos cientistas pesquisam biomateriais alternativos e estratégias de tratamento que possam auxiliar a regeneração do tecido ósseo. (BURG et al., 2000, HUTMACHER et al., 2000, GOISSIS et al., 2003, SONG et al., 2006, ZAMBUZZI et al. 2006, SICCA et al., 2007). Esses biomateriais podem ser classificados em aloplásticos ou xenogênicos.

A despeito das propriedades adequadas dos materiais aloplásticos e xenogênicos, muitas vezes, as características do defeito, como extensão e localização, dificultam o reparo. A reconstrução óssea ideal depende, principalmente, do número e atividade de células osteoprogenitoras (OREFFO et al., 1999), que é dependente de estímulos, principalmente fatores de crescimento e BMPs. (GRANJEIRO et al., 2005).

As células constituem um fator essencial para a construção e remodelamento de qualquer tecido. Um tratamento baseado na utilização de células do próprio paciente, levadas ao sítio da lesão sobre um biomaterial, começou a se desenvolver: a engenharia de tecidos (LUYTEN et al., 2001).

2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

Dessa maneira, a engenharia de tecidos surgiu como consequência da combinação dos princípios de engenharia, química e biologia, para o desenvolvimento de substitutos naturais que permitisse restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos. (NEREM, 1992, LANGER; VACANTI, 1993). As estratégias da engenharia de tecidos envolvem o uso de células isoladas para substituir funções específicas, substâncias que induzem a proliferação de células e tecidos (fatores de crescimento ou morfogenes), ambos combinados a matrizes que atuam como carreadores. (UEDA et al., 2001, VATS et al., 2003).

Matrizes porosas isoladas ou associadas a células têm sido empregadas na regeneração tecidual *in vivo* (SPECTOR, 1999, HOLLISTER, 2005), o que motivou o desenvolvimento de potenciais carreadores e processos de cultivo celular para otimizar a proliferação de células osteoprogenitoras capazes de se diferenciarem em osteoblastos. Os avanços nas técnicas de biologia celular permitem o cultivo *ex vivo* de uma diversidade de células, dentre elas as osteogênicas (YOSHIKAWA, 2000,

WU et al., 2006) que aderidas a carreadores adequados podem ser implantadas em defeitos extensos, promovendo sua regeneração sem danificar o tecido ósseo normal e saudável.

As técnicas de engenharia de tecidos são baseadas em carreadores tridimensionais porosos com baixo potencial em estimular reações de corpo estranho, além de taxas de biodegradação controladas para permitir que células do hospedeiro se espalhem e proliferem sobre o material, promovendo a reconstrução dos tecidos. Devem ainda apresentar habilidade para interagir *in vitro* com células e com o tecido *in vivo* para induzir regeneração e remodelamento, e também para substituir, reparar, manter ou aumentar a sua função biológica. (BET et al., 2003, BADYLAK et al., 2005).

Pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de biomateriais, que dentro dos princípios da engenharia de tecidos, possam desempenhar o papel de carreadores. Esses biomateriais, além de serem biocompatíveis, osteoindutores e osteocondutores, devem ser capazes de facilitar a revascularização, promovendo assim um ambiente que possa guiar o novo desenvolvimento ósseo. (CORDEN et al., 2000, MA, 2008).

Apesar de materiais sintéticos, tais como poliésteres derivados de alfa-hidroxiácidos e outros polímeros, apresentarem vantagens como flexibilidade na composição e no desenho da sua arquitetura, eles não estão livres de reações adversas indesejáveis, à cinética de biodegradação e à liberação de produtos locais. (GOISSIS et al., 2003).

Outra classe de biomateriais para a reconstrução de tecido ósseo está relacionada com o uso de biomiméticos, que procuram mimetizar características dos tecidos naturais do indivíduo. Englobam polímeros sintéticos e naturais, com ou sem a adição de moléculas de sinalização celular. Entre os polímeros naturais, o colágeno desperta um interesse especial devido a sua alta biocompatibilidade e também às contribuições que ele pode trazer para o entendimento da formação do tecido ósseo e das doenças relacionadas com o rompimento do processo normal de biomineralização que ocorre *in vivo*. (ROCHA et al., 2002, BADYLAK, 2005).

Os carreadores tridimensionais têm função análoga ao da matriz extracelular, agindo como uma estrutura de suporte físico e como um regulador insolúvel da

atividade biológica que afeta processos celulares tais como migração, contração e divisão. O colágeno é o maior constituinte da matriz extracelular (MEC) e, carreadores desenvolvidos a partir de colágeno, têm sido utilizados numa variedade de aplicações devido a determinadas características: propriedades hemostáticas, baixa antigenicidade e propriedades mecânicas adequadas. Trabalhos relatam adesão celular e tecidual, além de proliferação sobre esses carreadores. (LEE; SINGLA; LEE, 2001, OBRIEN et al., 2005, SONG et al., 2006, BADYLAK, 2007).

2.2 COLÁGENO

O colágeno é a proteína estrutural mais abundante na matriz extracelular. Mais de 20 tipos distintos de colágeno foram identificados. O principal colágeno estrutural nos tecidos de mamíferos é o colágeno tipo I. Ele é sintetizado por fibroblastos, os quais se originam de células adventiciais pluripotentes ou células reticulares.

A molécula de colágeno consiste de 3 cadeias polipeptídicas entrelaçadas, formando uma estrutura chamada tripla-hélice. Cada cadeia polipeptídica possui aproximadamente 1038 resíduos de aminoácidos. Esta seqüência adota uma estrutura orientada à esquerda com 3 aminoácidos por volta. A estrutura da tripla hélice é permitida devido a uma seqüência de aminoácidos repetitiva chamada (Gly-X-X)_n onde Gly é glicina, X frequentemente prolina e Y hidroxiprolina (Hyp). Para a molécula de colágeno do tipo I, duas cadeias são idênticas, denominadas alfa-1, a terceira é homóloga, mas quimicamente distinta, denominada alfa-2. (SIVAKUMAR; RAO, 2002).

Essa proteína tem sido bem caracterizada, sendo encontrada amplamente, no reino vegetal e animal. (VANDERREST; GARRONE, 1991). O colágeno tem mantido uma seqüência de aminoácidos altamente conservada no curso da evolução. Por essa razão, o colágeno tipo I, de origens alogênica e xenogênica, tem sido reconhecido como carreador aplicável para o reparo tecidual, com baixo potencial antigênico. O colágeno tipo I bovino talvez seja o carreador biológico mais utilizado para carreador biológico para aplicações terapêuticas devido a sua origem abundante e ao seu histórico de sucesso. (BADIYLAK, 2007).

2.3 UTILIZAÇÃO DE MATRIZES COLAGÊNICAS COMO CARREADORES

O colágeno é largamente usado como matéria-prima para a manufatura de biomateriais. Na maioria dos casos, modificações químicas são realizadas para o tratamento de tecidos ou materiais reconstituídos de gel de colágeno com reagentes de *cross-linkings* para aumentar a biocompatibilidade e propriedades mecânicas. Outras mudanças químicas incluem esterificação, acilação, desaminação do grupo amino da lisina e bloqueando grupo guanidina dos resíduos de arginina. Os materiais resultantes são matrizes de colágeno carregadas usadas como suporte para o crescimento celular, géis de colágeno para a substituição do humor vítreo e para “*drug delivery*”. (BET et al., 2001).

A obtenção de novos biomateriais a partir de outros já conhecidos constitui-se numa alternativa rápida e de baixo custo. Dentre esses, o colágeno tipo I permite que sua estrutura seja modificada, utilizando-se técnicas relativamente simples. Por meio de um tratamento alcalino, um colágeno aniônico com propriedades pizoelétricas aumentadas pode ser obtido por meio de hidrólise dos grupos carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina. Esse processo, aplicado ao colágeno de pericárdio bovino, promove a obtenção de uma estrutura semelhante a uma esponja, com poros de tamanho heterogêneo e completa remoção das células intersticiais. (ROCHA et al., 2002, NORIS-SUÁREZ et al., 2007).

2.4 COLÁGENO POLIANIÔNICO

Biomateriais a base de colágeno polianiônico acelular foram então desenvolvidos a partir de colágeno tipo I presente no pericárdio de origem bovina, submetidos a hidrólise seletiva e controlada de resíduos de carboxiamidas da asparagina e glutamina, promovida por condições alcalinas em soluções dimetil sulfóxido, na presença de sais, bases e metais alcalinos. O aumento dos grupos carboxílicos foi diretamente relacionado com o tempo de hidrólise. Apesar da estrutura em tripla hélice dos materiais polianiônico ser preservada em todos os casos, um decréscimo na estabilidade termal e uma perda gradual das moléculas de colágeno em formar fibrilas foram detectados com o aumento do conteúdo de carboxilas, provavelmente como resultado das mudanças no padrão de interação eletrostática. Os materiais resultantes foram basicamente matrizes de colágeno

polianiónico associadas com conteúdo de elastina dependente do tempo de hidrólise. (BET et al., 2001).

Os materiais submetidos a hidrólise por 24h mostraram boa preservação da estrutura colagênica. A habilidade do colágeno polianiónico em formar fibrilas é inibida progressivamente com o aumento do conteúdo de grupos carboxílicos, com completa inibição observada após 72h de hidrólise. (BET et al., 2001).

Um método de preparo do colágeno aniônico em pH fisiológico, com pequenas alterações das estruturas químicas, é a hidrólise seletiva dos grupamentos carboxiamidas de resíduos dos aminoácidos asparagina e glutamina, presentes na cadeia alfa do tropocolágeno. Como resultado, enquanto na molécula de colágeno nativo, as cargas positivas e negativas estão distribuídas em 250 nm, após a hidrólise das carboxiamidas, um aumento da densidade de cargas negativas é estabelecida na região central da molécula. (LACERDA et al., 1998).

Membranas de colágeno aniônico, obtidas a partir de pericárdio bovino, já foram caracterizadas em termos morfológicos (ML, MEV), quanto à estabilidade térmica e quanto às suas características físico-químicas por análise em FTIR. (BET et al., 2001).

Os espectros de infravermelho (IR) das membranas colagênicas em pH 3,5 foram caracterizados por bandas em 1658 e 1552 cm^{-1} , correspondendo a deformação axial da $>\text{C}=\text{O}$ (amida I) e a deformação angular da ligação $>\text{N}-\text{H}$ (típica de proteínas), respectivamente. As bandas em 1235/1450 cm^{-1} o intervalo entre 1 e 1,1 indicaram que a estrutura secundária da tripla hélice foi preservada em todas as membranas analisadas, pois o colágeno desnaturado está perto de 0,6. A banda de absorção a 1235 cm^{-1} representa N-H (ligação amida), a qual está relacionada com a tripla hélice da estrutura colagênica. A absorção a 1450 cm^{-1} é devida as vibrações do anel pirrolidínico da prolina e hidroxiprolina e não foram afetadas por mudanças na estrutura secundária da proteína. (BET et al., 2001).

Bet et al. (2003) avaliaram a citotoxicidade e adesão de membranas colagênicas aniônicas preparadas a partir de pericárdio bovino. Células K562 foram tratadas com extratos obtidos de colágeno aniônico e nativo para avaliação da citotoxicidade. Para o ensaio de adesão celular, as K562 foram plaquedas diretamente sobre o material colagênico e determinou-se a adesão por meio do

ensaio de MTT. Não foram detectados sinais de citotoxicidade em nenhum dos materiais avaliados, mas foi observada adesão maior no material aniônico, atribuída a alterações na estrutura colagênica que possibilitaram um maior reconhecimento de integrinas pelas células após a hidrólise dos grupamentos carboxiamida.

Este material aniônico foi mineralizado *in vivo* em um processo similar ao fisiológico, sugerindo não somente seu comportamento biomimético como a possibilidade de carreador para a reconstrução de tecidos ósseos. (GOISSIS *et al.*, 2003).

Moreira *et al.* (2004) avaliaram o potencial osteogênico de membranas colagênicas de pericárdio bovino, submetidas a 24h e 48h de hidrólise. Foram plaqueadas células osteoprogenitoras fetais humanas hFOB 1,19 sobre as membranas colagênicas aniônicas e verificou-se que as membranas colagênicas hidrolisadas por 48h apresentaram os melhores e mais promissores resultados em relação ao processo de mineralização *in vitro*, produção de fosfatase alcalina (ALP) e possível diferenciação de osteoblastos.

Góes *et al.* (2007) estudaram o recobrimento de superfícies de implante de titânio com filmes de colágeno aniônico, proveniente de submucosa intestinal bovina, e verificaram por meio de técnicas de caracterização físico-química, Difração de Raio-X (DRX) e Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), uma quantidade de apatita maior neste do que no colágeno nativo. Esses resultados sugerem que o maior conteúdo de grupos carboxílicos, presentes no colágeno aniônico poderiam desempenhar um papel de nucleador de apatita nos fluidos corpóreos.

2.5 AVALIAÇÃO DE MATERIAIS COMO CARREADORES PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

Antes da utilização *in vivo* e clínica desses biomateriais eles precisam ser avaliados por meio de ensaios *in vitro* utilizando, por exemplo, as normas da *International Organization for Standardization* (ISO 10993-5).

A avaliação inicial de biocompatibilidade *in vitro* e determinação de potencial inflamatório de um biomaterial pode ser realizada por meio da interação de

macrófagos com material avaliado, verificando-se a produção de proteínas pró-inflamatórias. (DING; SUN; ZHANG; 2007).

2.6 POTENCIAL INFLAMATÓRIO

Pesquisas têm mostrado que há uma importante interação entre biomateriais e o sistema imune. O reconhecimento dos biomateriais como antígenos estimula a reações de defesa do organismo, tais como inflamação, expressão de anticorpos, ativação do sistema complemento e liberação de citocinas. (BASTA et al., 2004, HOFFMAN et al., 2005).

Macrófagos secretam uma série de mediadores inflamatórios após a sua ativação. Um macrófago se torna ativado em resposta aos produtos microbianos, complexos imunes, mediadores químicos e certas proteínas de matiz celular e citocinas produzidas por linfócitos T. Os macrófagos ativados são capazes de secretar um largo número de citocinas, tais como IL-1; IL-6; IL-10; IL-12; IL-18. TNF-alfa, TGF-beta, IL-18 e MP-10. Os macrófagos aderidos a biomateriais tornam-se ativados com o intuito de fagocitar o biomaterial presente. A secreção subsequente de citocinas direciona as repostas inflamatória e cicatricial desencadeadas pelo biomaterial. (ANDERSON et al., 2007).

Os macrófagos ativados inibem a replicação de patógenos pela liberação de uma variedade de moléculas efetoras, dentre elas, a NO, que regula a função, proliferação e morte de muitas células dos sistema imune e anti-inflamatório, dentre elas macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras e antígenos, mastócitos, neutrófilos e células natural *Killer*. (TRIPATHI et al., 2007).

Shukla et al. (2005) avaliaram a produção de espécies reativas ao óxido nítrico (NO), por macrófagos RAW 264.7 (ATCC) em contato com nanopartículas de ouro, por meio da determinação da determinação de nitrito, método indireto para se quantificar NO, e verificaram uma redução dose e tempo dependente dessa molécula. Esse resultado indicou que as nanopartículas de ouro, exerceram, direta ou indiretamente, efeitos antioxidantes nos macrófagos.

Ding, Sun e Zhang (2007) propuseram avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de biomateriais por meio da determinação da resposta imune ao mesmo. Macrófagos intra-peritoneais de ratos foram estimulados com PTE, PLGA, NPG e beta-TCP.

Verificou-se que os macrófagos estimulados com PTFE produziram mais TNF-alfa e IL-1 que os não estimulados e os outros materiais induziram resposta moderada.

Desde que a biocompatibilidade é reduzida quando biomateriais induzem altas quantidades de citocina, a sua indução pode ser usada para avaliar a intensidade da reação imune em reação a um biomaterial. (DING; SUN; ZHANG, 2007).

O osso é uma estrutura dinâmica que está em constante remodelamento, onde a reabsorção e a deposição óssea estão balanceadas. Quando uma inflamação crônica ocorre no osso, esse balanço é interrompido em favor da perda óssea. (KIRKWOOD et al., 2003). Citocinas inflamatórias, tais como IL-1 α e IL-1 β , fator de necrose tumoral (TNF- α) (VERVOORDELDONK et al., 2002) e IL-17 (YANO et al., 2001) têm demonstrado afetar o metabolismo ósseo.

2.7 ADESÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Os estudos de adesão celular podem utilizar osteoblastos provenientes de cultura primária ou linhagens celulares, de diferentes origens (osso longo, calvária, periósteo, medula óssea) e de diferentes espécies (humana, rato, camundongo). (DECLERCQ et al., 2005).

A adesão (*attachment*) inicial das células aos materiais é necessária para a subsequente proliferação e expressão do seu fenótipo. (DALBY et al., 2002, WIEDMANN-AL-AHMAD et al., 2005). A adesão das células dependentes de ancoragem à superfície de materiais é um pré-requisito para os eventos de transcrição e tradução. No tecido ósseo, o tipo celular predominante que interage com as superfícies sintéticas é o osteoblasto. A interação destas células com as superfícies dos materiais tem efeitos profundos sobre muitos processos biológicos, incluindo adesão, migração, proliferação, e diferenciação fenotípica. (MEYER et al., 1998, DATTA et al., 2005).

Linez-Bataillon et al. (2002) verificaram que as diferenças nas características de superfície de um material levavam a diferenças nas taxas de proliferação, na morfologia e na adesão de osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 sobre a superfície dos mesmos. Nos materiais que apresentavam superfície mais lisa, observou-se

menor adesão dos pré-osteoblastos e uma maior taxa de proliferação. Sader et al. (2005) avaliaram superfícies de titânio com diferentes rugosidades e observaram que as células osteoprogenitoras FOST apresentaram maior taxa de proliferação e diferenciação nas superfícies mais lisas.

Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica, constituída principalmente de colágeno tipo I, que posteriormente é mineralizada. Assim, nos estágios iniciais da formação óssea, tem-se um aumento da expressão de colágeno tipo I e de fosfatase alcalina. Na fase de mineralização, observa-se uma maior quantidade de fosfato e cálcio, decorrente desse processo. O aumento na concentração desses íons inorgânicos pode ser determinado pelos métodos de Von Kossa e Alizarina. Além disso, pode-se quantificar, por meios colorimétricos, os níveis de cálcio ao longo do processo de mineralização. (DECLERCQ et al., 2004, YEFANG et al.).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar comparativamente a biocompatibilidade e o potencial carreador de matrizes de pericárdio bovino nativo e hidrolisadas por 24h ou 48h, utilizando células osteoprogenitoras.

Proposições específicas:

- 1) Determinar o potencial inflamatório dos diferentes carreadores, avaliando a produção e liberação de proteínas pró-inflamatórias;
- 2) Avaliar comparativamente adesão das células osteoprogenitoras sobre as matrizes de colágenos nativas (sem hidrólise) e obtidas com 24h e 48h de hidrólise;
- 3) Avaliar comparativamente a diferenciação das células osteoprogenitoras sobre os diferentes materiais carreadores;
- 4) Avaliar a capacidade biomimética das membranas de pericárdio bovino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As matrizes utilizadas como carreadoras foram obtidas a partir de pericárdio bovino e submetidas a tratamento alcalino para obtenção de matrizes colagênicas aniônicas (BET et al., 2001; GOISSIS et al., 2003). Este material foi doado pela Dra Ana Plepis (IQSC-USP).

Foram avaliados os materiais hidrolisados por 24h (H24) e 48h (H48). Estes foram comparados ao colágeno não hidrolisado, isto é, nativo (N).

As membranas de pericárdio bovino nativo, hidrolisadas por 24h e 48h foram cortadas de modo a obter discos com 1cm² de diâmetro, o que possibilitou a sua acomodação nos poços de placas de cultura de células de 24 poços. Os discos obtidos foram esterilizados por óxido de etileno (ACECIL, Campinas – S.P.).

Os discos esterilizados foram colocados em meio de cultura específicos para osteoblasto ou macrófago, dependendo do experimento realizado, o qual foi trocado três vezes antes do plaqueamento das células sobre as membranas.

Os grupos controle foram representados pelo plástico (sem material) e pelo colágeno nativo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização morfológica e físico-química das membranas

4.2.1.1 Microscopia de Luz

As membranas de colágeno avaliadas (N, H24 e H48) foram fixadas com formol 10% tamponado, desidratadas em solução crescente de álcool, diafanizadas e incluídas em parafina. Foram então obtidos cortes de 5 µm em micrótomo e esses foram submetidos à coloração H/E.

4.2.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram fixadas em Solução de Karnovsky modificada e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2, por 1 hora a temperatura ambiente, em capela. As amostras foram lavadas com água destilada e submetidas a banhos, em soluções crescentes de álcool (30, 50, 70, 90 e 100%), permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma e passadas 3 vezes na solução a 100%. As amostras foram desidratadas utilizando-se o aparelho de ponto crítico da marca Balzers CPD 050 (Depto de Microbiologia - CCS –UFRJ), metalizadas com ouro e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss® do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada (COPPE – UFRJ)

4.2.1.3 Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros de emissão ou absorção surgem a partir de transições de estados quânticos das moléculas correspondentes à diferenças na energia interna das mesmas (ΔE). Os valores de energia emitida ou absorvida pelas moléculas durante estas transições podem ser acompanhados por valores de frequência ou números de onda seguindo a relação $\Delta E = h \cdot \nu$.

A radiação infravermelha não é capaz de produzir transições eletrônicas, ela possui a mesma ordem de grandeza que a energia de vibração ou rotação das moléculas. Uma molécula como cloreto de hidrogênio, HCl, possui uma variação na distribuição de carga ao seu redor, uma vez que o átomo de cloro possui uma densidade eletrônica maior que o Hidrogênio, assim a molécula possui um momento dipolar, quando a molécula vibra ocorre uma variação regular do momento dipolar. Este fenômeno gera um campo elétrico que pode interagir com o campo elétrico associado à radiação infravermelha incidente, se a frequência for a mesma, teremos uma variação na amplitude da vibração e conseqüentemente uma absorção da radiação, o espectro de infravermelho registra essa absorção ao longo de uma determinada faixa de frequência ou números de onda (tabela) (SKOOG,2002).

Uma molécula que possui N átomos possui 3N modos de vibração que incluem movimentos rotacionais e translacionais da molécula inteira, para moléculas com elevada simetria pode-se correlacionar totalmente o espectro de infravermelho,

fazendo-se uma analogia a um modelo físico de vibração constituído por N esferas ligadas por uma mola, mas para a maioria das substâncias N é muito elevado para uma análise baseada em graus de liberdade da molécula, mesmo assim pode-se obter informações de alguns modos vibracionais característicos de movimentos localizados de grupos pequenos de átomos pertencentes à molécula (BILLMEYER, 1978).

Neste trabalho utilizou-se o espectrofotômetro do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), marca Shimadzu, modelo IR-Prestige 21 que possui acoplado um microscópio que possibilita a obtenção de espectros na interface mate

4.2.2 Células

Osteoblastos

Células pré-osteoblásticas provenientes do fêmur de camundongo Balb/c - FOST (Balduino et al., 2005) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Radovan Rorojevic (UFRJ – RJ). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% SFB, 100 u/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (GIBCO) a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 2-3 dias e as células confluentes foram subcultivadas por meio de tripsinização.

Após a confluência, as células foram cultivadas com DMEM, suplementado com 10% SFB, 100 u/mL de penicilina e 100 estreptomicina (GIBCO), 50µg/mL ácido ascórbico e 10 mM de β-glicerofosfato.

Macrófagos

Foram coletados 20 mL de sangue periférico de indivíduos humanos sadios em seringa heparinizada e diluídos em 20 mL de RPMI 1640. 20 mL do sangue

diluído foram aplicados em 10 mL de Ficoll 1077 e centrifugados a 1500 rpm/30 minutos a 24°C. Após a centrifugação, a interface contendo as células mononucleares do sangue periférico foi coletada e depositada em tubo gelado. As células foram lavadas 2 vezes com RPMI (1200 rpm/10 minutos/4°C) e ressuspendidas em 1 mL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB);

Foram, então, plaqueadas 1×10^6 células mononucleares (monócitos e linfócitos) sobre cada membrana, em cada poço de placa de cultura de 24 poços. Após 24 horas, as células não aderentes foram removidas e o meio de cultura de cada poço foi trocado por 2 mL de RPMI + 10% SFB novo.

4.2.3 Dosagem de mediadores inflamatórios

Após a obtenção da cultura primária, remoção de células não aderentes e colocação de RPMI + 10% SFB, as células aderentes (macrófagos) proliferaram por 72h, o meio de cultura de cada poço foi removido e foi acrescentado 0,5 mL de PBS EDTA 0,01% estéril para que as células se soltassem.

Elas foram lavadas duas vezes com RPMI (1200 rpm/10 minutos/4°C) e ressuspendidas em 1 mL de RPMI contendo 10% SFB. A concentração foi ajustada para 3×10^5 macrófagos por mL de RPMI 10% SFB e 1 mL foi colocado sobre cada membrana (N, 24H e 48H) pré-hidratada com 0,1 mL de RPMI. Os sobrenadantes foram coletados após 24, 48 e 72 horas e congelados a -80°C até o momento das análises. Os sobrenadantes foram avaliados para citocinas específicas: TNF- α , IL-10, TGF- β e NO⁻² humanos.

- **Dosagem de NO⁻²**

A determinação do conteúdo de Nitrito (NO⁻²) foi utilizada como método indireto de avaliação da produção de NO. As amostras foram colocadas em placa de cultura de 96 poços. A curva padrão foi feita por meio da colocação de NaNO₂ a 200 μ M (50 μ L por poço), em diluição seriada em água bi-destilada. Sobre cada amostra foram colocados 50 μ L do reagente de Griess, as placas foram mantidas ao abrigo de luz e foram lidas após 20 minutos a 450 nm no leitor de ELISA.

- **Dosagem de IL-10 , TNF-alfa e TGF-beta**

A placa de alta ligação foi sensibilizada com o anticorpo primário (de captura) diluído em tampão carbonato-bicarbonato*, vedada e incubada *overnight* (aproximadamente 18 horas) em geladeira. A placa foi lavada com PBS Tween 20, foi realizado o bloqueio com PBS Molico® a 5% e aguardado o tempo de incubação de 1 hora a temperatura ambiente, após isso ela foi lavada novamente com PBS Tween 20. As amostras foram colocadas em duplicata em cada poço 50 µL /poço e as citocinas recombinantes, diluídas em PBS 10% SFB para a curva padrão (1: 500 dos anticorpos e 1: 250 de avidina peroxidase). Colocou-se, então avidina peroxidase diluída em PBS 10% SFB (50 µL/poço) e incubar por 1 h. As placas foram novamente lavadas com PBS Tween 20. Os substratos (50 µL) foram colocados em cada poço e aguardou-se um período de incubação de 30 min. A reação então foi parada com ácido sulfúrico 5 N (100 µL/poço) e lida em leitor de ELISA a 450 nm.

4.2.4 Ensaio de Adesão Celular

Foram plaqueadas 5×10^4 células osteoprogenitoras FOST por disco de material, devidamente colocado em cada poço da placa de 24 poços. Os tempos experimentais avaliados foram: 7, 14, 21 e 28 dias

4.2.4.1 Microscopia de Luz

Decorridos os tempos experimentais, as células e membranas, correspondentes a cada condição foram lavadas com tampão fosfato e fixadas em formol 10% tamponado, pH 7,2 por 2h. Após a fixação, foram lavadas com água corrente, desidratadas em solução crescente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm em micrótomo e procedeu-se à coloração das lâminas com H/E.

4.2.4.2 Microscopia Eletrônica Varredura

Decorridos os tempos experimentais, as células e membranas, correspondentes a cada condição, foram fixadas em Solução de Karnovsky

modificada e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2, por 1 hora a temperatura ambiente, na capela. As amostras foram lavadas com água destilada e submetidas a banhos, em soluções crescentes de álcool (30, 50, 70, 90 e 100%), permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma e passadas 3 vezes na solução a 100%. As amostras foram desidratadas utilizando-se o aparelho de secagem ao ponto crítico marca BALZERS CPD 050 (Depto de Microbiologia - CCS –UFRJ), metalizadas com ouro e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss® do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada (COPPE – UFRJ)

4.2.4.3 Microscopia Eletrônica Transmissão

Decorridos os tempos experimentais, as células e membranas, correspondentes a cada condição, foram fixadas em Solução de Karnovsky modificada e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2, por 1 hora a temperatura ambiente, na capela. As amostras foram lavadas com água destilada e fixadas com acetato de uranila 0,5% durante uma noite. Foram, então, desidratadas em acetona (30, 50, 70, 90%, 10 min em cada solução e 3 X 10 min em 100%) e infiltradas com mistura de acetona/Spurr por 3-4h, e depois com resina pura durante a noite. Elas foram colocadas em formas de silicone cheias de resina pura e polimerizadas em estufa a 70° C durante 48h. As amostras foram submetidas ao corte de excesso de resina e tecido (Leica EM Trimer) e posteriormente foram obtidos cortes ultrafinos e micrótomo, usando-se navalhas de vidro. Os cortes obtidos (50 a 100 nm) foram capturados em telinhas (100-200 mesh com película e 300-400 mesh sem película) e contrastadas com solução aquosa de uranila a 3% por 10-15 min. Os cortes obtidos foram analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (dados do equipamento, instituição, etc...)

4.2.5 Ensaio de diferenciação celular

Foram plaqueadas 5×10^4 células osteoprogenitoras FOST por disco de material, devidamente colocado em cada poço da placa de 24 poços. Os tempos

experimentais avaliados foram: 7, 14, 21 e 28 dias em presença xxxx descrever o meio.

4.2.5.1 Atividade da fosfatase alcalina

No final de cada tempo experimental as células do grupo controle foram lavadas com solução tampão, liberadas enzimaticamente dos poços com tripsina 0,25% e centrifugadas a 2000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets, armazenados a -70°C . As membranas N, H24, H48 foram lavadas com solução tampão e armazenadas a -70°C .

Decorridos os tempos experimentais, todas as amostras foram analisadas.

Foram então descongeladas, lavadas 2 vezes com TBS pH 8 e lisadas com 1 mL/poço de Triton X-100 1% em TBS gelado durante 5 minutos, em vórtex. Após isso foram centrifugados em 2000 rpm por 5 minutos e foi dosado o sobrenadante.

Os sobrenadantes das amostras foram colocadas em placas de 96 poços nos volumes de 5, 10 e 15 μL , em triplicada. Após isso, foram colocados imediatamente 200 μL de 1% de PNPP (Sigma) em TBS 1 mM MgCl_2 por poço. As leituras da reação foram feitas a 405 nm, em leitor de ELISA, após 2, 5, 10 e 15 minutos do início da reação.

4.2.5.2 Dosagem de Cálcio

O conteúdo de cálcio na cultura foi determinado bioquimicamente, de acordo com a técnica descrita por ARPORNMAEKLONG *et al.* (2004).

As células serão semeadas (4×10^3 cel/ cm^2) em placas com 24 poços e cultivadas nos períodos de 7, 14 e 21 dias. No fim de cada período, o meio foi removido e os poços foram lavados 3 x com 0,05 M Tris, pH 7,5 e incubada em 500 μL de 0,5 M HCl por 18h. Em seguida foram centrifugados (13000g/5 min) e a quantificação do conteúdo de cálcio do sobrenadante mensurado utilizando um kit colorimétrico para dosagem de cálcio (Calcio Liquiform - Labtest, 570 nm).

4.2.5.3. Coloração de depósitos de fosfato de cálcio (Von Kossa)

Os depósitos de fosfato de cálcio foram detectados pela técnica de Von Kossa em que estes são corados em preto, segundo a técnica seguida por DECLERCQ *et al.*, (2004).

No fim de cada período, o meio foi removido e os poços foram lavados 3 x com PBS-A a 4°C e fixadas com formaldeído 4 % tamponado com 10 mM de fosfato (pH 6,9, 4°C, 10 min). Em seguida, foram lavadas com água destilada (4°C) e cobertas com 5% solução de nitrato de prata por 30 minutos em câmara escura. A cultura foi lavada com água destilada e recoberta durante 2 min com uma solução de sódio-carbonato-formoldeído (5g Na₂CO₃ em 75 mL de água deionizada com a adição de 25 mL de formaldeído 36%). A cultura foi lavada com água destilada por 10 min e incubada durante 20 minutos com uma solução corante (10% Ferrocianeto de Potássio Tri-hidratado e 10% Tiosulfato de Sódio, 1:10). Após lavar com água destilada e desidratar em uma série graduada de álcool, foi montada com Balsamo do Canadá.

4.2.5.4 Identificação de ligações químicas compatíveis com processo de mineralização

As membranas avaliadas (N, H24 e H48), plaqueadas com osteoblastos FOST, após os tempos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias, foram fixadas em solução de formol 10% tamponado pH 7,2, desidratadas, diafanizadas, incluídas em parafina e processadas para ML. Foram feitos cortes de 5 µm, estes foram colocados em lâminas de vidro, mas não foram submetidos à coloração e nem cobertos com lamínula. As lâminas obtidas foram submetidas à análise por FTIR .

4.2.6 Potencial Biomimético das membranas

Para simular o plasma humano, um fluido fisiológico (SFB), seguindo as especificações apresentadas por Kokubo na preparação de um fluido simulador, foi preparado para utilizar o chamado método biomimético para simular as condições de

mineralização biológica. O SFB foi preparado pela dissolução de reagentes grau químico de cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, cloreto de cálcio e sulfato de sódio em água destilada. Foi tamponado no pH 7,25 com tampão Tris-HCl. O fluido foi mantido a 36,5 C e completamente livre de células ou substâncias orgânicas usando azida sódica para inibir o crescimento de microorganismos.

As membranas secas colagênicas (N, H24 e H48) foram colocadas nessa solução simuladora e permaneceram nela por 48h. Após esse período, elas foram lavadas cuidadosamente em água destilada e liofilizadas. Essas membranas então foram analisadas por FTIR para verificação de ligações compatíveis com processo de mineralização. Além disso, foram analisadas por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) para verificar a presença de elementos indicativos do processo de mineralização (NORIS et al., 2007)

Análise estatística

Os dados apresentados foram representativos de experimentos realizados em triplicata e repetidos duas vezes. Os dados (média $\pm$ desvio padrão) foram analisados segundo Análise de Variância (ANOVA), utilizando o software Instat[®], com $p < 0,05$ (Teste de Tukey).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS MEMBRANAS COLAGÊNICAS

5.1.1 Microscopia de Luz

Observou-se a morfologia das fibras colagênicas em função dos diferentes tratamentos de obtenção (Figura 1). Não foi observada a presença de células nas matrizes colagênicas analisadas. As membranas de colágeno nativo apresentaram fibras mais compactadas e sem a presença de porosidades (Figura 1A) As membranas de colágeno hidrolisado por 24h e 48h apresentaram espaçamento entre as fibras colágenas, gerando uma estrutura porosa. As camadas externas das membranas hidrolisadas mostraram-se mais densas (Figura 1E, Figura 1H, Figura 1I).

Figura 1 - Fotomicrografia das membranas de colágeno N, H24 e H48. Membranas N (A-aumento de 10X; B-aumento de 20X C- aumento de 40X), Hidrolisada por 24h (D-aumento de 10X; E-aumento de 20X; F - aumento de 40X) e hidrolisada por 48h (G-aumento de 10X; H-aumento de 20X; I- aumento de 40X) processadas para ML e submetidas à coloração com H/E.

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise das membranas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiu verificar as diferenças nas características superficiais das mesmas, em função dos diferentes tratamentos de obtenção a que foram submetidas (Figura 2). O colágeno nativo apresentou suas fibras mais compactas, assim como porosidade praticamente inexistente numa vista transversal (Figuras 2A-C). Os materiais hidrolisados por 24h e 48h apresentaram superfície lisa e regular em sua maior parte, sendo possível observar alguns poros (Figura 2D e Figura. 2G). Numa vista lateral, pôde-se observar a porosidade das membranas, diretamente proporcional ao tempo de hidrólise do material avaliado, ou seja, o material hidrolisado por 48h (Figura 3H) mostrou porosidade maior que aquele hidrolisado por 24h (Figura 2E). Verificou-se um adensamento de fibras em ambos os tempos de hidrólise nos cortes transversais. As camadas externas das membranas hidrolisadas ainda se demonstraram mais espessas que as fibras observadas no interior delas.

Figura 2 - Fotoeletromicrografias das membranas obtidas a partir de colágeno nativo (A-C), hidrolisado por 24h (D-F) e hidrolisado por 48h (G-I).

5.1.3 Infravermelho por transformada de Fourier

O espectro de absorção na região do infravermelho das membranas colagênicas (Figura 3) mostrou bandas referentes ao colágeno entre 1200 e 2000 cm^{-1} .

As análises das membranas permitiram observar a presença de bandas correspondentes às ligações C=O (amida I), observadas em 1687 cm^{-1} . para o colágeno nativo e 1682 cm^{-1} . para o colágeno aniônico; às ligações N-H (amida II), observadas em 1572 cm^{-1} . para o colágeno nativo e 1562 cm^{-1} . para o aniônico e anel pirrolidínico em 1458 cm^{-1} . (SENA, 2004)

Figura 3 - Espectro de infravermelho obtido por refletância difusa das membranas colagênicas A(nativa); B (H24) e C (H48).

5.2 CAPACIDADE OSTEOGÊNICA DA FOST

A capacidade osteogênica das células osteoprogenitoras FOST está relatado na literatura (BALDUINO et al., 2005; SADDER et al., 2005).

Paralelamente aos ensaios para avaliação das membranas avaliadas neste estudo, foram plaqueadas 5×10^4 células sobre poliestireno e lamínulas de boro silicato. Pôde-se observar o seu aspecto cuboidal das FOST aderidas a superfície de poliestireno (placa de cultura) (Figura 4) e a sua morfologia, característica de osteoblastos, quando plaqueada sobre lamínula de boro silicato e observada por MEV (Figura 4B). No tempo experimental de sete dias, as FOST apresentaram-se espreiadas sobre as lamínulas. No tempo de 21 dias, pôde-se observar a presença de vesículas compatíveis com aquelas presentes no processo de mineralização da matriz óssea. Ao se fazer a avaliação por EDS, nos tempos experimentais de 7 e 21 dias, não foram detectadas presenças significativas de Ca e P no primeiro tempo analisado, mas em 21 dias, pode-se verificar picos significativos desses elementos, indicando um processo de mineralização.

Figura 4 - Imagem capturada das FOST plaqueadas em placas de cultura de células de poliestireno(A). Fotoeletromicrofia das FOST plaqueadas em lamínulas de boro silicato após 7 (B) e 21 dias (C). EDS das FOST plaqueadas sobre lamínulas de boro silicato após 7 (D) e 21 (E) dias.

5.3 DOSAGEM DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

- NO⁻²

As membranas colagênicas N, H24 e H48 apresentaram produção de NO₂ menor que o grupo controle, estatisticamente significativa ($P < 0,001$), após 24h de contato entre macrófago e membranas. Após 48h de contato, observou-se aumento na produção de NO₂, com diferença estatisticamente significativa do grupo controle em relação a N ($p < 0,05$), H24 ($p < 0,01$), H48 ($p < 0,05$) (Figuras 5, 6, 7, 8).

- TNF-alfa

No tempo de 24h, verificou-se produção maior de TNF-alfa dos macrófagos em contato com o material nativo ($N > H48 > H24$), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre as membranas colagênicas e entre estas e o grupo controle. Em 48h, a produção de TNF-alfa foi maior no material nativo ($N > H24 > H48$), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em 72h houve uma maior produção de TNF-alfa no grupo H24 ($H24 > H48 > \text{nativo}$), houve diferença estatisticamente diferente entre H24 e o grupo controle ($p < 0,05$). (Figuras 5, 6, 7, 8).

- IL-10

No tempo de 24h, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, nos tempos avaliados (Figuras 5, 6, 7, 8).

- TGF-beta

No tempo de 24h observou-se produção de $N > H24 > H48$, houve diferença estatisticamente significativa entre controle e N ($P < 0,01$) e controle e H24 ($P < 0,01$). No tempo experimental de 48h, observou-se $N > H24 > 48$, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre as membranas e o grupo controle. No tempo de 72h, observa-se aumento na produção de TGF-beta no grupo H24 em relação ao tempo anterior e $H24 > N > H48$. Houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e H24 ($p < 0,01$) e entre o controle e H48 ($p < 0,01$) (Figuras 5, 6, 7, 8).

Figura 5 - Avaliação da produção de NO_2^- por macrófagos humanos cultivados sobre poliestireno (controle) e membranas colagênicas (nativo, H24 e H48). As colunas correspondem à média da produção de NO_2^- no sobrenadante da cultura de macrófagos cultivadas por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) na ausência (controle) ou presença das membranas colagênicas. As barras representam $\pm$ SEM dos valores obtidos.

Figura 6 - Avaliação da produção de TNF- α por macrófagos humanos cultivados sobre poliestireno (controle) e membranas colagênicas (nativo, H24 e H48). A concentração de TNF- α presente no sobrenadante das culturas de macrófagos foi mensurada por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). As colunas correspondem à média da produção de TNF- α no sobrenadante da cultura de macrófagos cultivadas por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) na ausência (controle) ou presença das membranas colagênicas. As barras representam $\pm$ SEM dos valores obtidos.

Figura 7 - Avaliação da produção de IL-10 por macrófagos humanos cultivados sobre poliestireno (controle) e membranas colagênicas (nativo, H24 e H48). A concentração de IL-10 presente no sobrenadante das culturas de macrófagos foi mensurada por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). As colunas correspondem à média da produção de IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos cultivadas por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) na ausência (controle) ou presença das membranas colagênicas. As barras representam $\pm$ SEM dos valores obtidos.

Figura 8 - Avaliação da produção de TGF-beta por macrófagos humanos cultivados sobre poliestireno (controle) e membranas colagênicas (nativo, H24 e H48). A concentração de TGF-beta presente no sobrenadante das culturas de macrófagos foi mensurada por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). As colunas correspondem à média da produção de TGF-beta no sobrenadante da cultura de macrófagos cultivadas por 24h (A), 48h (B) e 72h (C) na ausência (controle) ou presença das membranas colagênicas. As barras representam $\pm$ SEM dos valores obtidos.

5.4 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

5.4.1 Microscopia de Luz da adesão e proliferação das FOST sobre as membranas

Verificou-se a adesão das FOST às membranas colagênicas (N, H24 e H48) em todos os tempos avaliados. Nota-se que as células estão localizadas na superfície das membranas, àquela em foram plaqueadas (Figuras 9, 10, 11 e 12). No decorrer dos tempos experimentais observa-se aumento na densidade celular nas membranas, mas, mesmo após 28 dias, não foi observada a presença de células no interior das matrizes de colágeno N, H24 e H48 (Figura12). Exceto no tempo experimental de 14 dias (Figura 10I), em que algumas células estão na superfície da membrana, mas parecem começar a penetrar na mesma.

Na Figura 11F observa-se fragmento de fibra colagênica (estrela sobre ele) por entre células e matriz extracelular formada por estas.

Em algumas fotomicrografias não se observa a camada de células justaposta à membrana. Isso se deve, provavelmente, a artefato de técnica quando da confecção das lâminas histológicas.

Figura 9 - Fotomicrografia das FOST sobre as membranas colagênicas (Nativo, H24 e H48) no tempo experimental de 7 dias. Membranas N (A-aumento de 10X; B-aumento de 20X C- aumento de 40X), Hidrolisada por 24h (D-aumento de 10X; E-aumento de 20X; F - aumento de 40X) e hidrolisada por 48h (G-aumento de 10X; H-aumento de 20X; I- aumento de 40X) processadas para ML e submetidas à coloração com H/E. As setas apontam para a camda de células sobre a superfície do material.

Figura 10 - Fotomicrografia das FOST sobre as membranas colagênicas (Nativo, H24 e H48) no tempo experimental de 14 dias. Membranas N (A-aumento de 10X; B-aumento de 20X C- aumento de 40X), Hidrolisada por 24h (D-aumento de 10X; E-aumento de 20X; F - aumento de 40X) e hidrolisada por 48h (G-aumento de 10X; H-aumento de 20X; I- aumento de 40X) processadas para ML e submetidas à coloração com H/E. As setas apontam para a camda de células sobre a superfície do material.

Figura 11 - Fotomicrografia das FOST sobre as membranas colagênicas (Nativo, H24 e H48) no tempo experimental de 21 dias. Membranas N (A-aumento de 10X; B-aumento de 20X; C- aumento de 40X), Hidrolisada por 24h (D-aumento de 10X; E-aumento de 20X; F - aumento de 40X) e hidrolisada por 48h (G-aumento de 10X; H-aumento de 20X; I- aumento de 40X) processadas para ML e submetidas à coloração com H/E. As setas apontam para a camada de células sobre a superfície do material. A estrela indica a presença de fibra de colágeno por entre células e matriz extracelular.

Figura 12 - Fotomicrografia das FOST sobre as membranas colagênicas (Nativo, H24 e H48) no tempo experimental de 28 dias. Membranas N (A-aumento de 10X; B-aumento de 20X C- aumento de 40X), Hidrolisada por 24h (D-aumento de 10X; E-aumento de 20X; F - aumento de 40X) e hidrolisada por 48h (G-aumento de 10X; H-aumento de 20X; I- aumento de 40X) processadas para ML e submetidas à coloração com H/E. As setas apontam para a camada de células sobre a superfície do material.

5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As FOST mostraram-se aderidas às superfícies das matrizes colagênicas Nativo, H24 e H48. Pode-se observar aumento na densidade celular ao longo dos tempos experimentais avaliados. No tempo experimental de 7 dias, observam-se células espalhadas sobre as membranas avaliadas (Figura 13), sendo possível observá-las ainda por entre as células. No tempo experimental de 14 dias (Figura 14) observa-se aumento na densidade celular, não sendo mais possível visualizar a superfície de nenhuma das membranas. Nos tempos experimentais de 21 (Figura 15), as FOST cobriam toda a superfície das membranas e mostravam-se alinhadas no colágeno nativo e H48.

Em 28 dias (Figura 16), verificou-se a presença de grânulos, compatíveis com processo de mineralização.

Figura 13 - Fotoeletromicrografia das FOST plaqueadas sobre as membranas nativo (A-C), hidrolisadas por 24h (D-F), hidrolisadas por 48h (G-I), após o tempo experimental de 7 dias.

Figura 14 - Fotoeletromicrografia das FOST plaqueadas sobre as membranas nativo (A, B, C), hidrolisadas por 24h (D, E, F), hidrolisadas por 48h (G, H, I), após o tempo experimental de 14 dias.

Figura 15 - Fotoeletromicrografia das FOST plaqueadas sobre as membranas nativo (A, B, C), hidrolisadas por 24h (D, E, F), hidrolisadas por 48h (G, H, I), após o tempo experimental de 21 dias. As setas indicam grânulos compatíveis com o processo de mineralização.

Figura 16 - Fotoeletromicrografia das FOST plaqueadas sobre as membranas nativo (A, B, C), hidrolisadas por 24h (D, E, F), hidrolisadas por 48h (G, H, I), após o tempo experimental de 28 dias. As setas indicam grânulos compatíveis com o processo de mineralização.

5.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foi observada a interação das FOST com as diferentes membranas colagênicas (Figuras 17, 18, 19 e 20). Observaram-se células com aspecto compatível com padrão de normalidade. No tempo experimental de 28 dias, observou-se grande número de retículo endoplasmático nas células, indicando intensa atividade de síntese das células.

Observou-se, ainda, a presença de vesículas secretadas pelas células, sugestivas de processo de mineralização (Figura 18A, Figura 19C).

As FOST parecem estar emitindo pseudópodes em volta de fibras de colágeno de modo a englobá-las, realizado endocitose das mesmas (Figura 19B).

Verificou-se ainda a interação das células com as membranas colagênicas (Figuras 18C, 19A, 19B). A mitose das FOST sobre as membranas é indicativa da biocompatibilidade destas (Figura 20).

Figura 17 - Fotoeletromicrografia das FOST em contato com o colágeno nativo (A), hidrolisado por 24h (B) e hidrolisado por 48h (C) no tempo experimental de 28 dias. N= Núcleo; Re=Retículo Endoplasmático, Mi=Mitocôndria; Bm=Biomembrana; C=Colágeno.

Figura 18 - Fotoeletromicrografia das FOST em contato com a membrana hidrolisado por 24h (B) no tempo experimental de 21 dias e das membranas de colágeno nativo (A), e hidrolisado por 48h (C) no tempo experimental de 28 dias. N= Núcleo; Re=Retículo Endoplasmático, Mi=Mitocôndria; * = membrana. As setas indicam vesículas compatíveis com processo de mineralização.

Figura 19 - Interação de célula FOST com matriz H48, após tempo experimental de 28 dias (A e B) e célula FOST sobre membrana de colágeno nativo após 21 dias (C). Bm = biomembrana. A seta indica a secreção de vesículas sobre material nativo.

Figura 20 - Fotoletromicrografia de células FOST em mitose sobre a membrana hidrolisada por 48h, no tempo experimental de 28 dias. N = Núcleo; Bm=biomembrana.

5.5 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

5.5.1 Dosagem da atividade da Fosfatase Alcalina

O perfil da atividade da fosfatase alcalina é apresentado na Figura 21. O grupo controle apresentou o seu pico de atividade em 7 dias. O grupo N demonstrou o pico de atividade em 28 dias, mas não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre a atividade observada em todos os tempos experimentais analisados.

Os grupos H24 e H48 apresentaram pico de atividade da Falc em 28 dias. Em 28 dias o pico de atividade de H24 foi cerca de 15X maior que o encontrado no mesmo período no grupo nativo, 6X maior do que o grupo controle no tempo de 7 dias (pico de atividade) e 1,5X maior que H48 em 28 dias. A membrana H48 ainda apresentou atividade cerca de 11X maior que N e 4X maior que o controle. No grupo controle a atividade foi 2,7X maior que no N em 28 dias.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle o N em nenhum dos tempos experimentais estudados.

Foi observada diferença estatisticamente significativa na dosagem de fosfatase alcalina entre os grupos controle e H24 nos tempos experimentais de 14 dias ($p < 0,05$), 21 dias ($p < 0,001$) e 28 dias ($p < 0,001$).

A dosagem de fosfatase alcalina também apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e H48 nos tempos experimentais de 14 dias ($p < 0,001$), 21 dias ($p < 0,05$) e 28 dias ($p < 0,001$).

Figura 21 - Dosagem da fosfatase alcalina nos grupos controle, N, H24 e H48 nos tempos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. a= 7 dias, b = 14 dias, c = 21 dias e d = 28 dias.

5.5.2 Dosagem de Cálcio

Os resultados relativos à dosagem de cálcio são apresentados na Figura 22, tendo os grupos controle e N seu valor máximo aos 28 dias.

H24 apresentou o pico na dosagem de cálcio em 14 dias, mas não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de 14 e 21 dias. H48 apresentaram pico de Ca em 28 dias.

Aos 21 dias o pico de cálcio da H24 foi cerca de 2X maior que o encontrado no mesmo período no grupo controle e 1,6 X maior que o apresentado pelo grupo nativo no seu pico em 28 dias.

H48, cujo pico foi observado em 21 dias, ainda apresentou dosagem de cálcio cerca de 1,7X aquela observada para o grupo nativo em 28 dias e 2,16X maior que o grupo controle no tempo experimental de 28 dias.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e N em nenhum dos tempos experimentais estudados.

Foi observada diferença estatisticamente significativa na dosagem de cálcio entre os grupos controle e H24 nos tempos experimentais de 14 dias ($p < 0,001$), 21 dias ($p < 0,01$). A dosagem de cálcio também apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e H48 nos tempos experimentais de 7 dias ($p < 0,01$), 14 dias ($p < 0,001$) e 21 dias ($p < 0,001$).

Figura 22 - Conteúdo de Ca dosado no grupo controle, Nativo, H24 e H48 nos tempos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. a= 7 dias, b = 14 dias, c = 21 dias e d = 28 dias.

5.5.3 Coloração dos depósitos de fosfato de cálcio pelo método de coloração de Von Kossa

Os depósitos de fosfato de cálcio foram corados em preto pela coloração de Von Kossa e estavam localizados na superfície das membranas (Figura 23), o que indicou a presença de nódulos de mineralização nessa região. O padrão de marcação foi homogêneo na superfície do material. No entanto, observam-se marcações em toda a membrana o que é indício de coloração inespecífica (Figura 23).

Figura 23 - Fotomicrografia das FOST após 21 dias de cultivo sobre colágeno nativo (A) hidrolisado por 24h (B) e 48h (C).

5.5.4 FTIR das membranas colagênicas com células

O espectro de infravermelho das membranas de colágeno nativo mostra bandas em torno de 1037 cm^{-1} indicando a presença da ligação PO_4^{-3} no tempo experimental de 7 dias (Figura 24A). Nos tempos experimentais de 21 e 28 dias (Figuras 24C e 24D) também foram identificadas bandas compatíveis com ligação fosfato, Nota-se que a banda presente em 7 dias é mais definida do que as observadas em 21 e 28 dias.

O espectro de infravermelho das membranas de colágeno H24 mostra bandas correspondentes à vibração $\text{C}=\text{O}$ a $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ em nos tempos experimentais de 14, 21 e 28 dias (Figuras 25 B-D). As vibrações P-O de grupamentos fosfato foram observadas no espectro de bandas entre $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (Figuras 20A-D). Notou-se que as bandas estavam mais definidas nos tempos experimentais de 14 e 28 dias (Figuras 25A e D, respectivamente). A deformação entre $1500\text{ e }1550\text{ cm}^{-1}$ corresponde a ligação amida II, podendo estar em 1562 (SENA, 2004). A ligação amida II foi observada nos tempos experimentais de 14, 21 e 28 dias. As vibrações P-O de grupamentos fosfato foram observadas no espectro de bandas entre $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ nos tempos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias.

O espectro de infravermelho das membranas de colágeno H48 mostra bandas correspondentes à vibração $\text{C}=\text{O}$ a $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ nos tempos experimentais de 14, 21 e 28 dias (Figuras 26 B-D). As vibrações P-O de grupamentos fosfato foram observadas no espectro de bandas entre $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ em todos os tempos experimentais avaliados (Figuras 21A-D). Notou-se que essas bandas estão bem definidas nos tempos experimentais de 14, 21 e 28 dias (Figuras 21 B, C D, respectivamente). A deformação entre $1500\text{ e }1550\text{ cm}^{-1}$ corresponde à ligação amida II, podendo estar em 1562 cm^{-1} (SENA, 2004) A ligação amida II foi observada nos tempos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias. As vibrações P-O de grupamentos fosfato foram observadas no espectro de bandas entre $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ nos tempos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias.

Figura 24 - Espectro de infravermelho obtido por refletância difusa de membranas de colágeno nativo plaqueadas com FOST após 7(A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) dias.

Figura 25 - Espectro de infravermelho obtido por refletância difusa de membranas de colágeno H24 plaqueadas com FOST após 7 (A), 14 (B), 21(C) e 28 (D)dias.

Figura 26 - Espectro de infravermelho obtido por refletância difusa de membranas de colágeno H48 plaqueadas com FOST após 7 (A), 14 (B), 21(C) e 28 (D) dias.

5.6 CAPACIDADE BIOMIMÉTICA DAS MEMBRANAS COLAGÊNICAS

As análises por EDS permitiram verificar que as membranas de colágeno nativo secas apresentaram um pequeno pico de cálcio (Figura 27B). Aquelas que foram submetidas à imersão em DMEM (Figura 27 D) apresentaram picos de Ca e P, o de Ca maior que o da nativa seca. As membranas imersas em solução de Kokubo (Figura 22F) não apresentaram pico de P, mas mostraram um pico muito pequeno de Ca.

Já as membranas H24 apresentaram pela análise ao EDS pico de P quando seca (Figura 28B) e um pequeno pico de Ca quando submetida a imersão em DMEM (Figura 28D). A membrana submetida a solução de Kokubo (Figura 28F) apresentou pequenos picos de P e Ca, o de Ca maior que o verificado na membrana submetida a DMEM e o de P menor que o observado na membrana seca.

Nas membranas H48, a análise ao EDS permitiu verificar a presença de picos de P e Ca na membrana seca (Figura 29A). Esses foram maiores que aqueles verificados nas membranas imersas em DMEM (Figura 29D) e do que naquelas imersas em solução de Kokubo (Figura 29F), sendo pouco maiores nas últimas do que naquelas que passaram pelo meio de cultura.

Figura 27 - MEV e EDS das membranas N secas (A-B), submetidas a DMEM (C-D) e a solução de Kokubo (E-F).

Figura 28 - MEV e EDS das membranas colagênicas H24 secas (A-B), submetidas a DMEM (C-D) e a solução de Kokubo (E-F).

Figura 29 - MEV e EDS das membranas colagênicas H48 secas (A-B), submetidas a DMEM (C-D) e a solução de Kokubo (E-F).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa são áreas de pesquisa em desenvolvimento cujos objetivos são obter células do próprio paciente, expandi-las e diferenciá-las *in vitro* sobre materiais carreadores para posterior reimplantação no mesmo indivíduo. Os biomateriais, portanto, desempenham um papel fundamental como carreadores por prover uma matriz tridimensional para a regeneração tecidual. (BADYLAK, 2007).

Recentes avanços na engenharia de tecidos têm demonstrado o seu potencial para o tratamento de defeitos ósseos críticos, uma vez que envolve a utilização de células autógenas numa matriz tridimensional biocompatível dentro da qual a morfogênese de um novo tecido pode ser induzida. (VATS et al., 2003).

Cada tecido e órgão possuem sua própria organização tridimensional da MEC. Células num carreador biológico tridimensional para engenharia de tecidos alinham os componentes da nova matriz extracelular de acordo com o carreador (“bioscaffold”) existente. Além disso, carreadores com um desenho estrutural tridimensional específico, semelhante à MEC de um tecido particular, podem representar um grande potencial para a engenharia de tecidos.

A interação célula-carreador é de fundamental importância para o sucesso do tratamento. Essa primeira etapa se dá *in vitro* após a coleta das células do paciente e plaqueamento destas sobre o carreador celular. Após a proliferação e diferenciação nos tempos determinados, as células e o carreador são transplantadas no paciente. Na fase *in vitro*, portanto, deve-se avaliar criteriosamente a biocompatibilidade do material carreador, verificando sua citotoxicidade e seu potencial em desencadear resposta inflamatória. Além disso, as células devem aderir à superfície do material a fim de se proliferar e diferenciar.

Um carreador ideal para a engenharia de tecidos deveria mimetizar a matriz extracelular e interagir com as células possibilitando adesão, proliferação, migração e diferenciação celular. Apesar de uma variedade de polímeros sintéticos e biodegradáveis terem sido desenvolvidos para atuarem como carreadores na engenharia de tecidos, eles apresentam limitações quanto ao reconhecimento biológico. (MA, 2008).

Como principal componente da matriz extracelular, o colágeno pode ser usado, portanto, para produzir matrizes com propriedades biomiméticas provendo um ambiente semelhante àquele de origem para as células aderirem. (ROSSO et al., 2004, CANCEDA et al., 2003).

Embora o colágeno seja reconhecidamente um dos principais componentes da matriz extracelular dos tecidos e do alto grau de homologia existente entre os colágenos humanos de origem animal e vegetal (VANDERREST; GARRONE, 1991), a sua utilização como biomaterial implica em processamento químico. (BET et al., 2001; GOISIS et al., 2003). Neste caso, resíduos do processamento químico e alterações na estrutura original do tecido podem levar a efeitos citotóxicos, inflamatórios e/ou interações indesejadas entre célula e biomaterial carreador. (TAKAMORI et al., 2007).

As matrizes colagênicas aniônicas avaliadas são formadas por colágeno tipo I, obtido a partir de pericárdio bovino. O tecido animal é submetido à limpeza mecânica e a tratamento com álcalis. (BET et al., 2001). O tratamento químico a que é submetido um biomaterial de origem natural é passível de gerar resíduos que podem levar a resposta citotóxica ao material, ou a uma resposta inflamatória exacerbada ou, ainda, a uma alteração na interação com as células osteoprogenitoras. Essas reações podem comprometer a cicatrização tecidual quando da implantação do conjunto “biomaterial + células”, assim como o potencial osteogênico.

As membranas colagênicas N, e aniônicas (H24 e H48), também obtidas por meio de tratamento alcalino (BET et al., 2001; GOISSIS et al., 2003), foram submetidas a ensaios de citotoxicidade, não tendo sido observados efeitos citotóxicos. (BET et al., 2003). Os ensaios para verificação da resposta inflamatória *in vitro*, desencadeada por biomateriais, também são importantes para determinar a sua biocompatibilidade.

Essas avaliações de citotoxicidade e de resposta inflamatória inicial são de fundamental importância na engenharia de tecidos, uma vez que a fase I desse tipo de tratamento corresponde a uma etapa *in vitro*. Trata-se, portanto, de um sistema fechado, o que faz com que as respostas a agentes tóxicos possam ter um efeito mais agressivo para as células do sistema. Dessa maneira, foi avaliado o potencial das membranas colagênicas (N, H24 e H48) em induzir resposta inflamatória. A

resposta inflamatória desencadeada por qualquer biomaterial tem papel fundamental no direcionamento, tanto no processo de reabsorção tecidual, como na cicatrização desencadeada por ele. (XIA; TRIFFITT, 2006).

Os biomateriais podem ativar a resposta de macrófagos de uma maneira similar a bactérias gram-negativas ou LPS que ativam macrófagos via TLR4, entretanto, as conseqüências da invasão microbiana e implantação de biomaterial são diferentes. Microorganismos causam infecção que é resolvida por meio de resposta adaptativa via ativação de linfócitos B e T, enquanto a implantação da maioria dos biomateriais sintéticos, por exemplo, causa inflamação e reação de corpo estranho sem o envolvimento de células produtoras de anticorpos, tais como células B e T. (XIA; TRIFFITT, 2006).

Na avaliação das membranas colagênicas, a produção de proteínas anti e pró-inflamatórias, bem como de espécies reativas de nitrogênio foi comparada a um grupo controle, não submetido a contato com as membranas. No primeiro tempo avaliado (24h) foi observada produção maior de NO^{-2} no grupo controle em relação aos grupos N, H24 e H48. Uma das hipóteses é a de que o contato com os materiais colagênicos tenha promovido uma diminuição no número de macrófagos o que, conseqüentemente, levaria a diminuição na produção de NO^{-2} . Outra hipótese seria a regulação dessa produção por TGF-beta, capaz de regular negativamente a ativação de macrófagos. Além disso, é um modulador da formação de fibrose e cicatrização (LIN et al., 1995) sendo uma citocina necessária para a proliferação de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno. (McCARTNEY; FRANCIS; WAHL, 1994, SHAH et al., 1994, RODEMANN et al., 1996, BISSELL, 1998).

A produção de TGF-beta após contato com N e H24, aumentou, em relação ao grupo controle, nos tempos experimentais de 24h e 72h. Portanto, uma das hipóteses é a de que a produção de TGF-beta tenha desativado a resposta inflamatória dos macrófagos e, portanto, a produção de citocinas pró-inflamatórias, conseqüentemente, diminuindo a produção de NO^{-2} .

A IL-10 também atua como controle na produção de proteínas pró-inflamatórias, inibindo a produção de citocinas e/ou bloqueando os receptores de ligação. Nas condições de avaliação utilizadas não se observou diferença entre o grupo controle e as membranas avaliadas em todos os tempos experimentais (24h, 48h e 72h).

A secreção de IL-10 é ainda estimulada por citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-alfa. (KUCHARZIK et al., 1995, POLLICE et al., 1998), IL-1 e PGE2 (de WALL MALEFYT et al., 1991, VOLK; REINKE; DOCKE, 2000). Percebe-se que não houve estimulação da produção de IL-10 por TNF-alfa, uma vez que não foi observado aumento na sua produção em relação ao controle. Na análise de TNF-alfa, não houve diferença estatisticamente significativa entre controle e os materiais avaliados, exceto com relação às membranas H24 no tempo de 72h. O fator de necrose (TNF-alfa) tem se mostrado como potente estimulador da reabsorção óssea por meio da estimulação de osteoblastos e ativação de osteoclastos, de maneira similar a IL-1. (AL-SAFFAR, et al., 1995, GONZALES; PURDON; HOROWITZ, 1995, SABOKAR et al., 1996).

O aumento de TNF-alfa, portanto, é observado em resposta a materiais que desencadeiam resposta inflamatória. A avaliação da sua produção tem sido utilizada para determinação de potencial inflamatória de biomateriais. Gretzer et al. (2003) observaram produção de TNF-alfa maior, e estatisticamente significativa, em macrófagos estimulados com titânio em relação ao grupo controle. Embora o titânio seja um material reconhecidamente biocompatível, ele pode estimular a ativação do sistema complemento. (McALARNEY; OSHIRO; HUANG, 1993, HONG et al., 1999). Portanto, o fato de um biomaterial não apresentar citotoxicidade *in vitro*, não significa, ainda assim, que ele não possa induzir à produção de citocinas pró-inflamatórias.

A reação de macrófagos em resposta a biomateriais está intimamente relacionada à resposta imune, inflamação e reação a corpo estranho. A resposta dos macrófagos, entretanto, depende da natureza do material implantado. Para se diminuir respostas imunes ou antiinflamatórias indesejadas, os biomateriais precisam estar livres de microorganismos, assim como de moléculas relacionadas a ele, tais como LPS e fragmentos de DNA ou RNA viral. Essas moléculas sozinhas podem, por si só, serem reconhecidas por receptores de macrófagos e iniciar o processo inflamatório. (XIA; TRIFFITT, 2006). Dessa maneira, um biomaterial carreador de células, deve ser processado para sua obtenção em ambiente com rígido controle para que não haja possibilidade de contaminação por microorganismos e moléculas virais e possa haver, assim, resposta inflamatória desencadeada por eles.

A resposta inflamatória frente à implantação de um biomaterial pode desencadear a produção de uma gama de mediadores pró inflamatórios (p.ex., TNF- α , NO⁻²). O grau de severidade da reação depende da interação entre eles, bem como de outros que controlem negativamente essa resposta (IL-10) ou que inibam a ativação de macrófagos. Neste estudo foi avaliada a produção de TNF- α , TGF- β , IL-10 e NO⁻² *in vitro*. Embora outros mediadores possam atuar na resposta a um material carreador, a avaliação *in vitro* de alguns dos mediadores produzidos fornece informações importantes quanto ao potencial inflamatório do material. As matrizes colagênicas avaliadas não levaram a aumento estatisticamente significativo na produção de mediadores pró-inflamatórios e o aumento de TGF- β , em relação aos controles, indicando que elas podem favorecer o processo de cicatrização. É importante ressaltar que os macrófagos tem papel crucial na regeneração tecidual. Estudos sobre cicatrização têm demonstrado que se a infiltração com macrófagos não ocorre, a cicatrização fica severamente prejudicada. (LEIBOVICH; ROSS, 1975, MARTIN, 1997).

Uma das principais funções dos macrófagos é mediar resposta imune e inflamatória contra corpos estranhos. Por essa razão, um entendimento claro da completa interação entre macrófagos e biomateriais é crucial para melhorar a utilização dos biomateriais na construção de dispositivos médicos. (KAO, 1999).

Avaliada a biocompatibilidade de um material carreador, a adesão da célula ao biomaterial carreador consiste na primeira fase de interação com o mesmo, portanto se as células não conseguirem se fixar ao material, as etapas subseqüentes (proliferação, diferenciação e mineralização) também não terão sucesso.

As características morfológicas de superfície e porosidade da membrana são de fundamental importância para que ocorra o processo de adesão. As foto e eletro micrografias das membranas colagênicas mostraram um material acelularizado com características morfológicas diferentes em função do tratamento a que foram submetidas, as de colágeno aniônico com a presença de poros e as de colágeno nativo com fibras compactadas. As diferenças de porosidades das matrizes colagênicas aniônicas provenientes de pericárdio bovino, também foram observadas por Bet et al. (2001). Entretanto, esse tipo de observação não permite inferir se ocorre interconectividade entre os poros observados.

As análises por FTIR permitiram observar ligações compatíveis com aquelas presentes na estrutura colagênica. Nas membranas avaliadas, observou-se, ainda, a presença de alguns picos correspondentes a ligações fosfato. Uma vez que as membranas avaliadas não apresentavam células, o fosfato pode ser proveniente das soluções utilizadas no processamento do material, que envolve a utilização de sulfatos de cálcio, sódio e potássio. (BET, 2001; GOISSIS, 2003).

Outro aspecto de fundamental importância é a determinação do tipo celular utilizado nos ensaios *in vitro*, uma vez que deve apresentar a capacidade de aderir a superfícies utilizadas como controle, além de expressar parâmetros compatíveis com a diferenciação. Várias linhagens celulares, assim como células provenientes de cultura primária têm sido descritas nos ensaios *in vitro* de avaliação de biomateriais.

Balduino et al. (2005) descreveram o método de obtenção das FOST a partir do endósteo de fêmur de camundongo Balb/c e a sua capacidade osteogênica. Na Figura 4 pode-se observar a morfologia das FOST, compatível com a de células osteoprogenitoras, assim como a verificação dos elementos Ca e P, nos tempos de 7 e 21 dias. Os níveis de cálcio menores no tempo de 7 dias e apresentando pico maior em 21 dias, indicam presença de mineralização. Com base no seu potencial osteogênico já descrito (BALDUÍNO et al., 2005, SADER et al., 2005), e nessas observações, as FOST foram utilizadas para avaliações célula-material, nos ensaios de adesão e de diferenciação celular.

O colágeno é um dos principais componentes da matriz extracelular, tendo as células osteoprogenitoras grande afinidade por esse substrato. Wiedmann-Al-Ahmad et al. (2005) avaliaram, quanto ao seu potencial carreador, 16 biomateriais diferentes, divididos em 5 grupos de membranas: colagênicas de origem bovina, eqüina ou de ovinos; à base de fosfato tricálcico (alfa ou beta); ácido hialurônico; de osso bovino inorgânico e à base de silicone. Foram plaqueados osteoblastos sobre as membranas e verificada a adesão das células ao material. Dos quatro materiais considerados como os melhores para engenharia de tecidos, 1 era a base de silicone, outra, proveniente de ácido hialurônico e os outros 2 materiais, colagênicos.

Nos ensaios de adesão celular também se pôde verificar a adesão célula-matriz colagênica, isto é, entre FOST a N, H24 e H48. As fotoeletromicrografias das membranas colagênicas, obtidas por MEV, mostraram a interação das células com todos os materiais e completa cobertura das mesmas pelas FOST. As membranas

colagênicas avaliadas mostraram-se um substrato adequado para adesão e proliferação das FOST. Pelas fotomicrografias de ML, observaram-se células sobre as membranas avaliadas, entretanto não foi possível identificar a presença destas por entre os poros das membranas.

Song et al. (2006) obtiveram membranas colagênicas a partir de águas-vivas, submetidas a tratamento químico com ácido acético, soluções tampão e liofilização. Carreadores porosos foram preparados e foi obtida uma estrutura porosa e interconectada. Para verificar se adesão de fibroblastos humanos HF e crescimento destes por entre os poros, foram plaqueadas células sobre a matriz colagênica e estas foram avaliadas por ML (H/E). Os resultados observados por Song et al. (2006) quanto à penetração das células, após 2 semanas de cultivo, foram semelhantes aos encontrados nas matrizes colagênicas (N, H24 e H48), pois eles verificaram que as células se encontravam sobre a superfície do mesmo, mas não tinham penetrado na estrutura porosa. Segundo os autores, a alta afinidade das células pela estrutura colagênica poderia inibir a migração celular por entre os poros.

Entretanto, em outros trabalhos foi observada a penetração de células em matrizes colagênicas. Moreira et al. (2004), ao analisar a adesão de células osteoprogenitoras humanas fetais hFOB 1.19 (ATCC) sobre matrizes colagênicas aniônicas de origem bovina, verificaram que elas se encontravam na superfície do material, mas mostravam certa migração, principalmente na porção imediatamente adjacente à superfície no tempo experimental de 15 dias. Após 21 dias observou-se aumento do número de células por entre os poros das matrizes, principalmente na membrana com maior quantidade de poros H48. (BET, 2001).

Embora Moreira et al. (2004) tenham utilizado membranas colagênicas aniônicas também de origem bovina hidrolisadas por 24h e 48h, as células utilizadas nos ensaios, embora osteoprogenitoras, são provenientes de tecido fetal humano (hFOB 1.19), o que pode levar a diferenças em relação às respostas e ao tempo em que elas ocorrem.

Donzelli et al. (2007) avaliaram a diferenciação de células mesenquimais em matrizes de colágeno tipo I, liofilizadas. As células foram coladas na membrana com o auxílio de uma agulha de 25 *gauge*. As fotomicrografias das membranas após 14 dias mostraram uma distribuição homogênea de células, por entre os poros da membrana. Entretanto, além da alta densidade celular, as células foram introduzidas

na membrana com agulha o que pode ter facilitado a migração das células pelos poros. O plaqueamento com FOST das membranas N, H24 e H48 foi feita sobre as mesmas, com o auxílio de ponteira e pipetador automático. No presente trabalho foram plaqueadas 5×10^4 células por membrana de cerca de 1 cm^2 de diâmetro, colocadas em placas de 24 poços, ao passo que Donzelli et al. (2007) plaquearam 1×10^6 por membrana de $3 \times 3 \text{ mm}$. A densidade celular, assim como tipo celular utilizado pode levar a diferenças a alterações célula-material.

Por MET, também pôde-se verificar a interação das células com as membranas colagênicas. Observou-se um grande número de retículo endoplasmático (Re), o que está relacionado à intensa atividade sintética e, formação da estrutura óssea, pois é necessário que haja a formação da matriz extracelular colagênica para que então ela seja mineralizada. A visão da ultraestrutura permite verificar, além da interação célula-material (RATTAR et al., 2005), o padrão de normalidade e atividade das organelas celulares.

Após a fase de adesão e proliferação sobre os materiais carreadores, as células osteoprogenitoras precisam apresentar a capacidade se diferenciar sobre as mesmas.

Com a finalidade de verificar capacidade de diferenciação de células osteoprogenitoras sobre carreadores, os ensaios para dosar atividade de fosfatase alcalina são freqüentemente utilizados. (DECLERCQ et al.; 2005). Além desses ensaios, outros devem estar associados para verificar que as células tenham conseguido se diferenciar e, portanto, que tenha havido não somente a formação da matriz extracelular, mas que ela também apresente mineralização. As técnicas mais comumente utilizadas para verificar mineralização em culturas celulares e construções de célula/material são: Von Kossa, Alizarina Red, MET, FTIR e DRX. (BOSKEY, 2003).

As dosagens de fosfatase alcalina (Falc) permitiram verificar pico de atividade no tempo experimental de 28 dias para as membranas colagênicas (H24 e H48). A atividade apresentada pelas membranas aniônicas foi cerca de seis e quatro vezes (H24 e H48, respectivamente) que aquela observada no grupo nativo. A presença de cargas negativas previamente à síntese da matriz, poderia permitir a ligação de fatores de crescimento, o que poderia promover migração e diferenciação celular

(ROCHA et al., 2002), levando assim a aumento no número de células e, consequentemente, maior produção de fosfatase alcalina (Falc).

Moreira et al. (2004) verificaram pico na atividade fosfatase alcalina no tempo experimental de 3 dias, tanto para as membranas colagênicas como para o grupo controle. A atividade foi muito semelhante para os grupos controle e membranas aniônicas, mas a membrana de colágeno nativo apresentou a dosagem mais baixa. Neste estudo também se verificou uma dosagem de Falc mais baixa para o colágeno nativo em relação aos materiais aniônicos.

Sader et al. (2005) estudaram o efeito de três diferentes tratamentos na superfície de titânio sobre a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras provenientes do fêmur do endóstio de camudongo Balb/c. Plaquearam 5×10^4 células por cm^2 de superfície avaliada e verificaram pico de atividade em 21 dias. Embora tenham sido utilizadas células de mesma origem, as superfícies avaliadas por Sader et al. (2005) foram diferentes daquelas avaliadas (matrizes colagênicas nativa e aniônicas), o que poderia levar ao tempo em que ocorreu o pico de atividade da fosfatase alcalina observado.

O parâmetro mais confiável para avaliar a diferenciação final de osteoblastos e formação óssea é a formação de uma matriz extracelular calcificada. (BOSKEY et al., 1996). A análise das culturas por microscopia eletrônica também é aplicada. (BOSKEY, 1996; STANFORD et al., 1995).

O pico de atividade da Falc foi observado a 28 dias, último tempo experimental avaliado. Entretanto, não se pode afirmar que corresponderia mesmo ao pico de atividade da Falc, uma vez que não foi observado um padrão de aumento e queda da dosagem. Sabe-se que a mineralização é uma etapa posterior ao pico de atividade da Falc. Ela já ocorre durante a fase de aumento da atividade da Falc, mas o seu pico é subsequente ao pico de Falc. (BECK, 2003). Observou-se um pico na concentração de cálcio em 28 dias para o Nativo e 14-21 dias para H24 e 21 dias para H48. Tanto o pico de Falc como o da dosagem de Ca no grupo N podem não corresponder necessariamente ao pico, uma vez que não foi observado o padrão de queda de produção nos gráficos (Figuras 21 e 22).

Para avaliar a capacidade osteoindutiva de um biomaterial, é importante estar seguro de que a deposição de minerais não é consequência de precipitação

espontânea devido a altas concentrações de íons cálcio e fosfato (ANDRE-FREI et al, 2000, KHOUJA et al., 1990), mas é um processo mediado por células sob condições fisiológicas que deveria ser equivalente ao processo de ossificação in vivo. A ossificação distrófica do material deveria ser diferenciada daquela mineralização metabólica mediada por células.

Além disso, altas concentrações de Falc geram a possibilidade de que ela seja secretada para o meio, resultando na clivagem de beta-glicerofosfato e, conseqüentemente uma precipitação não específica do mineral. (DECLERCQ et al., 2005). Neste estudo foram verificadas altas concentrações de Falc (em relação ao grupo controle e nativo) em H24 e H48. A Falc poderia estar sendo secretada no meio extracelular, desencadeando a clivagem de beta-glicerofosfato, utilizado na suplementação do meio de cultura, levando à formação distrófica de minerais.

O parâmetro final de diferenciação para células *osteoblasto-like* é a formação de matriz extracelular calcificada. Entretanto, a deposição de sais de cálcio não ocorre somente durante o processo de formação óssea (ossificação), mas também em tecidos degradados ou necróticos (calcificação distrófica ou não metabólica). (BOSKEY, 2003, GRONOWICZ et al. 1989). Especialmente quando células diferenciadas são cultivadas, a senescência da cultura poderia ser acompanhada por precipitação de sais de cálcio, não representativos de formação óssea. (DECLERCQ et al., 2005).

De acordo com Declercq et al. (2005), o processo de mineralização fisiológico poderia ser confirmado pela formação de vesículas e presença de cristais de mineralização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Rohde e Mayer (2007) estudaram o processo de mineralização de osteoblastos, obtidos a partir da diferenciação de células de fetais de galinha. Mostraram, por MET, a formação de vesículas de mineralização e liberação destas nos tempos de 20 a 30 dias após plaqueamento, assim como cristais de mineralização na matriz extracelular. Por MET, nas membranas N, H24 e H48, após 21 dias, verificou-se também a presença de vesículas (Figuras 18A e 19C.) que poderiam ser compatíveis com processo de mineralização. Entretanto, não foi observada a presença de cristais na matriz extracelular, o que indicaria mineralização desta. Como a mineralização corresponde a um estágio posterior ao pico de fosfatase alcalina, esse processo pode não estar

totalmente ativo, uma vez que o pico de fosfatase alcalina foi observado após 28 dias para as membranas aniônicas.

A técnica de Von Kossa permite observar a coloração de depósitos de fosfato de cálcio, sendo utilizado como um dos métodos para avaliação do processo de mineralização. Entretanto, como a coloração é específica para esses depósitos, não se pode afirmar que as áreas coradas em preto correspondam a nódulos de mineralização formados. Foram verificadas áreas de coloração escura na superfície de N e H48 (Figura 23A e C), o que poderia corresponder a identificação de processo de mineralização. Entretanto, essa coloração também foi verificada em toda a membrana H24 o que não é condizente com as observações em ML, em que não foram observadas células no interior da matriz em nenhum dos tempos estudados. A coloração observada pode ter ocorrido em função do próprio caráter aniônico das membranas avaliadas que poderia ter atraído as moléculas de nitrato de prata, utilizadas no método de coloração de Von Kossa. Além disso, a marcação verificada na superfície da membrana indica a presença de depósitos de fosfato de cálcio, mas não se pode afirmar que ele seja decorrente de processo de mineralização controlado pelas células osteoprogenitoras. Pode ser proveniente de calcificações distróficas (DECLERCQ et al., 2005) ou ainda de resíduos do processamento (BET et al., 2001) que podem ter permanecido após processamento químico para obtenção das membranas colagênicas.

De acordo com Boyan et al. (2002), os minerais formados na mineralização distrófica tem o mesmo padrão de DRX observado na apatita mineral. A calcificação distrófica pode apresentar as mesmas características que a apatita óssea, mas a sua formação não é estimulada pelos processos de formação de matriz extracelular e mineralização, isto é, formação óssea. Não se pode descartar, entretanto, a possibilidade de que fosfato de cálcio amorfo e transiente possa representar o início da formação da fase sólida, que progride rapidamente para uma fase de transição (maturação) para uma apatita com maior ou menor cristalinidade.

Foram verificadas por FTIR bandas correspondentes às ligações fosfato por FTIR nas membranas plaquedas com FOST (N, H24 e H48), que poderiam identificar a presença de nódulos de mineralização. No entanto, essas bandas também foram observadas em todos os tempos experimentais, inclusive no inicial (7 dias), em que não seria esperado observa-las. Outra questão a ser abordada é a de

que mesmo os materiais sem células apresentaram bandas na região do fosfato o que poderia indicar a presença de resíduos do processamento do material, que utiliza cloretos, bases e sulfatos de cálcio, sulfato e potássio. (BET. et al., 2001). Por outro lado, o próprio caráter aniônico das membranas poderia atrair moléculas de cálcio presente em meio de cultura, formando assim sítios de nucleação.

Segundo Kokubo *et al.* (2000), um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, usualmente conhecida como “*bone-like apatite*”. Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição e estrutura. Acredita-se que ela atue como sinalizadora de proteínas e células para iniciar a cascata de eventos que resulta na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada anteriormente, o que favorece a união do material implantado ao osso. Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas. (KOKUBO *et al.*, 2003). Um teste usual de bioatividade consiste na utilização de uma solução que simula o fluido corpóreo acelular ou ainda de soluções supersaturadas de íons cálcio e fósforo. Contudo, a simulação do comportamento dos materiais *in vitro* desconsidera vários fatores devido à dificuldade de reproduzir fielmente os parâmetros biológicos. Apesar dessa dificuldade, os testes *in vitro* são imprescindíveis por questões éticas e econômicas, bem como por serem capazes de estabelecer possíveis mecanismos da interação interfacial entre o implante e o tecido ósseo (MASUDA *et al.*, 1998, FUJIBAYASHI *et al.*, 2003). As informações obtidas nesta fase são particularmente úteis como uma etapa preliminar à realização dos testes *in vivo*.

Nos estudos biomiméticos, os depósitos de Ca e P foram identificados por espectroscopia de energia dispersiva. A membrana de H48 seca apresentou picos maiores de P e Ca do que aquela submetida à solução simuladora de fluido corporal. A membrana N seca apresentou pico de cálcio e a submetida a meio de cultura DMEM, picos de Ca e P. A membrana H24 apresentou pico de P maior do que aquele verificado na membrana H24 submetido a SBF. Verificou-se, também, presença de picos de Ca e P nos materiais hidrolisados, submetidos a SBF, que não

foram observados no material não hidrolisado. Entretanto, pelas eletromicrografias, observa-se que essas áreas são restritas e não-uniformes, além de não apresentarem características morfológicas encontradas na formação de camada de fosfato de cálcio após tratamento com SFB. (GÓES et al., 2007).

O protocolo utilizado por Góes et al. (2007) para recobrimento da camada de colágeno com Ca e P foi aquele descrito por TAGUCHI et al. (2001), que indica a imersão do material em solução CaCl_2 (200mMm 200mL) a 25°C por 120s e em solução K_2HPO_4 (200 mM, 200 ml) a 25°C 2 durante 120s. Esses ciclos foram realizados 100 vezes. O protocolo utilizado por Góes et al. para a avaliação da capacidade biomimética do biofilme de colágeno aniônico depositado sobre implantes de titânio foi diferente, portanto daquele utilizado para avaliação de N, H24 e H48, o que poderia levar às diferenças nos resultados encontrados. Além disso, foram utilização finais camadas de colágeno gel aniônico (0,1mm de espessura) ao invés de membranas. O gel utilizado ainda foi hidrolisado por 72h, o que pode ter aumentado o seu caráter aniônico, em função de mais grupamentos carboxílicos ficarem expostos.

Os picos de Ca e P, encontrados nos ensaios de capacidade biomimética podem ser resultantes de resíduos de processamento ou ainda de depósitos de Ca distróficos. Os depósitos distróficos podem facilitar a nucleação de sais de fosfato e cálcio, facilitando o processo de mineralização, mas não estão relacionados a capacidade do biomaterial em permitir a diferenciação das células osteoprogenitoras e expressão de marcadores de diferenciação. (DECLERCQ et al., 2005)

Portanto, mesmo que não se possa afirmar que os depósitos de cálcio verificados pela dosagem de cálcio, Von Kossa, EDS e FTIR sejam decorrentes do processo de mineralização coordenado por todo o processo de formação óssea, eles podem atuar como nucleadores de Ca e P nos processos de mineralização.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

As biomembranas colagênicas avaliadas (N, H24 e H48) demonstraram ser biocompatíveis e permitiram a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em sua superfície. Entretanto, a deficiência na formação de uma porosidade interconectada nas matrizes colagênicas, limita a indicação destas como carreadores na bioengenharia óssea.

- 1) Os materiais não levaram a produção significativa da proteínas pró-inflamatórias *in vitro*. Em N e H24 houve aumento significativo da produção de TGF-beta, modulador positivo do processo de cicatrização e reparo tecidual;
- 2) As FOST aderiram sobre as matrizes de colágeno nativo e hidrolisadas por 24h e 48h, mas se concentraram na superfície das mesmas nos tempos experimentais avaliados;
- 3) Verificou-se indicação de diferenciação das células FOST sobre os carreadores colagênicos (dosagem Falc, Ca e MET). Os picos de Falc e Ca foram maiores nas matrizes aniônicas do que na nativa e controle;
- 4) Foram verificadas áreas com presença de Ca e P nas membranas aniônicas submetidas a SBF, mas não caracterizaram capacidade biomimética.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL-SAFFAR, N. et al. Neovascularisation and the induction of cell adhesion molecules in response to degradation products from orthopaedic implants. **Ann Rheum Dis**, v. 54, p. 201-8, 1995.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, 2007. In Press.

ANDREI-FREI, V. Acellular mineral deposition in collagen-based biomaterials incubated in cell culture media. **Calcif Tissue Int**, v. 66, p. 204-11, 2000.

ARPORNMAEKLONG, P. et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.1, p.60-70, 2004.

BADYLAK, S.F. Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix. **The Anatomical Record (part B: New Anat)**, v.287B, p.36-41, 2005.

BADYLAK, S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Cell & Developmental Biology**, v. 13, p. 377-383.

BALDUINO, A. et al. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. **Cell Tissue Res**, v.319, p. 255-266, 2005.

BECK, G.R.Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. **J Cell Biochem**, v.90, n. 2, p. 234-43, 2003.

BET, M.R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C.A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines and glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, v.2, p.1074-79, 2001.

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

BOSKEY, A.L. Matrix proteins and mineralization: an overview. **Conn Tissue Res**, v.35, p.357-63.

BOSKEY, A.L. Mineral analysis provides insights into the mechanism of biomineralization. **Calcif Tissue Int**, v. 72, p. 533-6, 2003.

BOYAN, B.D. et al. Osteoblast mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. **Calcif Tissue Int**, v. 71, p. 519-29, 2002.

BURG, J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, p. 2347-2359, 2000.

CHEN, X.W; GARNER, S.C.; ANDERSON, J.J. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, p. 417-422, 2002.

CORDEN, T. J. et al. Physical and biocompatibility properties of poli- ϵ -caprolactone produced inducing in situ polymerization: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. **Biomaterials**, v. 21, p.713-24, 2000.

CURRAN, J. M.; GALLAGHER, J. A., HUNT, J. A. The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. **Biomaterials**, v. 26, p.5313–5320, 2005.

DALBY, M.J.; DI SILVIO, L., HARPER, E.J.; BONFIELD, W. *In vitro* adhesion and biocompatibility of osteoblast-like cells to poly(methylmethacrylate) and poly(ethylmethacrylate) bone cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.13, p.311-314, 2002.

DATTA, N. et al. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. **Biomaterials**, v, 26, p. 971-77, 2005.

de WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J Exp Med**, v. 174, p. 915-24, 1991.

DECLERCQ, H. A et al. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. **Biomaterials**, v. 26, p. 4964-4974, 2005.

DECLERCQ, H. et al. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. **Biomaterials**, v.25, n.5, p.757-68, 2004.

DING, T.; SUN, J.; ZHANG, P. Immune evaluation of biomaterials in TNF-alfa e IL-1beta at mRNA level. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 18, p. 2233-2236, 2007.

DONZELLI, E. et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: *in vitro* osteogenic differentiation. **Archives of Oral Biology**, v.52, p.64-73, 2007.

GÓES, J.C. et al. Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternative soaking process. **Acta Biomaterialia**, v.3, p.773-78, 2007.

GOISSIS, G.; DA SILVA MAGINADOR, S.V.; DA CONCEICAO AMARO MARTINS, V. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: *in vitro* and *in vivo* study. **Artif Organs**, v. 27, p. 437-443, 2003.

GONZALES, J.B.; PURDON, M.A.; HOROWITZ, S.M. *In vitro* studies on the role of titanium in aseptic loosening. **Clin Orthop**, v.330, p. 244-50.

GRANJEIRO, J.M. et al. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 10, p. 1463-73, 2005.

GRETZER, C et al. Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly(urethane urea), polystyrene and titanium in vitro. **Biomaterials**, v. 24, p.2843-52, 2003.

GRONOWICZ, G. et al. In vitro mineralization of fetal rat parietal bones in defined serum-free medium: effect of β -glycerol phosphate. **J Bone Mineral Res**, v.4, n. 3, p. 313-24, 1989.

HATTAR, S. et al. Potential of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentiation. **Biomaterials**, v. 26, p. 839-48, 2005.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v.4, p.518-24, 2005.

HIERHOLZER, C. et al. Plate fixation of ununited humeral shaft fractures: effect of type of bone graft on healing. **J Bone Surg Am**, v. 88, n. 7, p. 1442-7, 2006.

HUANG, J., et al. *In vitro* assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.15,p.441-445, 2004.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 1996.

KHOUBA, H.I. et al. Calcium and orthophosphate deposits in vitro do not imply osteoblast-mediated mineralization: mineralization by betaglycerophosphat in the absence of osteoblasts. **Bone**, v. 11, n.6, p. 385-91.

KOKUBO, T. et al. Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, p. 99-107, 2004.

KOKUBO, T; KIM, H.M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161-75, 2003.

KUCHARZIK, T. et al. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Clin Exp Immunol**, v.100, n.3, p. 452-6, 1995.

LACERDA, C.; PLEPIS, A.M.G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 267-271, 1998.

Langer, R.; Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. **Science**, v. 260, n.5110, p.920-26.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.

LINEZ-BATAILLON, P. et al. *In vitro* MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. **Biomolecular Engineering**. v.19, p.133-141, 2002.

LUYTEN, F.P.; DELL'ACCIO, F.; DE BARI, C. Skeletal tissue engineering: opportunities and challenges. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 15, p. 759-69, 2001.

MA, P.X. Biomimetic materials for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p.184-198, 2008.

MEYER, U. et al. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. **European Cells and Materials**, v. 9, p. 39-49, 2005.

MEYER, U.; MEYER, T.; JONES, D.B. Attachments kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.9,p.301-307, 1998.

MISCH, C.E.; DIETSH, F. Bone graft materials in implant dentistry. **Implant Dentistry**, v. 2, n. 3, 1993.

MOREIRA, P. L. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater**, v. 71B, p. 229-237, 2004

NEREM, R.M. Tissue engineering in the USA. **Med Biol Eng Comput.**; v.30, n.4, p. CE8-12, Jul, 1992.

NORIS-SUÁREZ, K. et al. *In vitro* deposition of hydroxyapatite on cortical bone collagen stimulated by deformation-induced piezoelectricity. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 941-8.

O'BRIEN, F.J.; HARLEY, B.A, YANNASC, D, GIBSON, L.J.. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, v.26, p.433-441, 2005.

OLIVEIRA, R.C. Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Braz Dent J**, v. 15, p. 3-8, 2005.

OREFFO, R.O.C.; TRIFFIT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**, v. 25, n. 2, p. 5S-9S, 1999.

PANTOULI, E, BOEHM, M. M., KOKA S. Inflammatory cytokines activate p38 MAPK to induce osteoprotegerin synthesis by MG-63 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.329, p. 224–229, 2005.

POLLICE, P.F. et al. Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis in monocytes stimulated by titanium particles: evidence of an anti-inflammatory regulatory pathway. **J Orthop Res**, v.16, n. 6, p.697-704, 1998.

PELLE, M.W; RAWLINS, B.A.; FRELINGHUYSEN, P. A novel source of cancellous autograft for ACDG surgery: the manubrium. **J Spinal Disord Tech**, v. 20, n. 1, p. 36-41, 2007.

ROCHA, L B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M.A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v.23, p.449–456, 2002.

ROHDE, M.; MAYER, H. Exocytic process as a novel model for mineralization by osteoblasts in vitro and in vivo determined by electron microscopic analysis. **Calcif Tissue Int**, v. 80, p. 323-36, 2007.

ROSA, F. P. et al. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvaria. **Biomaterials** v.24, p.207–212, 2003.

SABOKAR, A. Increased osteoclastic differentiation by PMMA particle associated macrophages. **Acta Orthop Scand**, v. 67, p. 6, p.593-8, 1996.

SADER, M. S. et al. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. **Clin Oral Impl Res**, v.16, p. 667-75, 2005.

SENA, L.A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. 2004. 95 f. Tese (Doutor em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SHUKLA, R. et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. **Langmuir**, v. 21, p. 10644-10654, 2005.

SICCA, C.M. Comparative histomorphometric and tomographic analysis of maxillary sinus floor augmentation in rabbits using autografts and xenografts. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 2007. In Press.

SIVAKUMAR, M.; RAO, K.P. Preparation, Characterization and in vitro release of gentamicin from corallie hydroxiapatite-gelatin composite microspheres. **Biomaterials**, v. 23, p.3175-81, 2002.

SONG, E. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 27, p. 2951-2961, 2006.

SPECTOR, M. Basic Principles of Tissue Engineering. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. **Tissue Engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Chicago, Quintessensse, c1999. cap. 1, p. 3-16.

STANFORD, C.M. et al. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). **J Biol Chem**, v. 270, n. 16, p. 9420-8, 1995.

TAGUCHI, T. et al. Apatite coating on hydrophilic polymer-grafted poly(ethylene) films using an alternate soaking process. **Biomaterials**, v. 22, p. 53-8. 2001.

TAKAMORI, E.R. et al. Evaluation of the cytocompatibility of mixed bovine bone. **Braz Dent J**, v. 18, n. 3, p. 179-84, 2007.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions, **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, p. 443-52, 2007.

UEDA, M.; TOHNAI, I.; NAKAI, H. Tissue Engineering research in oral implant surgery. **Artificial Organs** v. 25, n.3, p.164–171, 2001.

VANDERREST, M.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEBJ**, v.5, p.2814, 2823, 1991.

VATS, A. et al. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. **Clin Otolaryngol**, v.28, p.165-72, 2003.

VERVOORDELDONK, M.J.; TAK, P.P. Cytokines in rheumatoid arthritis. **Curr Rheumatol Rep**, v.4, n.3, p. 208–17, 2002.

VOLK, H.D.; REINKE, P.; DOCKE W.D. Clinical aspects: from systemic inflammation to “immunoparalysis”. In: JACK, R.S., editor. **CD14 in the inflammatory response**. Basel: Karger, p.162-77, 2000.

WIEDMANN-AL-AHMAD et al. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, p. 55-66, 2005.

WU, C. et al. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, p. 896-904, 2006.

XIA, Z.; TRIFFITT, J. A review on macrophge response to biomaterials. A review on macrophage response to biomaterials. **Biomed Mater**; p. R1-R9, 2006.

YANO, K. et al. Synovial cells from a patient with rheumatoid arthritis produce osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin: reciprocal regulation of the production by inflammatory cytokines and basic fibroblast growth factor. **J Bone Miner Metab**, v.19, n.6, p.365–72, 2001.

YAO, J. et al. The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: fibroblast response to titanium particles. **J Bone Miner Res**, v.10, p.1417–27, 1995.

YEFANG, Z. et al. Comparision of human alveolar osteoblasts cultured on polymer-ceramic composite scaffolds and tissue culture plates. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, p 137-145, 2007.

YOSHIKAWA, T. Bone reconstruction by cultured bone graft. **Materials Science and Engineering C**, v. 13, p. 29–37, 2000.

ZAMBUZZI, W.F. et al. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. **Braz Dent J**, v. 16, n. 4, p. 274-8, 2006.

ZÁRATE-KALFÓPULOS, B.; REYES-SÁNCHEZ, A. Bone grafts in orthopedic surgery. **Cir Cir**, v. 74, n. 3, p. 217-22.