

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – *CAMPUS* SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
MONITORAMENTO AMBIENTAL – PPGBMA

FLAVIA MARIA MORAIS PEDRINI

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FLUXO E  
FORÇAS DINÂMICO-MECÂNICAS EM ARCABOUÇOS  
DE POLI(PCL-TMC)URETANA CULTIVADOS COM  
CONDROCITOS EM BIORREATOR**

Sorocaba

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – *CAMPUS* SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
MONITORAMENTO AMBIENTAL – PPGBMA

Flavia Maria Morais Pedrini

**OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FLUXO E FORÇAS DINÂMICO-  
MECÂNICAS EM ARCABOUÇOS DE  
POLI(PCL-TMC)URETANA CULTIVADOS COM CONDRÓCITOS EM  
BIORREATOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Sorocaba

2019

Morais Pedrini, Flavia Maria

OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FLUXO E FORÇAS  
DINÂMICO-MECÂNICAS EM ARCABOUÇOS DE  
POLI(PCL-TMC)URETANA CULTIVADOS COM CONDRÓCITOS EM  
BIORREATOR / Flavia Maria Morais Pedrini. -- 2019.  
104 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus  
Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Banca examinadora: Profª. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin,  
Profª. Dra. Elaine Conceição Oliveira

Bibliografia

1. Biomateriais. 2. Biorreator. 3. Engenharia tecidual. I. Orientador. II.  
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Flavia Maria Morais Pedrini, realizada em 26/02/2019:

---

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek  
PUC-SP

---

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin  
UFSCar

---

Prof. Dr. Elaine Conceição de Oliveira  
Fatec-SO

Aos meus pais, Salete e Wilson,  
que com muito carinho e apoio  
não mediram esforços para que  
eu chegasse até esta etapa da  
minha vida.

## AGRADECIMENTOS

*“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”*. A célebre frase de Lavoisier inspirou este trabalho tanto na pesquisa como nas relações humanas que se fizeram necessárias ao longo deste mestrado, pois sem estas pessoas nada seria possível.

Agradeço a Deus pela oportunidade de colocar-me diante de pessoas que puderam me conduzir, como minha orientadora Eliana Duek. Pelos ensinamentos, pelo suporte, incentivo e confiança, ações estas que me trouxeram até esta etapa profissional, minha sincera gratidão.

Agradeço à minha família pelo apoio e incentivo, especialmente aos meus pais que sempre me instruíram na vida e que despertaram em mim desde cedo o apreço ao conhecimento e à curiosidade, associada aos ideais de responsabilidade e comprometimento, a eles todo o meu reconhecimento.

O presente trabalho contou com o apoio, dedicação e envolvimento de muitas outras pessoas que direta ou indiretamente contribuíram significativamente, pessoas estas que extrapolaram o contato acadêmico e tornaram-se partes da minha vida, pois fizeram do laboratório um lugar de estudo, investigação, mas também um espaço de interação e cumplicidade – Jéssica, Moema, Priscila, Daniel, Carolini, Rodrigo, Juliana, Anna Maria e Lucas – sintam-se homenageados por mim, porque sem vocês nada disso seria possível.

Encerro os agradecimentos dedicando esta última parte ao PPGBMA que possibilita que a frase de Lavoisier continue a modificar e a aperfeiçoar a qualidade de vida das pessoas, transformando informações em conhecimento, alunos em mestres, ideias em pesquisas, colaboradores em amigos e programas acadêmicos em realizações pessoais com benefício a toda sociedade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)”.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre  
aquilo que todo mundo vê.”*

**Arthur Schopenhauer**

## RESUMO

O crescente avanço na área de engenharia tecidual, o desenvolvimento de tecnologias e técnicas de cultura de células e ainda, a obtenção de arcabouços biocompatíveis e tridimensionais, têm se mostrado como ferramentas promissoras no que compete à regeneração de tecidos e órgãos. O menisco é formado por um tecido fibrocartilaginoso, parcialmente vascularizado, submetido à grandes esforços mecânicos e quando lesionado é retirado parcial ou totalmente, levando à futuras complicações articulares. Uma única prótese a base de poliuretana é comercializada até o momento, mas pouco acessível devido ao seu alto custo. Tendo em vista este panorama, foram obtidos membranas por evaporação de solvente e arcabouços pelo processo de liofilização a partir de uma nova poliuretana, Poli(Policaprolactona-co-Trimetileno Carbonato)uretana (Poli(PCL-TMC)uretana). Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) observou-se a presença de poros interconectados na estrutura tridimensional do material. As membranas e os arcabouços foram submetidos à ensaios de citocompatibilidade, proliferação e diferenciação celular, respectivamente, por meio do cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs). Na maior parte dos ensaios, utilizou-se um biorreator em modo de fluxo dinâmico e mecânico a uma taxa de 0,4 mL/min com aplicação de força de compressão de 1N e 2N, submetidos ou não à diferenciação. Quando aplicadas as forças, o número de células nos arcabouços de poliuretana diminuiu ao longo do tempo, devido à fadiga do polímero. A partir desses resultados, os ensaios foram realizados apenas em modo de fluxo dinâmico à taxa de 0,4 mL/min. A análise por microscopia de varredura confocal a laser (MVCL) mostrou que a taxa promoveu o crescimento e a diferenciação celular no interior dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana. Este estudo demonstrou a aplicabilidade do polímero como carreador celular em abordagens de engenharia tecidual para futura aplicação como prótese meniscal.

**Palavras-chave:** Engenharia tecidual, Células-tronco mesenquimais, Poliuretana, Biorreator.



## ABSTRACT

The growing advances in tissue engineering, the development of cell culture technologies associated with biocompatible and three-dimensional scaffolds have shown to be promising for the regeneration of tissues and organs. The meniscus is constituted by a fibrocartilaginous tissue, partially vascularized, subjected to great mechanical stresses and when it is injured is removed partially or totally, leading to future joint complications. An unique prosthesis based on polyurethane is marketed, but it is not accessible due to its high cost. In view of this scenario, membranes were obtained by solvent evaporation and the scaffolds by the lyophilization process from a new polyurethane, Poly (Polycaprolactone-co-Trimethylene Carbonate) urethane (Poly (PCL-TMC) urethane). Scanning electron microscopy (SEM) showed the presence of interconnected pores in the three-dimensional structure of the material. The membranes and the scaffolds were submitted to cytocompatibility, proliferation and cell differentiation assays, respectively, by culturing mesenchymal stem cells (MSCs). In most assays, a dynamic and mechanical flow mode bioreactor was used at a rate of 0.4 mL/min with or not application of 1N and 2N compression force, whether or not subjected to differentiation. When forces were applied, the number of cells in the polyurethane scaffolds decreased over time due to polymer fatigue. From these results, the tests were performed only in dynamic flow mode at the rate of 0.4 mL / min. Laser confocal scanning microscopy (LCSM) analysis showed that the rate promoted cell growth and differentiation within the Poly (PCL-TMC) urethane scaffolds. This study demonstrated the applicability of the polymer as a cellular carrier in tissue engineering approaches for future application as a meniscal prosthesis.

**Keywords:** Tissue engineering, Mesenchymal stem cells, Polyurethane, Bioreactor.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da capacidade tri-linear de diferenciação das CTMs. A identificação de cada tipo celular resultante da diferenciação é feita pela identificação de moléculas contendo ácidos graxos (adipócitos), cálcio e/ou colágeno (osteócitos) e matriz cartilaginosa (condrócitos).....	19
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática dos estágios da condrogênese. A identificação para caracterizar a diferenciação condrogênica pode ocorrer tanto a nível nuclear, pela identificação dos fatores gênicos de transcrição ou a nível citoplasmático, seja pela identificação de mRNA específicos ou mesmo, pela síntese das moléculas-chave envolvidas na formação da matriz cartilaginosa.20	
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da organização da MEC da cartilagem. ....	22
<b>Figura 4:</b> Reação química de formação do grupo uretana. ....	26
<b>Figura 5:</b> Biorreator Electroforce 5200 BioDynamic. À esquerda, imagem do sistema do biorreator. À direita, imagem durante um experimento em que arcabouços (seta) se encontram montados em câmaras para ensaio de compressão mecânica (inserto). ....	35
<b>Figura 6:</b> Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em membranas de Poli(PCL-TMC)uretana (à direita) e controle em lamínula (à esquerda) em diferentes tempos de cultivo (1, 7 e 14 dias). Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se o citoesqueleto por meio de faloidina conjugada com Alexafluor 647. Barras 100 µm.....	38
<b>Figura 7:</b> Análise quantitativa da proliferação de CTMs em membranas de Poli(PCL-TMC)uretana realizada por MVCL por meio da marcação dos núcleos com DAPI, após 1, 7 e 14 dias em cultura estática. Resultados representados pela média ± desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos demonstrado por * $p < 0.05$ e # $p < 0.01$ .....	39
<b>Figura 8:</b> Eletromicrografias da superfície dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana. ....	43
<b>Figura 9:</b> Eletromicrografias da superfície da fratura dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana. ....	43

<b>Figura 10:</b> Curva mecânica da deformação do arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana quando submetido à força compressiva de até 2N. ....	45
<b>Figura 11:</b> Micrografias de varredura confocal a laser identificando a proliferação das CTMs em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana, após 1, 7 e 14 dias em cultura ( <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> , respectivamente) em biorreator dinâmico/mecânico. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI. Barras 100 µm. Em <b>D</b> , quantificação das CTMs.....	47
<b>Figura 12:</b> Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana em ensaio estático ou dinâmico, submetidas a diferenciação ou não. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para agregana ou colágeno II, conforme especificado na imagem, por meio da identificação de Alexafluor 647.....	51
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática demonstrando todas as 4 câmaras configuradas para que o deslocamento do travessão gere a resposta de interesse (1N) em cada amostra. ....	52
<b>Figura 14:</b> Representação esquemática demonstrando todas as 4 câmaras configuradas inicialmente para 1N (conforme o modelo anterior) respondendo individualmente com valores menores para cada amostra. ....	53
<b>Figura 15:</b> Avaliação por curva de tempo (0 a 60 min) da deformação do arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana em razão da força aplicada. ....	54
<b>Figura 16:</b> Micrografias de varredura confocal a laser observadas após 1, 7 e 14 dias de cultura em biorreator com fluxo dinâmico ( <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> , respectivamente) em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI. Barras 50 µm. Em <b>D</b> , quantificação das CTMs. Resultados representados pela média ± desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos demonstrado por * $p < 0.01$ . ....	56
<b>Figura 17:</b> Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21 dias de cultura estática, submetidas a diferenciação ou não. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para agregana por meio da identificação de Alexafluor 647.....	60
<b>Figura 18:</b> Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agregana, tanto nos arcabouços submetidos à condrogênese (diferenciado)	

quanto no material não submetido (indiferenciado), após 21 dias em cultura estática.....	62
<b>Figura 19:</b> Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana, tanto nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana quanto na superfície da lamínula, ambos não submetidos à condrogênese, após 21 dias em cultura estática.....	63
<b>Figura 20:</b> Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21 dias de cultura estática, submetidas a diferenciação ou não. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para colágeno II por meio da identificação de Alexafluor 647. ....	65
<b>Figura 21:</b> Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para colágeno II, tanto nos arcabouços submetidos à condrogênese (diferenciado) quanto nos arcabouços não submetidos (indiferenciado), após 21 dias em cultura estática.....	67
<b>Figura 22:</b> CTMs marcadas para colágeno II após 1 dia em cultura sem indução de diferenciação.....	68
<b>Figura 23:</b> Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para colágeno II, tanto nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana quanto na superfície da lamínula, ambos submetidos à condrogênese, após 21 dias em cultura estática. ....	69
<b>Figura 24:</b> Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21+7 dias de cultura dinâmica no biorreator, submetidas a diferenciação. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para agrecana ou colágeno II, conforme especificado na imagem por meio da identificação de Alexafluor 647. ....	71
<b>Figura 25:</b> Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana e colágeno II nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana submetidos à condrogênese, após 7 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator. ....	72
<b>Figura 26:</b> Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21+7 dias de cultura dinâmica no biorreator, não submetidas a diferenciação. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se	

marcação indireta para agrecana (à esquerda) e citoesqueleto (à direita) por meio da identificação de Alexafluor 647..... 73

**Figura 27:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana, tanto nos arcabouços submetidos à condrogênese (diferenciado) quanto nos arcabouços não submetidos (indiferenciado), após 7 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator. A detecção linear da fluorescência nas imagens obtidas revela qualitativamente a predominância da agrecana de acordo com cada grupo avaliado. .... 74

**Figura 28:** Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21+14 dias de cultura dinâmica no biorreator, submetidas a diferenciação. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para agrecana (à esquerda) e citoesqueleto (à direita) por meio da identificação de Alexafluor 647..... 75

**Figura 29:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana, nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana submetidos à condrogênese, após 14 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator. Observa-se a marcação da agrecana em vermelho (acima) e a sobreposição com núcleos em azul (abaixo)..... 76

**Figura 30:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana, tanto nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana submetidos à condrogênese, após 21 dias em cultura estática, 7 e 14 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator..... 78

## LISTA DE ABREVIATURAS

2D	2 Dimensões
3D	3 Dimensões
BMP-6	Proteína morfogenética óssea do tipo 6
CD-RAP	Proteína sensível ao ácido retinoico derivada da cartilagem
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
DAPI	(4',6-diamidino-2-fenilindol)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FA	Fosfatase alcalina
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina-1
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP13	Matriz metalopeptidase 13
MVCL	Microscopia de varredura confocal a laser
PBS	Tampão fosfato-salino
PCL	Poli(caprolactona)
PFA	Paraformaldeído
PGA	Poli(ácido-glicólico)
PLA	Poli(ácido-láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PU	Poliuretana
SFB	Soro fetal bovino
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento- $\beta$ 1
TMC	Trimetileno carbonato
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
UV-C	Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
3.1 Engenharia Tecidual .....	17
3.1.1 Seleção Celular.....	18
3.1.2 Biomateriais .....	23
3.1.3 Cultura de Células 3D.....	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 Obtenção de membranas e arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.....	31
4.2 MEV dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.....	31
4.3 Ângulo de contato .....	31
4.4 Cultura de células .....	32
4.4.1 Cultura de células 2D – membranas de Poli(PCL-TMC)uretana .....	32
4.4.2 Diferenciação celular em condrócitos – arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.....	33
4.4.3 Cultura de células 3D – arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.....	33
4.5 Análise estatística .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
5.1 Ensaio de citocompatibilidade – membranas de Poli(PCL-TMC)uretana	37
5.2 Ângulo de contato .....	41
5.3 MEV dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.....	42
5.4 Ensaio mecânico de compressão do arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana .....	44
5.5 Ensaio em biorreator em modo de fluxo dinâmico e mecânico .....	45

5.5.1 Ensaio com CTMs indiferenciadas sobre arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana.....	46
5.5.2 Ensaio com CTMs diferenciadas em condrócitos sobre arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana .....	49
5.6 Ensaio em biorreator em modo de fluxo dinâmico .....	55
5.6.1 Ensaio com CTMs indiferenciadas sobre arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.....	56
5.6.2 Ensaio com CTMs diferenciadas em condrócitos sobre arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana .....	59
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>



# 1 INTRODUÇÃO

As lesões da cartilagem do joelho, incluindo a cartilagem articular e os meniscos, representam ainda hoje um desafio no que compete ao seu reparo e regeneração. Por se tratar de uma forma especializada de tecido conjuntivo, a cartilagem não apresenta vasos nem terminações nervosas, salvo algumas exceções, e apesar da grande quantidade de colágeno presente em sua composição, a escassez de componentes celulares dificulta sua capacidade de regeneração, levando as lesões a uma tendência de se tornarem crônicas.

As lesões meniscais estão entre os tipos mais comuns de lesão na ortopedia, e estão muitas vezes relacionadas à prática de esportes. Entretanto, questões como o aumento da expectativa de vida e obesidade também podem levar ao surgimento deste tipo de dano. Nestes casos, principalmente se a área afetada estiver na porção avascular do menisco, a principal opção cirúrgica consiste na remoção, parcial ou total, do tecido lesado. Isso, entretanto, leva a uma redução permanente na funcionalidade da articulação do joelho, com degeneração da cartilagem e ossos, levando à osteoartrites e osteoartroses. Dessa forma, diversas abordagens, incluindo a utilização de biomateriais como alternativas aos tratamentos convencionais, vem sendo desenvolvidas. No caso dos meniscos, por exemplo, existe uma prótese disponível comercialmente (ACTIFIT®) a base de uma poliuretana cujo propósito é a facilitação do processo de cura natural do próprio tecido.

Frente a essa problemática e pensando na melhoria da qualidade de vida da população, o grupo de biomateriais coordenado pela Profa. Eliana Duek já desenvolveu dois projetos envolvendo outros polímeros para aplicação em prótese meniscal, sem e com a presença de células cultivadas em cultura estática. Diante disso, a proposta deste trabalho consiste na otimização de parâmetros de fluxo e forças mecânicas de compressão em biorreator, na caracterização biológica de uma nova poliuretana – Poli(PCL-TMC)uretana – para futura aplicação como implante em regiões articulares do menisco. De forma semelhante à prótese comercializada, a poliuretana estudada neste trabalho apresenta características de flexibilidade e tenacidade, essenciais para a região de interesse.

Portanto, no âmbito do presente trabalho, a utilização de um biorreator com estas funcionalidades contribui para o desenvolvimento de substitutos implantáveis com a geração de tecido alvo de forma mais semelhante à condição do tecido nativo, neste caso a cartilagem.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Dentro desse contexto, o objetivo geral deste trabalho consiste na otimização dos parâmetros de fluxo e forças dinâmico-mecânicas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana cultivados com condrócitos em biorreator.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Obter membranas e arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana por evaporação do solvente e liofilização, respectivamente.
2. Caracterizar a morfologia dos arcabouços por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
3. Analisar a citocompatibilidade de membranas de Poli(PCL-TMC)uretana cultivadas com CTMs.
4. Avaliar a proliferação celular das CTMs nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana ao serem cultivadas em biorreator sob modo de fluxo dinâmico e mecânico por forças de compressão.
5. Avaliar a proliferação celular das CTMs nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana ao serem cultivadas em biorreator sob modo de fluxo dinâmico.
6. Induzir a condrogênese das CTMs em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.
7. Avaliar a condrogênese das CTMs quando colocadas em biorreator em parâmetros variados, tanto sob modo de fluxo dinâmico apenas, quanto sob modo de fluxo dinâmico e mecânico.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Em diversas situações, tais como o envelhecimento, anomalias congênitas, traumas ou processos patológicos em geral, tecidos e órgãos podem perder a capacidade de desempenhar suas funções fisiológicas e embora esses processos degenerativos sejam cada vez mais bem compreendidos, muitas vezes os tratamentos convencionais não são efetivos, gerando uma carência de procedimentos que sejam capazes de promover a regeneração ou a restauração das funções perdidas (IKADA, 2006; BAKER et al., 2009; AKTER, 2016).

Nesse contexto, o transplante de órgãos se apresenta, muitas vezes, como uma opção de tratamento para pacientes com algum tipo de insuficiência (PHILLIPS; CALLAGHAN, 2017). Entretanto, existe uma grande lacuna entre o número de pacientes que necessitam de órgãos e tecidos e sua disponibilidade (CORDNER; MCKELVIE, 2016) e além dos desafios médicos e cirúrgicos desta modalidade de tratamento, a principal barreira biológica são os problemas de rejeição imune, podendo levar à perda do enxerto. Embora os fármacos imunossupressores sejam administrados para modular essa condição, alguns deles devem ser tomados para a vida toda, além de serem de alto custo e apresentarem ocasionalmente efeitos colaterais (HENCH; JONES, 2005).

Alternativamente, terapia inovadoras a partir de órgãos artificiais têm se apresentado bastante promissoras na tentativa de restauração das funções de um tecido lesionado. No entanto, apesar dos avanços em engenharia biomédica nos últimos anos, a organização dos órgãos de forma estruturalmente orquestrada para uma infinidade de funções é de difícil mimetização. Devido aos inúmeros tipos celulares, proteínas e moléculas de sinalização, além de matriz específica, a criação de órgãos a partir de materiais artificiais requer uma ampla avaliação quanto suas propriedades funcionais e de compatibilidade biológica (OSHIMA et al., 2015; MORONI et al., 2018).

Dessa forma, a engenharia tecidual surgiu como uma nova diretriz com uma abordagem versátil e eficaz à reconstrução de tecidos e órgãos, pois traz como opção o direcionando à regeneração dos tecidos lesionados, reduzindo as dificuldades inerentes ao transplante de órgãos, a imunossupressão associada a eles e a viabilidade em mimetizá-los.

### 3.1 Engenharia Tecidual

O termo engenharia tecidual foi definido pela primeira vez em 1988, em um simpósio intitulado com o mesmo nome, o qual recebeu a seguinte redação:

Aplicação dos princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida de forma a compreender as relações fundamentais entre estrutura e função em tecidos normais e patológicos bem como o desenvolvimento de substitutos biológicos a fim de restaurar, manter ou melhorar a função tecidual (SKALAK; FOX, 1988).

Logo, como uma ciência multidisciplinar, a engenharia tecidual emerge dos campos da biologia celular, engenharia, ciência dos materiais e medicina a fim de desenvolver um novo tecido funcional utilizando células vivas e um arcabouço (“*scaffold*”, em inglês) que, por sua vez, pode ser natural, sintético ou até mesmo uma composição de ambos (ATALA; MOONEY, 1997).

Considerada uma área relativamente nova, esse campo de pesquisa apresentou significativos avanços no final da década de 80 devido ao suporte das tecnologias desenvolvidas durante o século XX, incluindo cultura de células, transferência de genes e síntese de materiais (PALSSON; BHATIA, 2004; SALTZMAN, 2004).

Wakitani e colaboradores (1989) relataram o reparo de superfícies articulares de coelhos com condrócitos de aloenxerto embutidos em gel de colágeno. Já no ano de 1997, Cao e colaboradores avaliaram a viabilidade de desenvolver cartilagem na forma de uma orelha humana usando condrócitos semeados em um polímero biodegradável sintético, para posteriormente implantá-los no dorso de ratos, evidenciando sua utilidade em cirurgia plástica e reconstrutiva.

Trinta anos de desenvolvimento neste campo mostram o potencial impacto que esta área vem apresentando, desde o aperfeiçoamento nos procedimentos com células-tronco, avanços em biomateriais com propriedades mecânicas e bioquímicas capazes de preservar a função das células em cultura, aumentar a sobrevivência das mesmas quando transplantadas e ainda orientar a regeneração tecidual, até o progresso das tecnologias de bioengenharia, revolucionando o campo da medicina regenerativa (MADL; HEILSHORN; BLAU, 2018; MORONI et al., 2018; SMITH et al., 2018; ZARRINTAJ et al., 2018).

Portanto, para alcançar seu fim desejado, a engenharia tecidual faz uso de três elementos: (1) seleção do tipo celular apropriado para dar origem ao tecido alvo; (2) desenvolvimento de um arcabouço adequado para preencher e se integrar ao tecido a fim de promover a proliferação celular, podendo assumir função indutora ou não; e (3) provisão de um ambiente de cultura que propicie o crescimento tecidual (JULIAN; AL-RUBEAI, 2005).

### *3.1.1 Seleção Celular*

No que compete à seleção celular, o tipo celular apresenta uma grande influência para o sucesso da engenharia tecidual. A autorrenovação, a capacidade de proliferar indefinidamente se mantendo indiferenciada e a de gerar uma variedade de linhagens celulares especializadas são as características principais, que destacam as células-tronco como um tipo celular amplamente utilizado neste contexto (PITTENGER; KERR, 2014; TONELLI et al., 2016; KALVELYTĖ et al., 2017).

As células-tronco podem ser de diferentes naturezas: embrionárias ou precursoras do organismo já desenvolvido, chamadas adultas ou somáticas. As células-tronco adultas, por sua vez, são importantes para o mecanismo de reparo de muitos tecidos e órgãos, além de serem responsáveis por manter a homeostase dos tecidos ao repor as células que foram perdidas na maturação, no envelhecimento ou dano (BARRY; MURPHY, 2004; ERMOLAEVA et al., 2018), representando grande promessa para utilização em protocolos de reparação e regeneração tecidual.

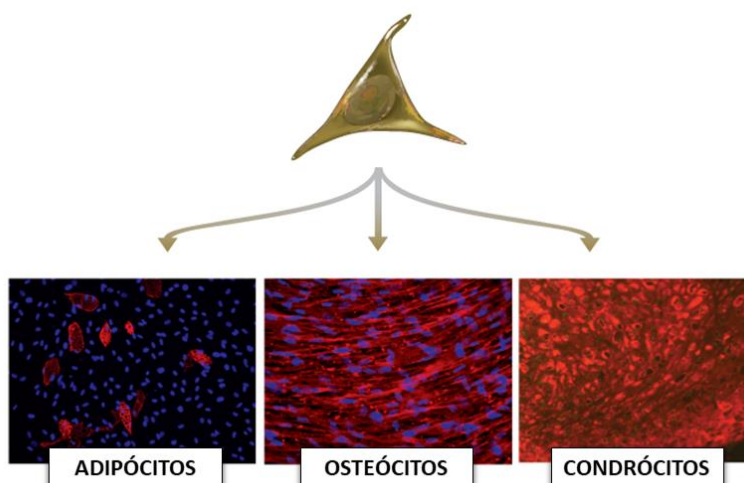
No corpo humano existem ainda, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) encontradas principalmente na medula óssea, e as células-tronco mesenquimais (CTM), encontradas no cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, entre outros, sendo ambas de origem mesodérmica (BAGNO et al., 2018; WEI; FRENETTE, 2018).

As CTMs foram descritas pela primeira vez pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein quando em seus estudos, entre as décadas de 60 e 70, perceberam uma subpopulação de células presentes na medula óssea, que apresentava grande potencial osteogênico (FRIEDENSTEIN, 1990). Estas células eram distinguíveis da maioria das células hematopoiéticas pela sua

rápida aderência às garrafas de cultura de células e pela aparência semelhante à dos fibroblastos (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008). Uma vez explorada esta descoberta, em 1991 passaram a receber a nomenclatura pela qual são conhecidas hoje, dada por Arnold Caplan (CAPLAN, 1991).

Entre as células-tronco adultas, as CTMs consistem em uma promissora fonte celular para aplicação em terapias reparativas e regenerativas devido à sua facilidade de isolamento, alta capacidade proliferativa e multipotência (BACAKOVA et al., 2018). São capazes de se diferenciar em tipos celulares do tecido conjuntivo, incluindo osteócitos, condrócitos e adipócitos (**Fig.1**) e a primeira descrição detalhada sobre esta capacidade tri-linear de diferenciação foi reportada em 1999 por Pittenger e colaboradores. A partir de então, muito se estudou acerca deste potencial (DEANS; MOSELEY, 2000; JORGENSEN; GORDELADZE; NOEL, 2004; MARION; MAO, 2006; CHEN et al., 2008; STERODIMAS et al., 2010; ZHANG et al., 2012; ALEXANDER et al., 2014; KOBOLAK et al., 2016; JIANG et al., 2018).

**Figura 1:** Representação esquemática da capacidade tri-linear de diferenciação das CTMs. A identificação de cada tipo celular resultante da diferenciação é feita pela identificação de moléculas contendo ácidos graxos (adipócitos), cálcio e/ou colágeno (osteócitos) e matriz cartilaginosa (condrócitos).

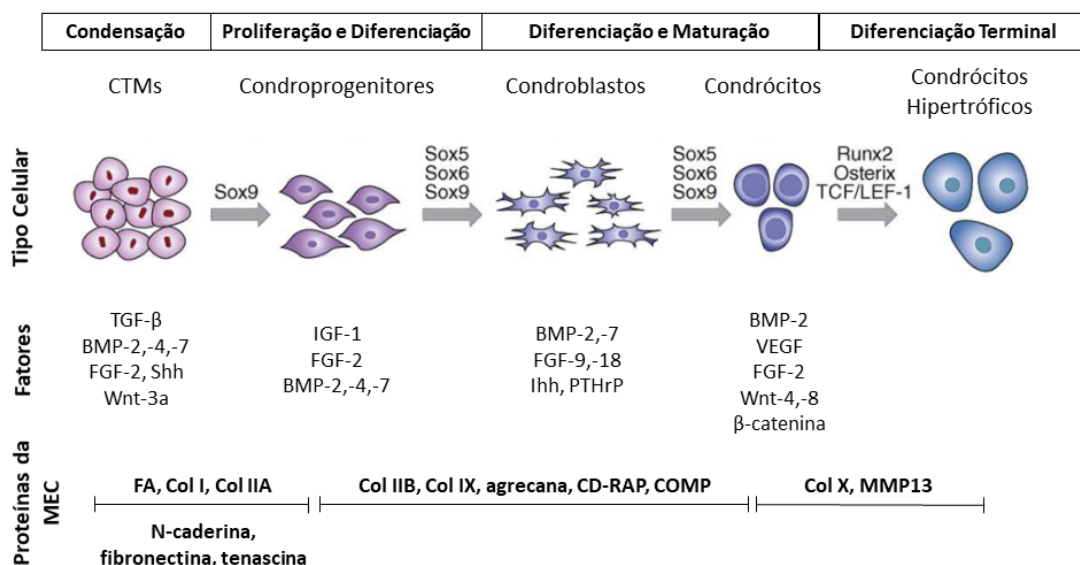


Fonte: Adaptado de R&D Systems

Nas abordagens de engenharia tecidual e medicina regenerativa, uma das estratégias utilizadas consiste em diferenciar, *in vitro*, as células-tronco nas

linhagens de interesse para posteriormente aplicá-las *in vivo*. Nesse contexto, diversos são os procedimentos utilizados, incluindo o uso de fatores de diferenciação, estimulação mecânica, proteínas de matriz extracelular (MEC) e abordagens de engenharia genética. A diferenciação condrogênica, por exemplo, pode ser induzida pela cultura das células na presença de dexametasona, ácido ascórbico,  $\beta$ -Glicerofosfato, fatores de transformação do crescimento- $\beta$ 1 e  $\beta$ 3 e proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP-2), entre outros (**Fig. 2**) (LI; L'HEUREUX; ELISSEEFF, 2011). Durante a diferenciação, as CTMs se organizam formando um blastema inicial, que se caracteriza pela organização celular densa em grande proliferação seguida de diferenciação condrocítica. No blastema tardio, há intensa expressão de moléculas típicas da matriz e a presença destas induz a um efeito parácrino no que tange a atividade celular diferenciada (PRITCHARD, 1979).

**Figura 2:** Representação esquemática dos estágios da condrogênese. A identificação para caracterizar a diferenciação condrogênica pode ocorrer tanto a nível nuclear, pela identificação dos fatores gênicos de transcrição ou a nível citoplasmático, seja pela identificação de mRNA específicos ou mesmo, pela síntese das moléculas-chave envolvidas na formação da matriz cartilaginosa.



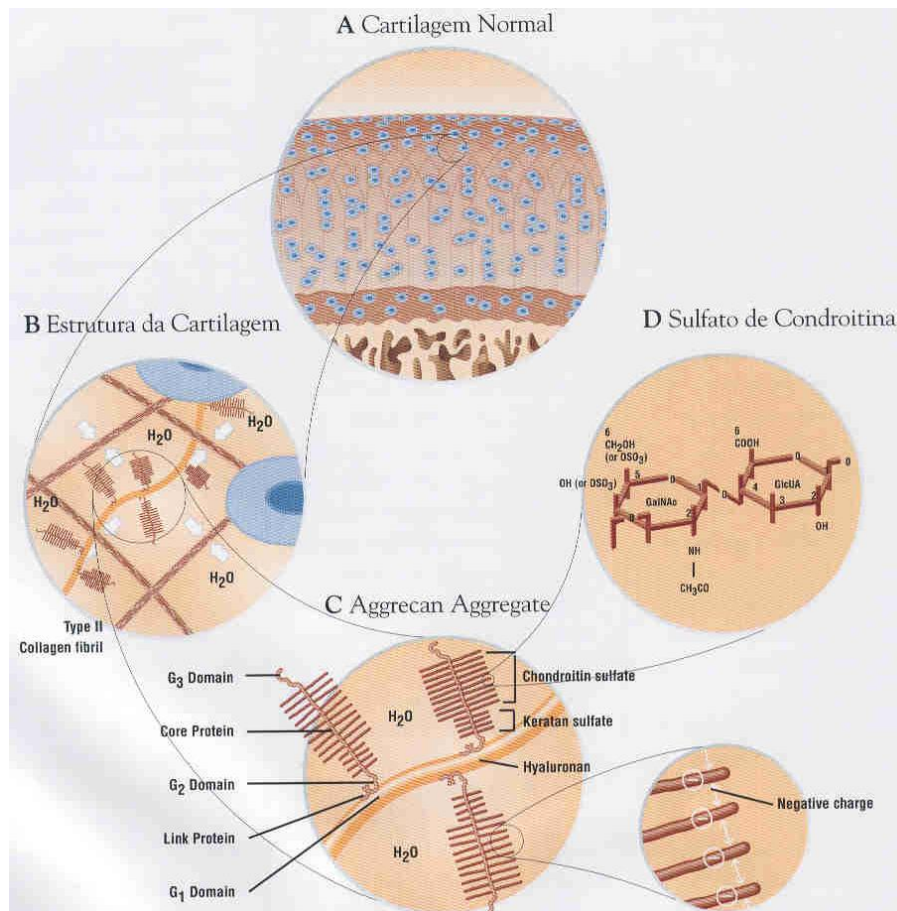
Fonte: Adaptado de Vinatier et al (2009)



Em lesões teciduais, as CTMs são recrutadas no local da lesão e estão envolvidas em uma série de fatores de modulação da resposta inflamatória e da diferenciação. Estímulos da própria lesão, tais como citocinas inflamatórias (i.e. TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ), induzem as mesenquimais a produzirem fatores de crescimento variados (i.e. EGF, FGF, VEGF, TGF- $\beta$ , etc), que por sua vez irão favorecer a diferenciação, além de controlar a resposta inflamatória, regulando o reparo e a regeneração tecidual (AGUILAR et al., 2009; SHI et al., 2012; HUNG et al., 2013; MA et al., 2013).

O reparo e a regeneração do tecido cartilaginoso, entretanto, ainda é um desafio (ZHANG et al., 2018). Embora inicialmente considerado como um tecido com uma estrutura simples, a reprodução de suas interações finamente equilibradas é de implementação complexa (JOHNSTONE et al., 2013). O tecido cartilaginoso, assim como os demais tipos de tecido conjuntivo, é composto por células, neste caso os condrócitos, e abundante material intercelular, constituindo sua matriz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Dentre os tipos de cartilagem existentes, a MEC da cartilagem hialina é caracterizada pela presença de fibrilas de colágeno, preferencialmente do tipo II, e uma porção amorfa constituída por glicosaminoglicanas combinadas com proteínas, formando complexos denominados proteoglicanos. Quando organizados, estes complexos constituem grandes moléculas denominadas agreganas, que conferem à cartilagem sua capacidade de suportar cargas compressivas. Todo este conjunto, por sua vez, encontra-se associado à longas moléculas de ácido hialurônico e também às fibras de colágeno, criando uma rede tridimensional na matriz cartilaginosa (**Fig. 3**) (KIANI et al., 2002; ROUGHLEY; MORT, 2014).

**Figura 3:** Representação esquemática da organização da MEC da cartilagem.



Fonte: (Y. et al., 2013)

Devido à avascularização da cartilagem, salvo regiões em que esta se apresenta muito espessa, associada à alta densidade da MEC, característica deste tecido, os condrócitos apresentam pouca atividade proliferativa e capacidade regenerativa. Esta limitação, quando associada a fatores genéticos ou ambientais, geralmente leva ao desenvolvimento acelerado de doenças como a osteoartrite (OA), por exemplo, ou à remodelação dos defeitos da cartilagem com tecido fibroso ou fibrocartilagenoso, cujo potencial mecânico é diminuído quando comparado com a cartilagem hialina normal (STROMPS et al., 2014).

Estudos *in vitro* mostram que as CTMs submetidas à condrogênese expressam biomoléculas tipicamente associadas ao tecido cartilagenoso, como a agrecana e colágeno tipo II (SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; GRÄSSEL; STÖCKL; JENEI-LANZL, 2012), entretanto, é importante ressaltar que embora esses marcadores estejam associados à cartilagem, a geração de condrócitos *in vitro* consiste na mais complexa das três diferenciações clássicas.

Isto se explica, entre outros fatores, pela ausência de estrutura estratificada e organização espacial normalmente encontradas na cartilagem nativa, resultando em propriedades mecânicas inferiores quando comparadas ao processo *in vivo* (SOMOZA et al., 2014; ASSIS-RIBAS et al., 2018). Assim, apesar deste potencial promissor, a participação das CTMs na formação de tecido funcional pode ser limitada.

Nesse âmbito, os biomateriais na forma de arcabouços atuam como uma ferramenta essencial para contrariar estes fatores, uma vez que além de preencherem o local da lesão e se integrarem ao tecido circunjacente, oferecem suporte, atuando como carreadores celulares, permitindo a proliferação e conseqüentemente a diferenciação celular no tecido de interesse, em estruturas tridimensionais (KEANE; BADYLAK, 2014; YU et al., 2017).

### 3.1.2 Biomateriais

Por definição, os biomateriais englobam qualquer substância, oriunda de compostos naturais ou sintéticos, destinada a interagir com o sistema biológico para substituir a matéria viva que perdeu sua função (WILLIAMS, 1999). Dessa forma, os arcabouços produzidos por meio de biomateriais são planejados para interagir com o organismo, auxiliando na recuperação de tecidos, órgãos ou funções (WILLIAMS, 2009).

O uso dos biomateriais não é recente, e sua aplicação na correção de diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana remete à antiguidade. Entretanto, com o passar do tempo e a evolução da ciência e tecnologia, esforços foram dedicados a fim de desenvolver biomateriais que apresentem propriedades biológicas e mecânicas adequadas e um microambiente tridimensional poroso que permita a adesão, crescimento e diferenciação celular (GAO et al., 2017), além de métodos de processamento apropriados que resultem em respostas teciduais favoráveis. Ademais, as propriedades físico-químicas dos biomateriais, que os faz serem divididos em metálicos, cerâmicos e poliméricos, também exibem especificidades que geram diferentes respostas teciduais (LI et al., 2018b).

Independente da sua classificação, é importante ressaltar que além de facilitar o transporte de nutrientes e oxigênio o arcabouço deve obedecer a

alguns requisitos (**Tabela 1**), entre eles, fornecer a forma adequada e o suporte estrutural para a configuração anatômica pretendida, além de que sua presença não deve causar danos ao sistema biológico, não podendo ser tóxico, cancerígeno, antigênico ou mutagênico (MORAIS; GUIMARÃES; ELIAS, 2007).

**Tabela 1:** Características gerais dos arcabouços para aplicação em engenharia tecidual.

<b>Biocompatibilidade</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apresentar componentes em sua estrutura que não causem rejeição imunológica;</li> <li>- Os produtos de sua degradação não podem ser tóxicos.</li> </ul>
<b>Biodegradabilidade</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apresentar degradação controlada que complemente o crescimento tecidual, garantindo suporte suficiente;</li> <li>- Degradar por processos enzimáticos ou biológicos do hospedeiro;</li> <li>- Favorecer que as células produzam sua própria matriz extracelular.</li> </ul>
<b>Arquitetura</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apresentar poros interconectados que permitam a difusão e migração celular;</li> <li>- Apresentar porosidade suficiente para viabilizar o crescimento celular sem enfraquecer as propriedades mecânicas.</li> </ul>
<b>Propriedades mecânicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apresentar resistência elástica, compressiva e de fadiga comparáveis ao tecido hospedeiro;</li> <li>- Apresentar propriedades mecânicas que permitam que o arcabouço possa ser facilmente manipulado no ambiente clínico.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Turnbull et al (2018)

Na década de 1980, James Anderson realizou estudos que investigaram a resposta celular e imunológica a materiais quando implantados no organismo, tornando-se referência para estudos posteriores (ANDERSON; MILLER, 1984; ANDERSON, 1988). Suas pesquisas mostraram a resposta inflamatória aguda

e de longo prazo aos biomateriais sintéticos, fornecendo a base para definir a reação do organismo vivo a estes. Desde então, a compreensão das interações célula-material e das propriedades dos biomateriais permitiu o aperfeiçoamento dos mesmos e conseqüentemente possibilitou aplicações mais compatíveis (SADTLER et al., 2016).

### 3.1.2.1 Biomateriais poliméricos

Os polímeros são macromoléculas naturais ou sintéticas compostas de unidades de repetição (monômeros), geralmente dispostas na forma de uma cadeia. Em comparação com cerâmicas, vidros e metais, os polímeros são relativamente mais fracos e flexíveis, no entanto, devido à sua versatilidade, facilidade de processamento e biocompatibilidade, muitos polímeros, naturais e sintéticos, são frequentemente utilizados na engenharia tecidual (PERTICI, 2017). Entre os polímeros sintéticos pertencentes a classe dos biorreabsorvíveis, pode-se destacar o poli(ácido-láctico) (PLA), poli(ácido-glicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), os policarbonatos e as poliuretanas, sendo bastante utilizados para a criação de arcabouços.

Uma classificação geral distingue os biomateriais poliméricos em duas categorias: materiais degradáveis (biorreabsorvíveis) e não degradáveis, os quais são utilizados como implantes temporários e permanentes, respectivamente (BARBANTI et al., 2005).

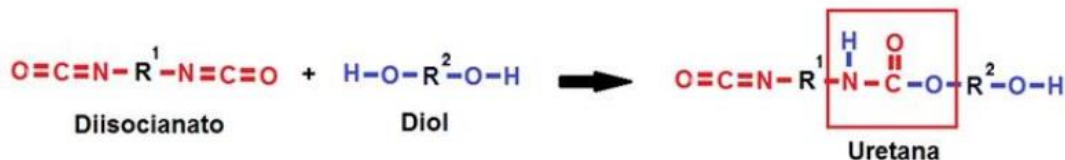
Normalmente, os tecidos têm a capacidade suficiente de cura ou regeneração e necessitam apenas da presença temporária de um biomaterial para dar suporte e guiar sua recuperação. Assim, os polímeros biorreabsorvíveis tem atraído um interesse crescente no campo da medicina, uma vez que podem ser degradados e excretados ou reabsorvidos sem remoção cirúrgica, já que os produtos da degradação são metabolizados pelo próprio organismo (CASALINI, 2017). O controle do processo de degradação, que por sua vez, depende da estrutura molecular do polímero, dos processos químicos e físicos sofridos por ele e da razão do copolímero, quando houver, também se torna possível (DE REZENDE DUEK; CRISTINA MOTTA, 2017; PERTICI, 2017). Assim, como uma forma de alcançar propriedades específicas para determinada aplicação, é

possível realizar uma combinação de materiais, sendo os polímeros sintéticos bastante atraentes para esta estratégia (LI, 1999; ALEXIS, 2005; VERT, 2005).

As poliuretanas (PUs) são uma classe versátil de polímeros cuja primeira síntese foi realizada em 1937 pelo químico alemão Otto Bayer. Esta classe tem atraído a atenção devido às propriedades mecânicas, resistência química e resiliência apresentadas por estes materiais, além de serem biocompatíveis. Foram introduzidos como biomateriais para reparo ósseo e cartilaginoso no final dos anos 90 e desde então vêm sendo aplicados como arcabouços, sistemas de liberação de fármacos, entre outros (MARZEC et al., 2017).

A poliuretana difere de outros polímeros uma vez que não existem monômeros de uretana. A ligação química existente no polímero é denotada como uretana (NHCOO) mas sua síntese ocorre por meio da reação entre moléculas com dois ou mais grupos hidroxila, reagindo com moléculas contendo dois ou mais grupos isocianato (**Fig. 4**) (GABRIEL et al., 2017).

**Figura 4:** Reação química de formação do grupo uretana.



As propriedades desejáveis das PUs podem ser adaptadas alterando a composição química, a proporção de matérias-primas ou parâmetros de síntese. Dessa forma, elas podem ser obtidas como estáveis ou biodegradáveis, hidrofóbicas ou hidrofílicas, termoplásticos ou termofixos. Além disso, a presença de funcionalidades reativas na cadeia principal da poliuretana aumenta sua compatibilidade com a maioria dos polímeros e, portanto, se torna adequada para a formação de estruturas em rede. Assim, dependendo das matérias-primas utilizadas, o produto final difere em sua natureza, propriedades e aplicações (COOPER; GUAN, 2016; MARZEC et al., 2017). Neste contexto, o presente trabalho faz uso de uma poliuretana modificada, utilizando como base a policaprolactona (PCL) e o trimetileno carbonato (TMC) a fim de se obter um arcabouço biorreabsorvível.

A policaprolactona, utilizada na composição do copolímero, foi um dos primeiros polímeros sintetizados pelo grupo Carothers, no início da década de 1930 e consiste em um poliéster semicristalino extensivamente estudado, com excelente biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* (NATTA; HILL; CAROTHERS, 1934; VENUGOPAL; ZHANG; RAMAKRISHNA, 2006; CAO et al., 2009). Tais características, associadas à degradabilidade de suas ligações éster por hidrólise, flexibilidade de suas cadeias à temperatura ambiente, capacidade de ser combinada com múltiplos materiais e à solubilidade em uma grande quantidade de solventes orgânicos, transformam a PCL em um polímero amplamente utilizado em vários dispositivos médicos (FELICE et al., 2018). Contudo, tal biopolímero possui uma degradação lenta, entre 3 a 4 anos, limitando sua utilização (LAM et al., 2009). Assim, sua combinação com outros polímeros permite a obtenção de materiais com tempo de degradação mais adequado às necessidades de aplicação, além de manter as propriedades reológicas e viscoelásticas referentes à PCL (LEE et al., 2003; DAI et al., 2004; LIESHOUT et al., 2006; THOMAS et al., 2006; LABET; THIELEMANS, 2009; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

O TMC, também utilizado na composição do copolímero, consiste em um polímero biocompatível, biodegradável e bastante flexível (BAT et al., 2010; MÁRQUEZ; FRANCO; PUIGGALÍ, 2012). Sua taxa de degradação *in vitro* é lenta, entretanto, devido à ação enzimática, torna-se mais rápida quando *in vivo* (ZHU et al., 1991). Apresenta propriedades mecânicas deficientes e por esta razão a utilização deste polímero é voltada para a obtenção de blendas e copolímeros, os quais adquirem como característica, elevados valores de módulo de elasticidade (DÍAZ-CELORIO et al., 2012).

Portanto, a síntese de uma nova poliuretana, tendo como base a policaprolactona e o trimetileno carbonato, teve como resultado a obtenção de um poli(éster-carbonato) biorreabsorvível que apresenta como características tenacidade e flexibilidade mais acentuadas (GOMES, 2016).

### 3.1.3 Cultura de Células 3D

A semeadura celular em um arcabouço tridimensional (3D) é um passo importante para alcançar um cultivo bem-sucedido e uma distribuição uniforme

das células no interior do material. Nesse cenário, as estratégias de cultura estática comumente aplicadas podem apresentar problemas e limitações, isso porque na cultura estática, uma suspensão de células concentrada é pipetada no arcabouço poroso podendo resultar numa distribuição celular heterogênea, com baixa eficiência de semeadura e baixa profundidade de penetração das células. Assim, uma cultura estática em arcabouços 3D é mais deficiente em termos de distribuição celular no interior dos arcabouços quando comparado à uma cultura dinâmica (BEŞKARDEŞ et al., 2018a; KATO; KIM; KINO-OKA, 2018).

O corpo humano representa uma coleção complexa de ambientes dinâmicos onde interações bioquímicas, físico-químicas e mecano-estruturais atuam para regular o comportamento das células. As células são constantemente submetidas às forças de cisalhamento, compressão e tensão, enquanto que a magnitude destes estímulos está relacionada às características funcionais do próprio tecido (UTO et al., 2017). Assim, estratégias *in vitro* que mimetizam a dinâmica *in vivo* fornecem uma melhor compreensão dos processos biológicos fundamentais e neste contexto, os biorreatores atuam de forma vital, pois são capazes de promover a cultura celular em um ambiente controlado, garantindo a manutenção e nutrição das células no interior do arcabouço e conseqüentemente o desenvolvimento tecidual (FRITH; THOMSON; GENEVER, 2010).

### 3.1.3.1 Biorreator

Em engenharia tecidual os biorreatores são indicados para conduzir a proliferação celular e tecidual de forma controlada e reprodutível, por meio do controle de variáveis como o fluxo de meio, pH, forças mecânicas, entre outros (JULIAN; AL-RUBEAI, 2005). Dessa forma, o biorreator é capaz de mimetizar mais precisamente a condição de um organismo vivo, fornecendo um ambiente fisiológico *in vitro* específico do tecido desejado durante sua maturação (ROSSER; THOMAS, 2018a), assegurando resultados mais próximos de um ensaio pré-clínico.

Existem diversos tipos de biorreatores – biorreatores de fluxo para induzir perfusão; de indução de forças de cisalhamento; indução de pressão



hidrostática; biorreatores de compressão, etc. - entretanto, cada tipo de tecido (ex: pele, osso, vasos sanguíneos, cartilagem, etc.) requer um biorreator específico que se adeque às suas necessidades. No caso do tecido cartilaginoso, o biorreator deve ser capaz mimetizar as condições mecânicas *in vivo*, a fim de garantir um melhor resultado (ZHAO et al., 2016).

Os biorreatores aplicados à regeneração de tecido cartilaginoso têm sido utilizados a bastante tempo. Marlovits e colaboradores em 2003, mostraram a partir de um biorreator rotativo foram capazes de formar tecidos cartilagosos cilíndricos nas dimensões de  $1.25 \pm 0.06 \times 0.60 \pm 0.08$  cm, com expressão confirmada de agrecana e colágeno tipo I e II, dentro de 12 semanas. Em 2004, Chang e seu grupo de pesquisa formularam um biorreator de câmara dupla capaz de formar enxertos osteocondrais bifásicos em um único aparato, em até 4 semanas.

Biorreatores de perfusão também se mostraram bastante eficientes para a formação de tecido cartilaginoso. Os biorreatores de perfusão revelaram aumentar a qualidade da cartilagem, pois melhoram a retenção de matriz extracelular. Por exemplo, o aumento das taxas de fluxo de 0.075 mL/min para 0.2 mL/min, para condrócitos humanos semeados em arcabouços de PLGA, por até 5 semanas, aumentou a porcentagem de glicosaminoglicanas retidas na MEC (SHAHIN; DORAN, 2011). Além disso, a cartilagem cultivada em biorreatores de perfusão apresentou propriedades biomecânicas que se assemelham à maior parte da cartilagem nativa (SANTORO et al., 2010).

Os biorreatores de compressão também estão sendo cada dia mais utilizados na engenharia tecidual de tecido cartilaginoso. Eles são responsáveis pela aplicação de cargas de compressão dinâmicas, as quais são similares à carga fisiológica natural da cartilagem. Os biorreatores de compressão podem melhorar a formação de massa e aumentar os módulos elásticos da cartilagem formada, aproximando-a da cartilagem nativa (DAVISSON et al., 2002; MARLOVITS et al., 2003; SEIDEL et al., 2004; XIE; HAN; MATSUDA, 2006; TSUANG et al., 2008; WANG et al., 2009; TRAN; COOLEY; ELDER, 2011; NEBELUNG et al., 2012; ELHAMIAN et al., 2015; ZIGNEGO; HILMER; JUNE, 2015).

O desenvolvimento e o avanço da tecnologia referente aos biorreatores garante um grande progresso no campo da engenharia tecidual,

uma vez que eles fornecem os meios tecnológicos para a realização de estudos controlados (MARTIN; WENDT; HEBERER, 2004). Logo, a otimização e padronização de parâmetros para a construção de tecidos em sistemas fechados se faz de grande importância, frente à compreensão limitada do papel regulador destes parâmetros no desenvolvimento tecidual, visando à identificação das condições ambientais e operacionais ideais para a geração de tecidos específicos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção de membranas e arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana**

As sínteses e as caracterizações químicas da poliuretana foram realizadas previamente no Laboratório de Biomateriais – PUC/SP (GOMES, 2016).

Para a produção de membranas aplicou-se o método de evaporação de solvente. O copolímero, previamente sintetizado, foi diluído em clorofórmio em uma concentração de 10% (m/v). Uma vez diluído, verteu-se a solução em molde de vidro com dimensão de 3 x 5,5 cm em temperatura ambiente e atmosfera saturada de clorofórmio. Após a completa evaporação do solvente, as membranas foram submetidas ao cultivo celular.

Para a produção dos arcabouços, solubilizou-se o material em 1,4-dioxano em uma concentração de 10% (m/v). Em seguida, congelou-se a solução, a uma temperatura de aproximadamente 0 °C, em um molde cilíndrico de teflon. Após o congelamento, o molde contendo a solução foi submetido ao processo de liofilização durante 48h, a fim de obter a formação de poros no interior do material. Os arcabouços processados foram cortados nas dimensões de 1cm de diâmetro por 0,5 cm de altura.

### **4.2 MEV dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana**

A análise morfológica da Poli(PCL-TMC)uretana foi feita por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (EVO MA15-ZEISS, IB/UNICAMP). Para avaliar a distribuição dos poros na superfície e no interior dos arcabouços, o material foi congelado em nitrogênio líquido e submetido a fratura. As amostras foram metalizadas em 15-30nm de ouro (Emitech K550) e visualizadas em aumentos variados.

### **4.3 Ângulo de contato**

A molhabilidade das superfícies das membranas de Poli(PCL-TMC)uretana foi avaliada medindo-se os ângulos de contato estático de gotas de líquido polar (água destilada) na superfície da membrana. O ângulo de

contato foi determinado por um goniômetro Rammé-Hart 100-00 e o resultado é a média de vinte valores medidos em três locais diferentes da superfície.

#### **4.4 Cultura de células**

As CTMs utilizadas nos experimentos foram adquiridas pela empresa Thermo Fisher Scientific (Código: R7788110). Uma vez recebidas, as células foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) e então descongeladas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich – código: D6046) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. As células foram expandidas em garrafa de cultura de células de 75cm<sup>2</sup> e após assumirem monocamada, foram tripsinizadas com solução tripsina-EDTA a 0,2%. Células entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagem foram utilizadas nos experimentos. Todos os cultivos controle utilizaram lamínulas redondas Thermanox® (Nunc ThermoScientific, USA) produzidas com filme de poliéster modificado e tratado, para que suas superfícies sejam hidrofílicas com molhabilidade em torno de 66°, atuando como um modelo padrão-ouro em cultura de células aderentes (MITTAL, 2004).

##### *4.4.1 Cultura de células 2D – membranas de Poli(PCL-TMC)uretana*

Em virtude de poli(PCL-TMC) uretana ser um material novo com propriedades físico-químicas ainda em estudo, antes do direcionamento da avaliação 3D em arcabouços, foram produzidas membranas deste material a fim de avaliar sua biocompatibilidade inicial e, principalmente, avaliar a afinidade de adesão do tipo celular alvo para a aplicação clínica ao qual o arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana se destina. As CTMs foram submetidas a ensaios de adesão e proliferação nas membranas, cortadas em cilindros de 0,5 cm de diâmetro por 0,1 cm de espessura. As membranas foram esterilizadas por radiação ultravioleta (254nm) (UV-C) durante 1h e imersas em DMEM puro por 24h à 37°C. Transcorridos os tempos de cultivo (1, 7 e 14 dias), as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4%, os núcleos marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e o citoesqueleto marcado com faloidina conjugada com AlexaFluor 647. As análises foram feitas por microscopia de varredura confocal

a laser (MVCL) (Leica TCS SP8) e após a obtenção das imagens, os núcleos das células aderidas foram identificados e contados usando o *software* Image J.

#### *4.4.2 Diferenciação celular em condrócitos – arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana*

Para a diferenciação das CTMs, utilizou-se o protocolo de diferenciação em condrócitos do Kit StemPro® (Gibco – código: A1007101). As CTMs foram inicialmente cultivadas nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Após as culturas estarem estabelecidas (cerca de 4 dias), o meio padrão foi trocado pelo meio condrogênico, suplementado por fatores de crescimento de condrócitos, conforme estabelecido no Kit. Transcorrido o tempo de cultivo em cultura estática (21 dias), parte dos arcabouços tiveram suas células fixadas com PFA a 4% e os núcleos marcados com DAPI. Os demais arcabouços foram colocados no biorreator durante 7 e 14 dias, para ensaios de fluxo dinâmico e dinâmico/mecânico. Após a fixação das células, foi realizada a imunomarcação das amostras com anticorpos primários de origem humana produzidos em camundongos, anti-agrecana e anti-colágeno II, e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com AlexaFluor 647, para a análise da expressão de agrecana e colágeno II, respectivamente.

#### *4.4.3 Cultura de células 3D – arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana*

##### *4.4.3.1 Ensaio mecânico da Poli(PCL-TMC)uretana*

Para determinar a capacidade de deformação mecânica do material quando submetido à forças de compressão, fez-se um ensaio mecânico do arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana, sem a presença de células, mas com apresentação estrutural do material semelhante quando na presença destas (1 cm de diâmetro por 0,5 cm de altura). As forças aplicadas foram aumentando gradativamente em função do tempo até atingir o limite de deformação em torno de 50%. A curva de deformação foi realizada no sentido axial para o interior do arcabouço. Tal análise foi determinante para definir os parâmetros metodológicos iniciais para a realização dos experimentos.

#### 4.4.3.2 Proliferação celular em biorreator em modo de fluxo dinâmico e mecânico

De modo a avaliar a influência da dinâmica de fluxo e da compressão mecânica na proliferação celular em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana, realizaram-se ensaios no biorreator em modo de fluxo dinâmico e mecânico, tanto para células indiferenciadas (CTMs) como para as CTMs submetidas à diferenciação em condrócitos.

Para o ensaio com as células indiferenciadas, configurou-se o biorreator para bombeamento do meio a uma taxa de fluxo dinâmico contínuo em torno de 0.4 mL/min e ensaio mecânico de compressão, com ciclos de 2N de força a cada 5 segundos, durante todo o período experimental (14 dias). Em relação ao ensaio com as células submetidas à diferenciação, a taxa de fluxo utilizada foi a mesma do ensaio anterior (0.4 mL/min), entretanto, a aplicação da força compressiva se deu de forma diferente: aplicou-se ciclos de 1N de força a cada 60 segundos, durante 2h por dia, três dias por semana. Esse planejamento está melhor representado na **Tabela 2**. A determinação da taxa de fluxo ocorreu com base na literatura (CARTMELL et al., 2003) e também em virtude de ser o limite mínimo de velocidade possível de ser configurado na bomba peristáltica do equipamento.

**Tabela 2:** Desenho experimental Tempo x Parâmetros dos ensaios mecânicos no biorreator

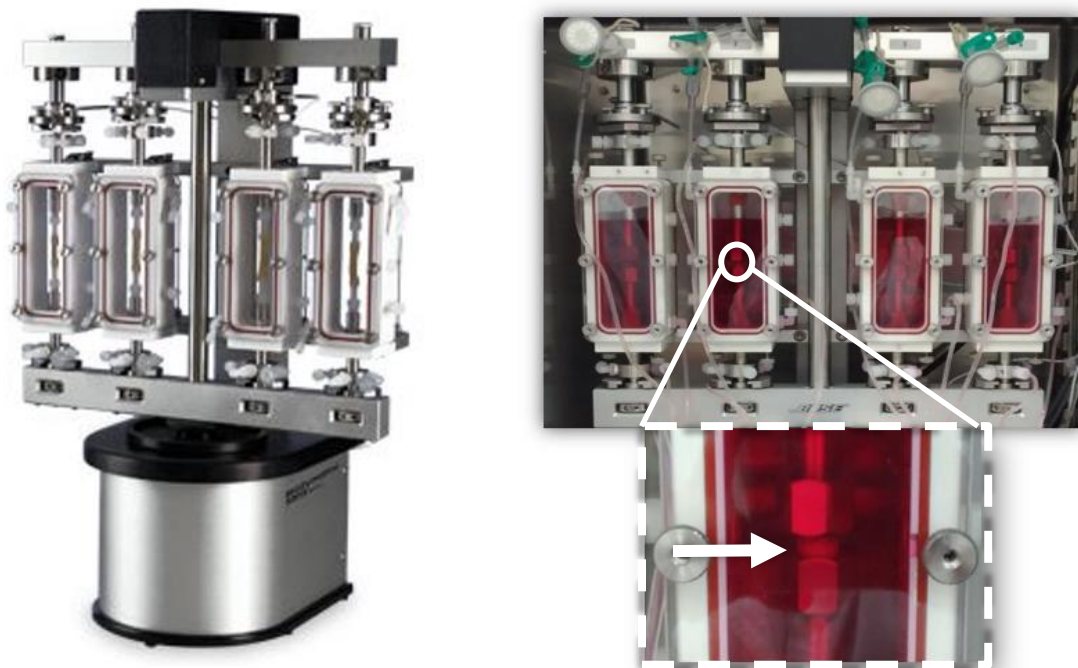
Dias Exp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Piloto	-----a-----													
Exp. <sup>b</sup>	---c---							---c---						

**a** Ciclos de 2N de força aplicados a cada 5 segundos. Este parâmetro inicial baseou-se no limite máximo de deformação (2N) obtido pelo ensaio mecânico do material; **b** Para este experimento, as forças foram aplicadas durante 2h ao dia, sendo os dias 4-7 e 11-14 sem aplicação de força; **c** Ciclos de 1N de força aplicados a cada 60 segundos.

Inicialmente, os arcabouços com dimensões de 1 x 0,5 cm foram desinfetados com etanol 70%, lavados com tampão fosfato-salino (PBS) e ambientados por 24 horas em DMEM puro à 37°C. Em ambos os ensaios, as CTMs foram cultivadas nos arcabouços na concentração de  $2 \times 10^4$  células/poço, com trocas periódicas de meio. Após os tempos de cultivo em cultura estática,

os arcabouços foram acoplados às câmaras de cultura e as mesmas montadas no biorreator (Electroforce 5200 BioDynamic, TA Instruments) e mantidas a 37°C em 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> (**Fig. 5**). Cada câmara de cultura, contendo o arcabouço, foi então preenchida com 180 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Transcorridos os tempos de cultivo, as células foram fixadas com PFA a 4%, os núcleos marcados com DAPI e analisados por MVCL. Também foi feita a imunomarcação para a análise da presença de agregana e colágeno II. Após obtenção das imagens, os núcleos das células foram contados usando o *software* Image J.

**Figura 5:** Biorreator Electroforce 5200 BioDynamic. À esquerda, imagem do sistema do biorreator. À direita, imagem durante um experimento em que arcabouços (seta) se encontram montados em câmaras para ensaio de compressão mecânica (inserto).



Fonte: Obtido de TA *Instruments* (à esquerda).

#### 4.4.3.3 Proliferação celular em biorreator em modo de fluxo dinâmico

A fim de qualificar o efeito da taxa de fluxo aplicada (0.4 ml/min) na proliferação celular, realizaram-se ensaios no biorreator em modo de fluxo dinâmico, sem o efeito da força compressiva, tanto para células indiferenciadas

(CTMs) como para as CTMs submetidas à diferenciação em condrócitos. Arcabouços porosos de Poli(PLC-TMC)uretana de 1 X 0,5 cm foram desinfetados com etanol 70%, lavados com PBS e ambientados por 24 horas em DMEM puro à 37°C. As células foram cultivadas nos arcabouços na concentração de  $2 \times 10^4$  células/poço, com trocas periódicas de meio. Após os tempos de cultivo em cultura estática, os arcabouços foram acoplados às câmaras de cultura e as mesmas montadas no biorreator e mantidas a 37°C em 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. Cada câmara de cultura, contendo o arcabouço, foi preenchida com 180 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Transcorridos os tempos de cultivo, as células foram fixadas com PFA a 4% e os núcleos marcados com DAPI. Foi feita a imunomarcagem das amostras e a análise se deu por MCVL. Após obtenção das imagens, foi realizada a quantificação dos núcleos e a expressão de agrecana e colágeno II.

#### **4.5 Análise estatística**

Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA: um critério para comparação nos mesmos tempos e dois critérios para comparação em tempos diferentes. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste de Tukey com  $p < 0.05$  e  $< 0.01$  indicando significância.

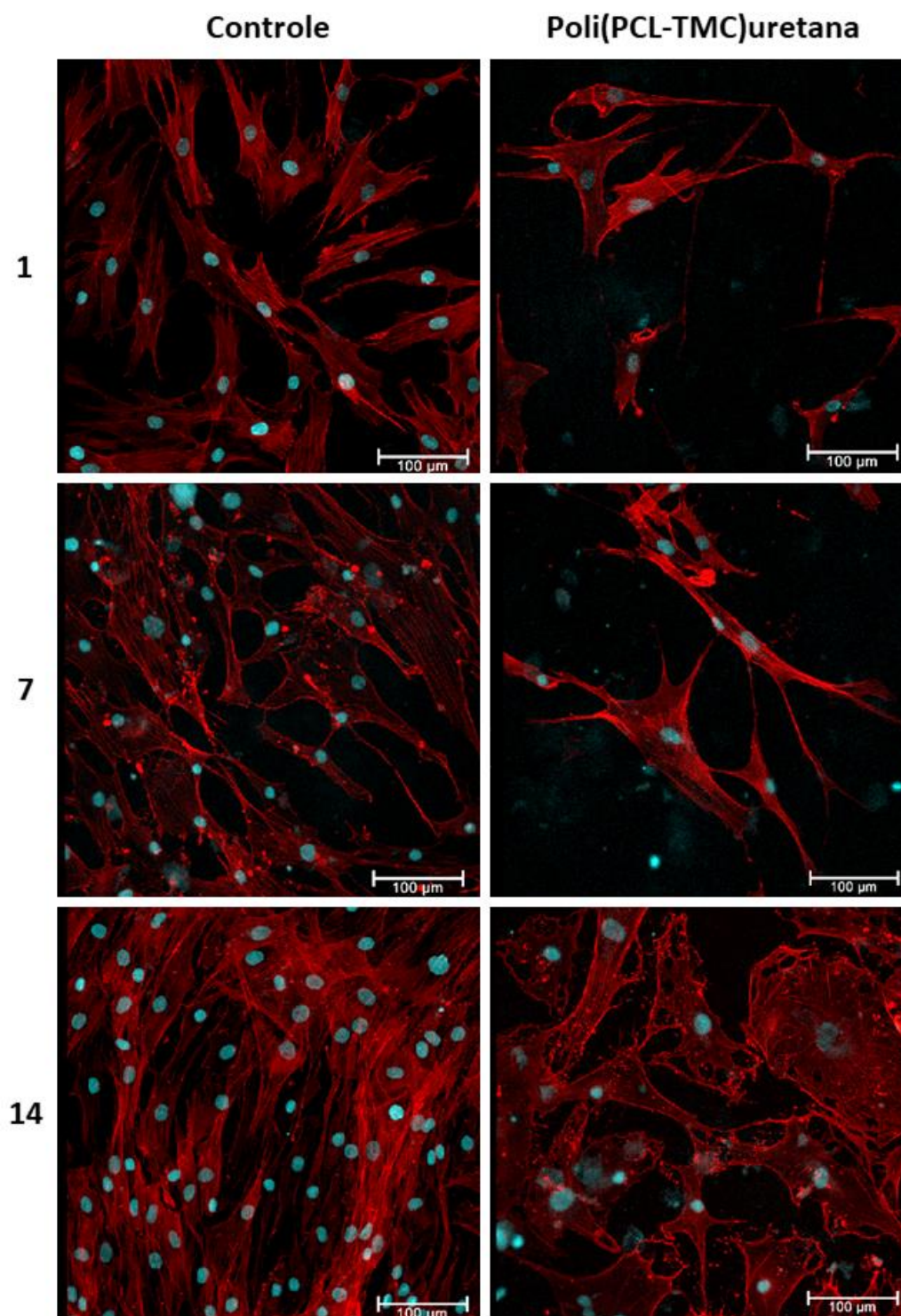


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio de citocompatibilidade – membranas de Poli(PCL-TMC)uretana

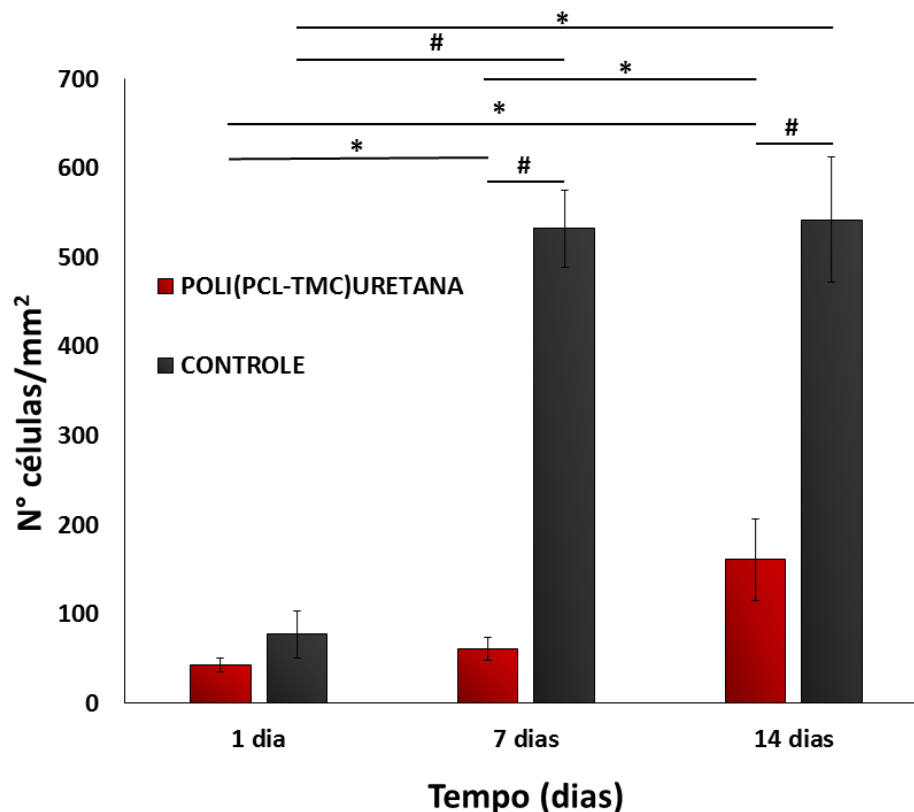
O ensaio de citocompatibilidade das membranas de Poli(PCL-TMC)uretana, após 1, 7 e 14 dias de cultura foram avaliadas por MVCL (**Fig. 6**). Foi possível observar que houve proliferação ao longo do tempo no material e seu respectivo controle. A avaliação da morfologia das CTMs sobre as membranas evidenciou que estas apresentaram formas preferencialmente poligonais fusiformes, com disposição uniforme das fibras tensionais de actina, sendo capazes de aderir, proliferar e espriar na Poli(PCL-TMC)uretana. Peculiarmente, após 14 dias em cultura, as células assumiram um padrão morfológico irregular, espriado porém com aumento dos filopódios. Além disso, o espriamento das células na membrana foi menor quando comparado com o controle. Essa diferença pode estar fundamentada nas principais características que um material deve possuir para mediar a adesão celular, sendo elas: 1) topografia e porosidade do material; 2) grau de hidrofília; 3) estabilidade do material quanto à sua taxa de degradação; 4) carga de superfície; e 5) ângulo de contato (INTHANON et al., 2013), conforme será melhor elucidado no tópico que segue. Mesmo assim, o conjunto de resultados obtidos mostrou evidente afinidade das células ao material pela adesão homogênea das mesmas, mantendo sua capacidade de proliferação ao longo do tempo. Uma vez que os biomateriais são destinados a interagir com o sistema biológico para substituir a matéria viva que perdeu sua função (WILLIAMS, 2009), as membranas e arcabouços produzidos por esses materiais devem ser capazes de apoiar a adesão, manutenção, proliferação e, ocasionalmente, a diferenciação de populações de células específicas (KEANE; BADYLAK, 2014). Dessa forma, dentre os vários requisitos de biocompatibilidade que o material deve possuir, a capacidade de adesão e proliferação diretamente sobre o material é um fator muito importante quando se direciona a pesquisa a uma aplicação de contato direto ou de integração do material ao tecido.

**Figura 6:** Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em membranas de Poli(PCL-TMC)uretana (à direita) e controle em lamínula (à esquerda) em diferentes tempos de cultivo (1, 7 e 14 dias). Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se o citoesqueleto por meio de faloidina conjugada com Alexafluor 647. Barras 100  $\mu\text{m}$ .



A quantificação das CTMs sobre as membranas de Poli(PCL-TMC)uretana e do controle foi obtida a partir da análise por MVCL para os diferentes tempo de cultura. Pôde-se observar que o crescimento celular no dispositivo foi exponencial. Adicionalmente, verificou-se que houve diferença significativa no crescimento celular quando comparado a Poli(PCL-TMC)uretana e o controle, sendo que este apresentou uma quantidade maior de células aderidas, principalmente após 7 e 14 dias (**Fig. 7**).

**Figura 7:** Análise quantitativa da proliferação de CTMs em membranas de Poli(PCL-TMC)uretana realizada por MVCL por meio da marcação dos núcleos com DAPI, após 1, 7 e 14 dias em cultura estática. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos demonstrado por \*  $p < 0.05$  e #  $p < 0.01$ .



De forma geral, a maior parte das reações que ocorrem na biologia acontece entre superfícies, desde interações entre células e sua matriz até as relações entre as células e materiais (CASTNER; RATNER, 2002). Excluindo estímulos externos que afetam a adesão como alterações de temperatura ou o pH por exemplo, sabe-se que durante o contato entre uma célula e um material,

informações são transferidas da superfície do material para a célula, criando um fenômeno sensorial entre ambos. A adesão celular a biomateriais é feita graças a formação de contatos focais das células, que são regiões de interação destas com o substrato onde ocorre o ancoramento destas pontualmente sobre o material. Os pontos de adesão são formados por proteínas transmembrana denominadas integrinas, que se ligam aos filamentos de actina que compõem o citoesqueleto, permitindo a mecanotransdução entre o substrato e a célula, formando um complexo de adesão. A formação deste complexo é essencial na sinalização celular para direcionar a migração, proliferação e diferenciação (GEIGER et al., 2001; SAIF; SAGER; COYER, 2003; HONARMANDI et al., 2011; ZHONG; HE; JI, 2012; DUMBAULD et al., 2013). Como consequência a adesão, a célula dispara uma complexa rede de sinalização como resultado da exploração e detecção da superfície, seja por um material inerte ou bioativo, e adota um comportamento celular de acordo com a sinalização proveniente do biomaterial do qual está aderida. Assim, a atividade metabólica das células pode ser modulada e se tornar mais ou menos ativa em função da superfície de contato imediato. (LOTFI; NEJIB; NACEUR, 2013).

Diversas pesquisas mostram, que tanto a poliuretana, como a policaprolactona e o trimetileno carbonato, apresentam citocompatibilidade (ALPERIN; ZANDSTRA; WOODHOUSE, 2005; GUAN et al., 2005; GUELCHER, 2008; RUIZ; FLANAGAN; MASTERS, 2013; ROCHA et al., 2014; GHORBANI et al., 2015; FUKUSHIMA, 2016), entretanto, uma vez que a literatura em relação à poliuretana à base destes dois polímeros (PCL e TMC) é bastante escassa, algumas de suas propriedades físico-químicas são desconhecidas, bem como a distribuição molecular de seus grupamentos funcionais ao longo da estrutura polimérica. Assim, as diferenças no grau de adesão dependem da natureza do material aplicado, o que explica as diferentes formas de adesão e taxa de disseminação celular em estruturas com superfícies distintas, conforme foi observado nas **Figuras 6 e 7**.

## 5.2 Ângulo de contato

A molhabilidade da superfície do biomaterial é característica fundamental que interfere na adesão celular, e pode ser representada pelo ângulo entre o contorno da superfície da gota e a interface líquido/sólido, denominado ângulo de contato. Após o ensaio, o valor médio obtido foi igual a  $88,00^\circ$  com desvio padrão de  $1,96^\circ$ . limite do que se considera hidrofílico, sendo  $0^\circ < \Theta < 90^\circ =$  hidrofílico e  $90^\circ < \Theta < 180^\circ =$  hidrofóbico (LAM et al., 2002).

Durante a adesão e o espriamento celular estático *in vitro*, as células passam por três estágios distintos enquanto se adaptam à nova superfície: 1) fixação do corpo celular ao substrato; 2) achatamento e disseminação da célula com reorganização do citoesqueleto e 3) formação dos contatos de adesão focal entre a célula e o material (XU; SIEDLECKI, 2007; KHALILI; AHMAD, 2015). Assim, semelhante ao que acontece durante o processo de adesão celular, os estudos de ângulo de contato permitem aferir o grau de hidrofobicidade ou hidrofiliidade dos materiais que, por sua vez, interferem diretamente no processo de adesão destas células.

Diversos trabalhos mostram que a adesão, o crescimento e a proliferação celular são favorecidos quando há hidrofiliidade moderada em vez de substratos hidrofóbicos ou altamente hidrofílicos (ALTANKOV; GRINNELL; GROTH, 1996; GECKELER; WACKER; AICHER, 2000; CHEN et al., 2003). Em contraste, outros autores relatam que as células aderem e proliferam em maior taxa quando cultivadas em substratos com superfícies hidrofóbicas (IKADA, 1994; LEE et al., 1998; WANG; WU; CHEN, 2003; FAUCHEUX et al., 2004; ALLEN et al., 2006). Estes resultados conflitantes podem ser explicados devido ao uso de diferentes materiais, com diferentes topografias e químicas de superfície, alterando a molhabilidade final (BAUER et al., 2008). Ademais, além de ser um processo dependente de tempo, a adesão pode ser influenciada pelo tipo de célula, uma vez que linhagens diferentes aderem à superfícies com ângulos de contato distintos (DOWLING et al., 2011).

Em estudos com fibroblastos, por exemplo, foi demonstrado que estas aderem e proliferam melhor em biomateriais com hidrofiliidade moderada, assim como CTMs que espriaram e apresentaram morfologia típica quando na presença de substratos hidrofílicos com ângulos de contato intermediários,

diferente das semeadas em superfícies altamente hidrofóbicas, que exibiram morfologias contraídas e baixa adesão (HAO et al., 2014). Estes resultados sugerem que as CTMs respondem bem às superfícies hidrofílicas, em termos de disseminação e morfologia global. Conforme revisto por Mittal (2004), as lamínulas Thermanox apresentam molhabilidade de 66°. Comparados com os 88° da molhabilidade da PU, esta diferença infere as modificações na adesão observadas na **Figura 6** entre lamínula e PU. No entanto, tais diferenças não inviabilizaram a adesão e a proliferação das células sobre o material. Logo, apesar do valor aferido pelo presente ensaio estar próximo à 90°, ou seja, limítrofe ao considerado hidrofóbico, os resultados obtidos pelo ensaio de citocompatibilidade demonstraram que as células foram capazes de espriar na presença da poliuretana, com aumento deste espriamento ao longo do tempo, conforme discutido anteriormente.

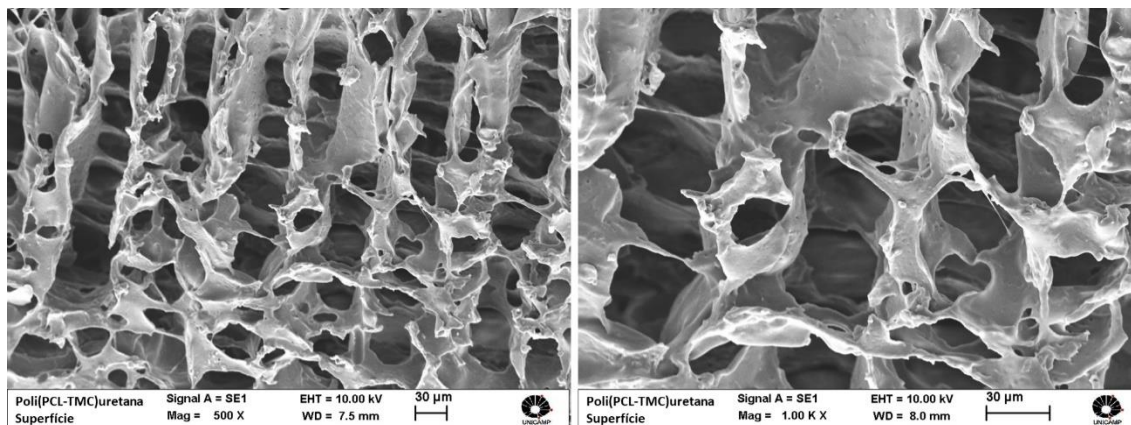
Outro fator a se considerar é a aplicação pretendida. Uma vez que não existe material com todas as características que simulem o tecido biológico, deve-se levar em consideração as propriedades mecânicas de resistência e flexibilidade do material, que fornecem à Poli(PCL-TMC)uretana grande potencial para aplicação em defeitos de regiões osteocondrais.

### **5.3 MEV dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana**

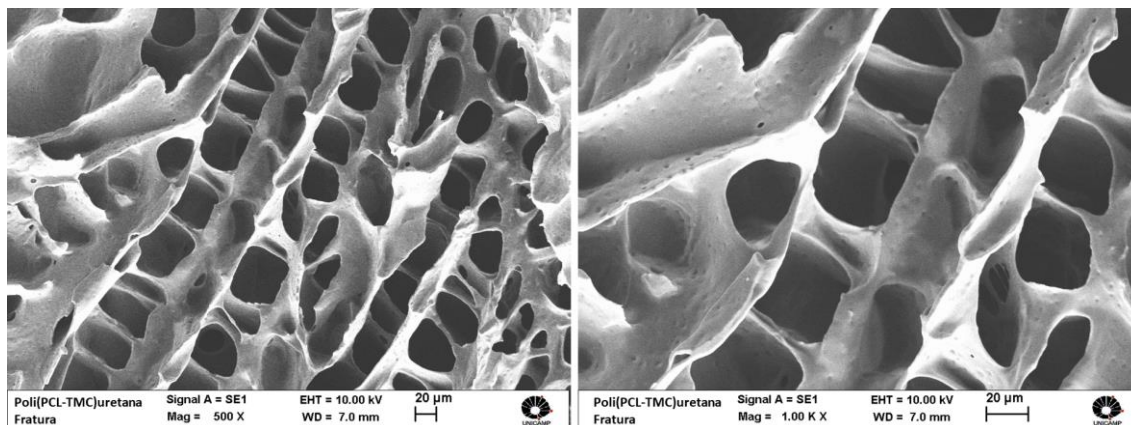
Os arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura, onde verifica-se que os mesmos são porosos e apresentam uma distribuição de tamanho dos poros relativamente homogênea e estão interconectados, tanto na superfície quanto na superfície da fratura (**Fig. 8 e 9**).



**Figura 8:** Eletromicrografias da superfície dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.



**Figura 9:** Eletromicrografias da superfície da fratura dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana.



Sabe-se que a arquitetura de poros em arcabouços poliméricos 3D desempenha um papel crítico na engenharia tecidual, influenciando as propriedades, desempenhos mecânico, físico, químico e biológico do material e consequentemente do dispositivo desenvolvido (JAKUS et al., 2018). O tamanho, forma e distribuição dos poros controlam a resposta celular aos materiais implantados. Do ponto de vista biológico, a porosidade possibilita a integração adequada do material ao tecido, permitindo além da proliferação celular, a angiogênese, vascularização e, finalmente, a reabsorção total e substituição dos implantes por tecidos neoformados (MBARKI et al., 2017). Dessa forma, a interconectividade observada nos arcabouços viabiliza a migração, proliferação e difusão de nutrientes para as CTMs, em toda a extensão do material (HOLLISTER, 2005; KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

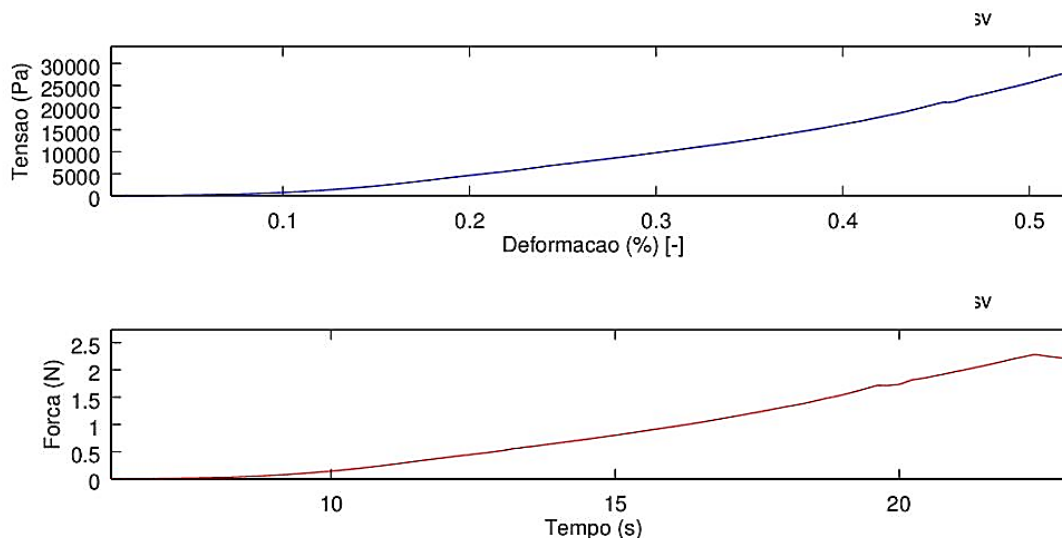
Diversas são as técnicas de obtenção de poros em arcabouços poliméricos, tais como lixiviação de partículas de sal, liofilização de soluções ou emulsões poliméricas, utilização de agente expansor, eletrofiliação, manufatura aditiva, entre outras. A técnica de liofilização, por sua vez, utilizada neste trabalho, associada aos parâmetros de processamento, permitiu a obtenção de arcabouços porosos com porosidade acima de 90%, além de garantir a interconectividade dos poros (CLYNE, 2011; JANIK; MARZEC, 2015), tornando a Poli(PCL-TMC)uretana favorável ao crescimento celular, conforme descrito anteriormente.

#### **5.4 Ensaio mecânico de compressão do arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana**

Para avaliar a resistência à deformação dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana, realizou-se um ensaio de compressão do material no biorreator antes da cultura com CTMs. Este ensaio foi executado a fim de minimizar possíveis danos celulares a longo prazo, quando fosse realizada a cultura nos arcabouços sob forças compressivas, conforme descrito na metodologia. Foi avaliado apenas a fase de deformação elástica de um ensaio mecânico padrão, portanto não foi avaliado a fase de deformação plástica, uma vez que esta fase envolve condições mecânicas que inviabilizam totalmente o crescimento celular no arcabouço. Como resultado, obteve-se que após a aplicação de 2N de força o material sofreu uma deformação maior que 50% (**Fig. 10**). A deformação máxima em torno de 50% foi escolhida em virtude de conseqüente deformação no tamanho dos poros em igual proporção, desde modo a força de 2N foi inicialmente adotada como o limite máximo de deformação suportado pelo material sem afetar, em teoria, o crescimento celular nos arcabouços devido a diminuição do espaço disponível no interior de seus poros.



**Figura 10:** Curva mecânica da deformação do arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana quando submetido à força compressiva de até 2N.



Uma vez que a aplicação pretendida para este material está direcionada a regiões osteocondrais, ou seja, regiões que estão sujeitas à estimulação mecânica quase que constantemente, a avaliação da força máxima suportada pela Poli(PCL-TMC)uretana é de grande importância para o desenvolvimento dos experimentos subsequentes. Apesar da Poli(PCL-TMC)uretana sintetizada apresentar características de memória de forma, oriundas principalmente da policaprolactona (PCL) presente em sua composição (MENG et al., 2007), uma deformação acima de 50% inviabiliza a proliferação celular, uma vez que este resultado está relacionado à diminuição do tamanho dos poros em função da força aplicada, impactando a sobrevivência das células no interior dos arcabouços.

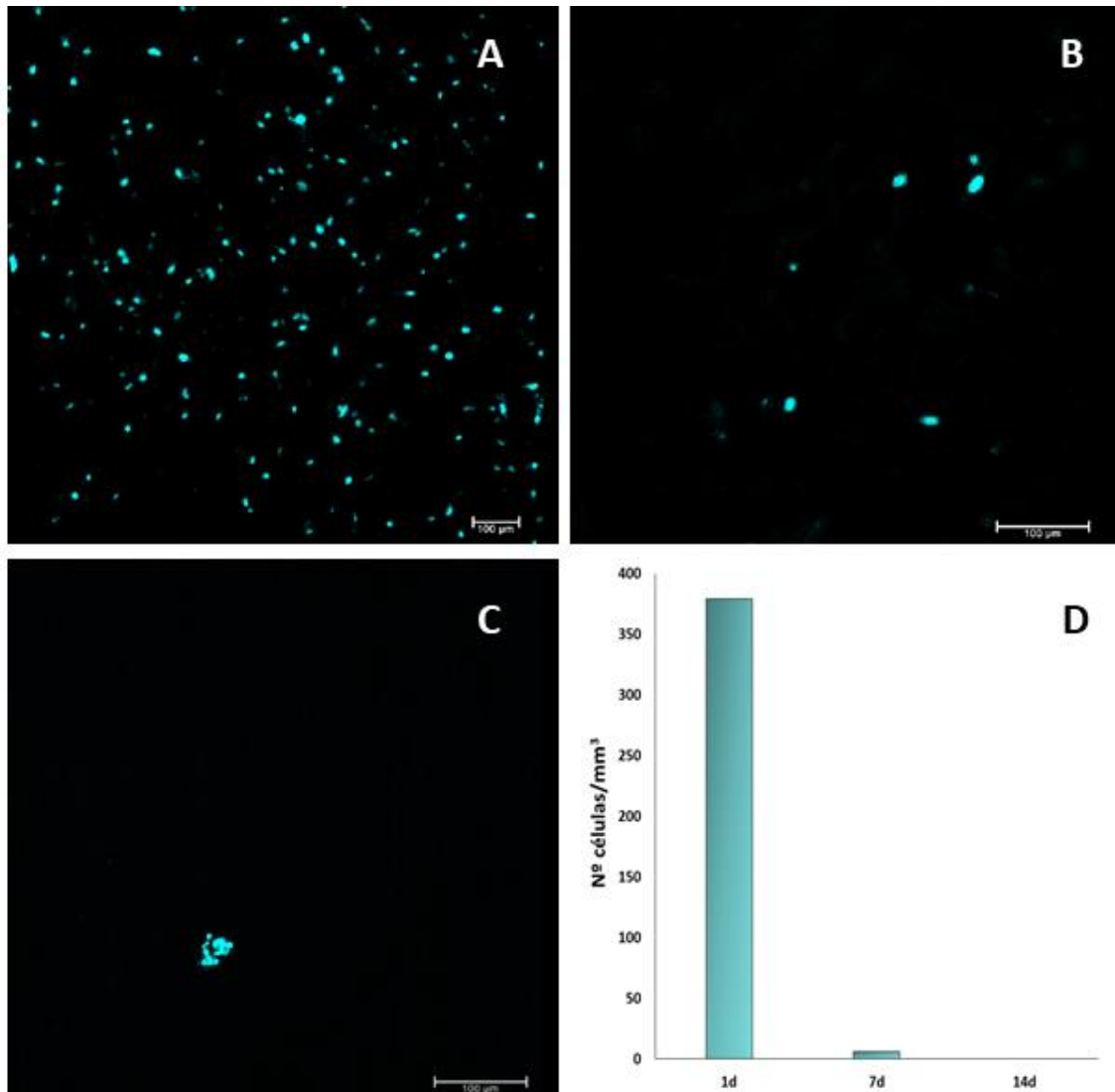
### 5.5 Ensaio em biorreator em modo de fluxo dinâmico e mecânico

A avaliação da proliferação celular sob o efeito de forças dinâmico-mecânicas foi realizada em duas condições distintas: inicialmente com arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana cultivados com CTMs indiferenciadas e na sequência com CTMs diferenciadas em condrócitos.

### 5.5.1 Ensaio com CTMs indiferenciadas sobre arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana

Para o ensaio piloto no biorreator, com CTMs indiferenciadas, adotaram-se os parâmetros de fluxo dinâmico cíclico a 0.4 mL/min e ciclos de força de compressão de 2N a cada 5 segundos. De acordo com os resultados da análise, foi possível observar a presença de células apenas após 1 e 7 dias de cultura, sendo que em 7 dias a quantidade de células presentes nos arcabouços caiu consideravelmente. Após 14 dias de cultura, por sua vez, nota-se um aglomerado de células mortas (**Fig. 11**).

**Figura 11:** Micrografias de varredura confocal a laser identificando a proliferação das CTMs em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana, após 1, 7 e 14 dias em cultura (A, B e C, respectivamente) em biorreator dinâmico/mecânico. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI. Barras 100  $\mu\text{m}$ . Em D, quantificação das CTMs.



Já foi demonstrado pela literatura que a estimulação mecânica incentiva as células-tronco a se diferenciarem em diferentes linhagens, viabilizando a obtenção de diferentes tipos de células (ZHAO et al., 2016). Além disso, no contexto do reparo de tecido cartilaginoso, normalmente esta reparação não exhibe as propriedades estruturais ou biomecânicas do tecido nativo. Assim, biorreatores que simulam um ou mais componentes do ambiente mecânico da cartilagem, emergiram como uma ferramenta primária na engenharia tecidual

(ANDERSON; JOHNSTONE, 2017). Outra descoberta importante foi a do grupo de pesquisa de Grodzinsk (2000), que demonstrou que as células respondem melhor à compressão quando estão em um ambiente dinâmico, diferente do que ocorre em ambiente estático. Por esta razão, optou-se pela aplicação da força compressiva associada à taxa de fluxo dinâmico.

Um dos fatores a ser considerado em relação aos resultados obtidos está relacionado ao intervalo da força aplicada, 5 segundos entre cada compressão. Após uma análise da literatura, verificou-se que grande parte dos estudos aplicam forças compressivas com intervalos maiores entre as compressões. Mauck e colaboradores (2000), por exemplo, cultivaram condrócitos em hidrogéis e os submeteram à compressão por 3 horas, seguidos de intervalos de 1 hora, 5 dias por semana, durante 28 dias. Chowdhury (2003), por sua vez, avaliou o efeito da compressão intermitente no metabolismo celular, com intervalos de 24 horas entre as compressões. Outros estudos também mostraram a aplicação de intervalos mais longos, *i.e.*, 30 min, 1h, 2h, 3h, etc. (HUNG et al., 2004; KISIDAY et al., 2004; KELLY et al., 2008, 2013; BIAN et al., 2010; MESALLATI et al., 2013).

Além desta questão, observou-se também que grande parte dos estudos tiveram tempos de duração menores, desde uma até 180 horas (MAUCK et al., 2007; MOUW; IMLER; LEVENSTON, 2007; BOUGAULT et al., 2008; TSUANG et al., 2008; VILLANUEVA; WEIGEL; BRYANT, 2009; WANG et al., 2009; WISEMAN et al., 2010; KAUPP; WEBER; WALDMAN, 2012).

Outra diferença quanto aos trabalhos encontrados na literatura se refere à seleção do tipo celular. Quase em toda a totalidade dos estudos, faz-se uso de condrócitos. Nesse estudo piloto, entretanto, fez-se uso de CTMs, que diante da estimulação dinâmica e mecânica podem ser induzidas à diferenciação. Durante esse processo, porém, sua população pode diminuir, conforme será explicado adiante, no tópico 5.6.1.

Diante do exposto, o experimento teve duração de 14 dias, logo, devido a frequência da força aplicada (5s entre cada compressão) e do tempo de exposição das células a esta força (14 dias), acredita-se que estes parâmetros escolhidos tenham sido excessivos para que as células pudessem suportar. Deste modo, uma vez que o dispositivo de Poli(PCL-TMC)uretana e o biorreator utilizado apresentam características inovadoras, priorizou-se neste ensaio piloto

pela escolha de parâmetros limítrofes, incluindo a força de compressão de 2N, definida como limite máximo de deformação, e a menor taxa de fluxo admitida pelo equipamento (0,4 mL/min), a fim de avaliar como as CTMs se adaptariam nestas condições para que, a partir destes resultados, fossem otimizados os parâmetros.

A combinação de parâmetros adequados, em termos de tensão e compressão, para obtenção de tecidos funcionais *in vitro* é, ainda, um trabalho em andamento e demanda aperfeiçoamento. Além disso, a necessidade de suplementos químicos como suporte para induzir a resposta celular aos estímulos mecânicos, mostra-se cada vez mais predominante (AGRAWAL; PRAMANIK; BISWAS, 2018). Diante desse cenário, para o ensaio subsequente fez-se uso de meio de diferenciação condrogênico associado à estimulação mecânica, com variação dos parâmetros aplicados neste experimento.

#### 5.5.2 Ensaio com CTMs diferenciadas em condrócitos sobre arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana

Uma vez submetidas as CTMs à diferenciação em condrócitos, durante 21 dias em cultura estática, e após a cultura dinâmico-mecânica no biorreator (7 dias), avaliou-se a expressão de agregana e colágeno II. Para tanto, analisou-se os arcabouços em ambos os tempos de cultivo.

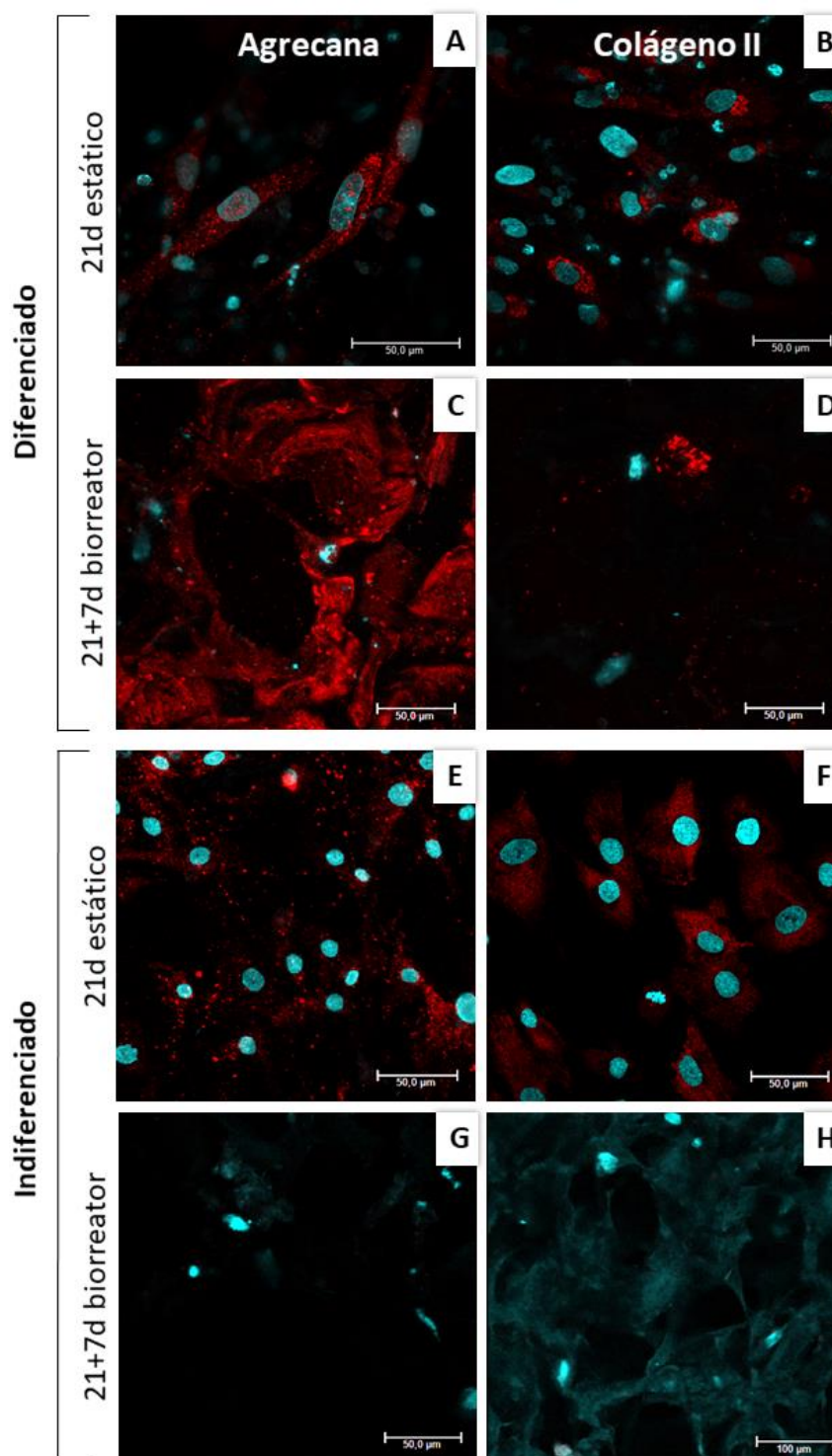
O resultado observado nas micrografias (**Fig. 12, A e B**) demonstra que após os 21 dias de cultura estática, a presença de agregana e colágeno II se mostra evidente. A expressão de agregana se apresenta de forma difusa e dispersa pelo citoplasma da célula acompanhando a morfologia da mesma. Esta morfologia fusiforme associada ao núcleo alongado é característica de condroblastos. O colágeno II, também presente, aparece preferencialmente perinuclear, típico de sua localização quando no complexo de Golgi ocorre a etapa de glicosilação da molécula colágena.

Em relação aos arcabouços que não foram submetidos à diferenciação, após 21 dias observa-se a presença de núcleos celulares representativos de CTMs ainda no estado indiferenciado, porém com nítida expressão de agregana e colágeno II (**Fig. 12, E e F**). Conforme será melhor elucidado nos tópicos que seguem, nos quais este evento se repete, ambas as proteínas de matriz podem

ser expressas pela célula inclusive quando esta ainda se encontra indiferenciada (GROGAN et al., 2007; VINATIER et al., 2009). A presença da agregana, considerada com baixa especificidade ao tipo celular nesta situação, pode também indicar um início de diferenciação espontânea da mesenquimal, dentro de sua capacidade tri-linear. O colágeno II, por sua vez, está presente desde o início da condrogênese, ainda nas células-tronco mesenquimais, o que explica a marcação observada.

Ao se analisar os arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana, após a cultura dinâmico-mecânica, observa-se que apenas na imagem **C** há considerável presença de agregana, porém, sem núcleos celulares evidentes, enquanto que os núcleos remanescentes observados são indicativos de morte celular. Isso indica que as células, enquanto vivas, produziram quantidade significativa de agregana que se depositou sobre o material, entretanto, assim como representado nas demais imagens (**D, G e H**), após a aplicação da força de compressão, as mesmas apresentaram sobrevida curta.

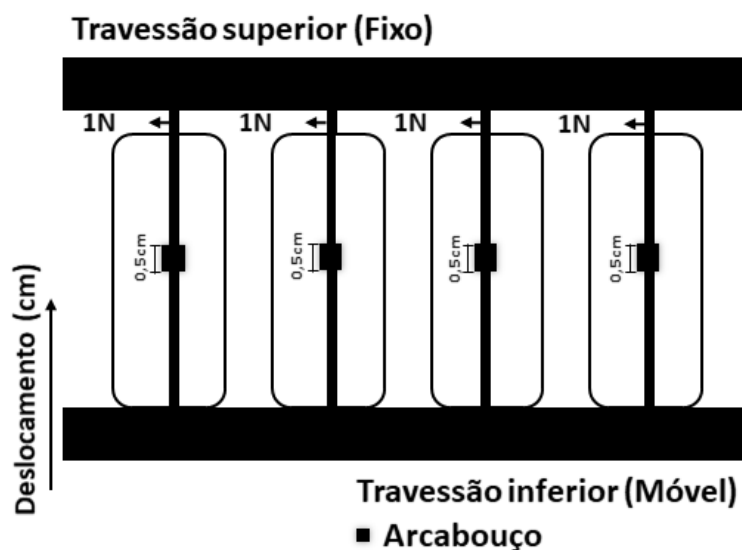
**Figura 12:** Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana em ensaio estático ou dinâmico, submetidas a diferenciação ou não. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para agregana ou colágeno II, conforme especificado na imagem, por meio da identificação de Alexafluor 647.



Apesar de a força aplicada ter sido diminuída pela metade (1N) em relação ao experimento anterior, e as frequências, tanto dos ciclos (60 segundos) quanto do tempo de aplicação (2h por dia, durante 6 dias), terem sido consideravelmente alteradas, o resultado obtido sugere que a Poli(PCL-TMC)uretana entrou em fadiga, diminuindo conseqüentemente o tamanho dos poros e inviabilizando o crescimento celular ao longo do tempo em seu interior.

Para uma melhor compreensão do processo de deformação ao qual o arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana foi submetido, que levou ao processo de fadiga, é importante salientar de que forma se dá a determinação da força a ser aplicada, no âmbito deste biorreator. Como já foi mostrado, o biorreator utilizado é composto por quatro câmaras de cultura as quais são fixadas a dois travessões, superior e inferior. Uma vez posicionados, câmaras e arcabouços, determina-se um valor de deslocamento para o travessão inferior (cm). Esse deslocamento irá comprimir os arcabouços que se encontram entre as colunas da câmara e a força, em Newton, gerada pelo deslocamento do travessão, é detectada por um sensor localizado na base superior (**Fig. 13**).

**Figura 13:** Representação esquemática demonstrando todas as 4 câmaras configuradas para que o deslocamento do travessão gere a resposta de interesse (1N) em cada amostra.

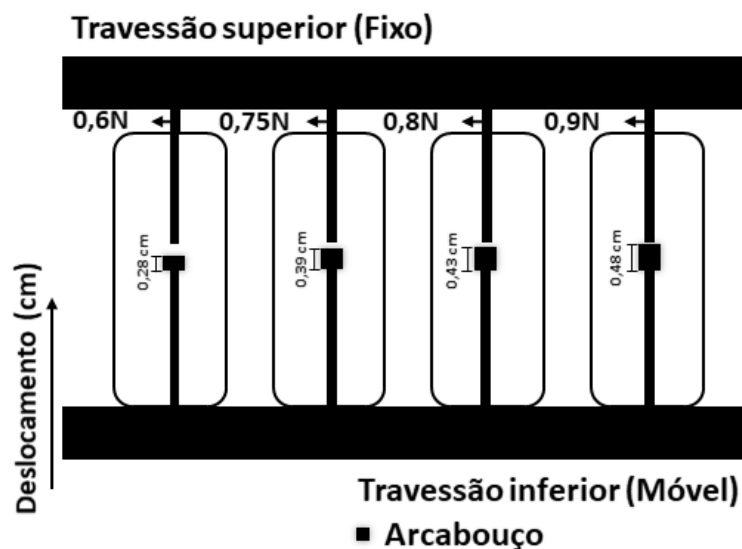


Fonte: Elaborado pela autora



O deslocamento do travessão inferior ao encontro do superior é resultado de uma distância pré-determinada para que a força resultante no arcabouço seja equivalente ao valor de interesse. Conforme o material é submetido às compressões, e no caso deste entrar em processo de fadiga, o que se nota é uma diminuição do seu comprimento inicial. Consequentemente, a força compressiva a qual o arcabouço responde reduz gradativamente ao longo do tempo, confirmando a perda de resistência do mesmo (**Fig. 14**).

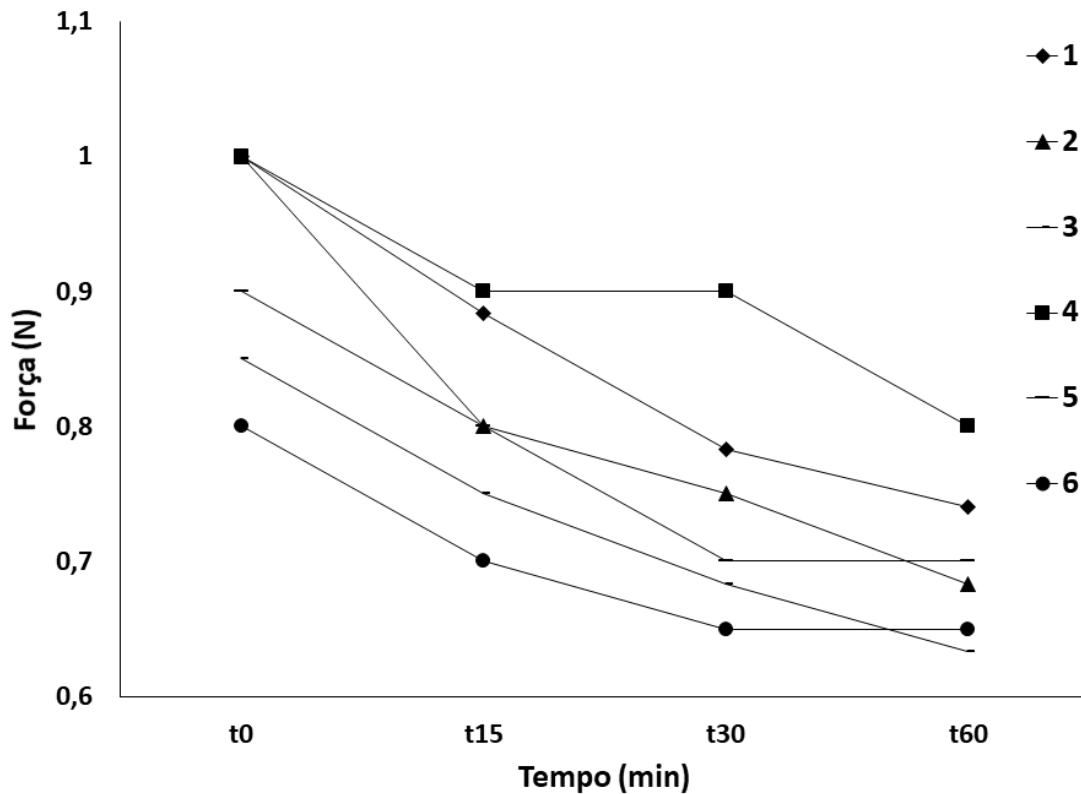
**Figura 14:** Representação esquemática demonstrando todas as 4 câmaras configuradas inicialmente para 1N (conforme o modelo anterior) respondendo individualmente com valores menores para cada amostra.



Fonte: Elaborado pela autora

O comportamento esquematizado pela figura anterior corresponde ao observado no arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana, a partir da avaliação de sua deformação em razão da força aplicada, durante a cultura celular (**Fig. 15**).

**Figura 15:** Avaliação por curva de tempo (0 a 60 min) da deformação do arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana em razão da força aplicada.



Como é possível observar, nos primeiros dois dias de aplicação da força (1 e 2) a Poli(PCL-TMC)uretana respondia à 1N de força, conforme estipulado para este ensaio. No terceiro dia, entretanto, nota-se que o material, já levemente desgastado pela compressão mecânica, respondeu apenas à 0,85N (3), indicando perda de resistência da poliuretana que naturalmente refletiu na diminuição dos poros ao longo de sua estrutura.

Esse comportamento mostra-se ainda mais acentuado ao analisar a compressão durante um período de uma hora. Tomando-se como exemplo o dia 1, nota-se uma queda brusca da resposta durante o período observado. Inicialmente respondendo à 1N, conforme já discutido, ao final desta hora o material respondia a apenas 0,75N. Este padrão repete-se nos demais dias (2 e 3), sendo o tempo de 60 min no terceiro dia o mais crítico em relação à resposta

à compressão (0,63N). Este desempenho comprova que a Poli(PCL-TMC)uretana cede à medida que a sujeição à compressão aumenta.

Após quatro dias sem aplicação de nenhuma força compressiva, apenas a manutenção da taxa de fluxo de 0.4 mL/min, voltou-se a aplicar a força dentro dos mesmos parâmetros. O que se observou após este intervalo, foi que o material voltou a responder à 1N de força **(4)**, semelhante ao início do ensaio, o que demonstra que o arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana foi capaz de retornar ao estado original mantendo relativa memória-de-forma, característica presente neste material devido às suas propriedades oriundas da presença do polímero PCL na estrutura. Essa propriedade, entretanto, se perdeu uma vez que ao final do ciclo de 1h sob força mecânica, a resposta do material foi de 0,8N. No quinto dia **(5)** o padrão de comportamento observado ao longo dos dias se repetiu, com a resposta inicial da poliuretana em 0,9N e ao final de 1h sob força mecânica foi de 0,7N. O sexto e último dia indicou a menor resposta à compressão (0,8N) em  $t_0$  (linha 6 na figura 15) antes de disparar o início da força, evidenciando a deformação mais acentuada do material ao final do experimento, o que caracteriza um processo de fadiga.

Portanto, de acordo com o conjunto de resultados obtidos, compreende-se que a apenas a alteração dos parâmetros de compressão mecânica não foi suficiente para garantir a sobrevivência celular. Dessa forma, estes resultados sugerem que alterações nas propriedades de resistência mecânica à compressão da Poli(PCL-TMC)uretana devem ser feitas de forma a elucidar esse comportamento.

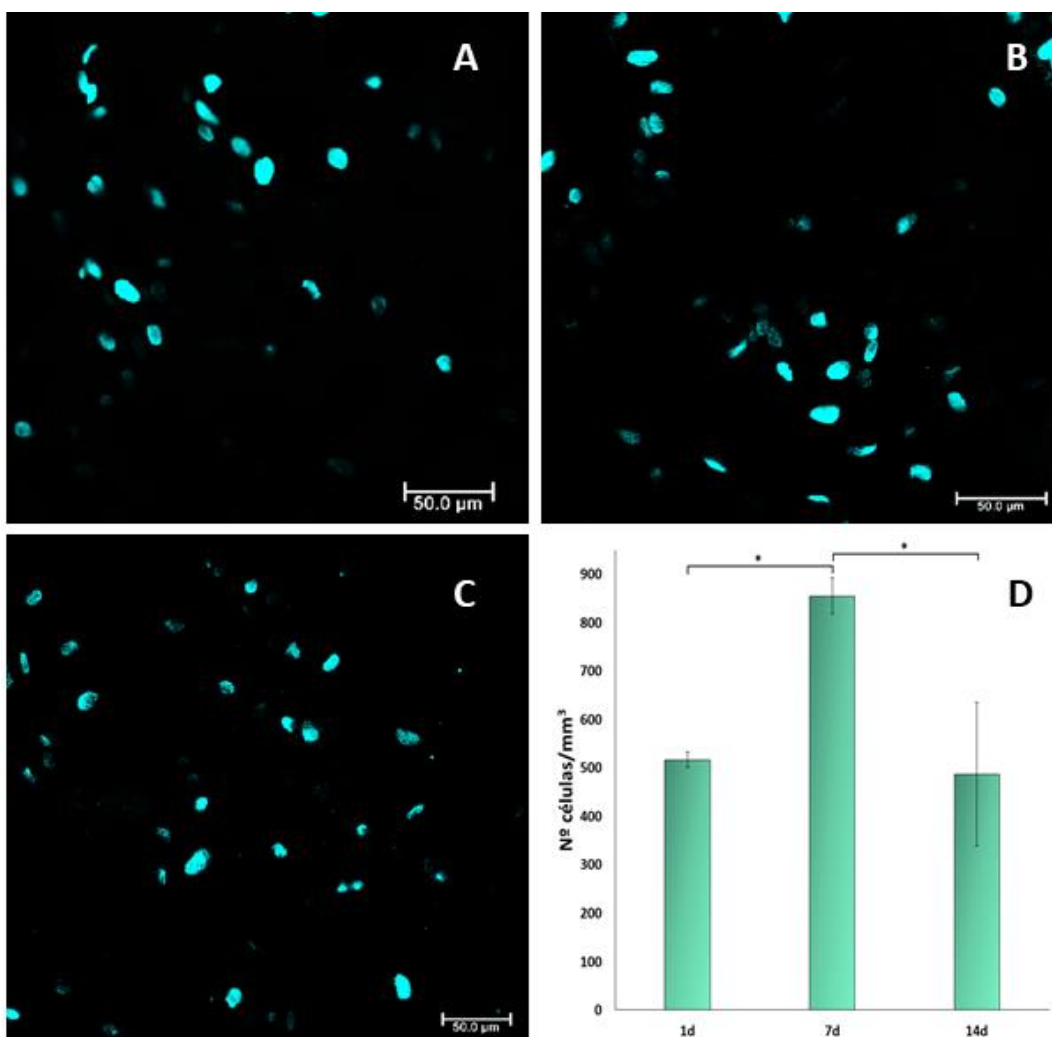
## **5.6 Ensaio em biorreator em modo de fluxo dinâmico**

De acordo com os resultados obtidos pela análise da influência da estimulação mecânica no crescimento celular, realizaram-se ensaios no biorreator apenas com o modo de fluxo dinâmico, a uma taxa de 0,4 mL/min, sem forças de compressão, a fim de conjecturar se a morte celular ocorrida nos ensaios anteriores poderia ter sido causada pela força compressiva.

### 5.6.1 Ensaio com CTMs indiferenciadas sobre arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana

Através da MVCL, várias fatias ópticas foram obtidas para avaliação da distribuição espacial das células nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana (**Fig. 16**). As análises demonstraram a presença de células durante o período experimental e a profundidade máxima onde foram encontrados núcleos de células foi de 100 $\mu$ m. Portanto, este foi o limite estabelecido para reconstrução das imagens e quantificação das células.

**Figura 16:** Micrografias de varredura confocal a laser observadas após 1, 7 e 14 dias de cultura em biorreator com fluxo dinâmico (**A**, **B** e **C**, respectivamente) em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI. Barras 50  $\mu$ m. Em **D**, quantificação das CTMs. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatística entre os grupos demonstrado por \*  $p < 0.01$ .



Estudos indicam que os sistemas de cultura de tecidos que fornecem condições dinâmicas de fluxo estimulam positivamente o comportamento das células. Quando as construções celulares 3D são cultivadas em cultura estática, as células na superfície externa são viáveis e proliferam ativamente, enquanto as células no interior da construção podem ser menos ativas ou necróticas (BIRMINGHAM et al., 2013; WANG et al., 2013; VETSCH; MÜLLER; HOFMANN, 2015). Dessa forma, os sistemas de cultura de tecidos que fornecem condições dinâmicas de fluxo são projetados para aumentar a troca de nutrientes e o crescimento celular *in vitro*, além de serem capazes de mimetizar o ambiente *in vivo* e ainda fornecer estimulação mecânica induzida pelo fluxo de fluido (CARTMELL et al., 2003; GOMES et al., 2003; STIEHLER et al., 2008; PLUNKETT; PARTAP; O'BRIEN, 2010; LIN; MEQUANINT, 2017).

Ainda não é consenso na literatura qual a melhor taxa de fluxo para proliferação das células, uma vez que há diversos fatores que podem afetar o crescimento celular. Em determinado estudo, por exemplo, verificou-se que taxas de fluxo variadas exibiram níveis de marcadores que indicavam diferenciação celular (3 mL/min), entretanto, tais níveis tornaram-se inibitórios quando as células foram submetidas à taxas de fluxo mais altas, i.e., 9 mL/min (LI et al., 2009). Outros ainda, apontam que algumas das melhores taxas de fluxo estejam na faixa de 0.01 mL/min e 0.3 mL/min (GLOWACKI; MIZUNO; GREENBERGER, 1998; BANCROFT et al., 2002; CARTMELL et al., 2003). Apesar da cultura dinâmica com perfusão apresentar uma série de vantagens, nos estágios iniciais da semeadura das células nos arcabouços as interações entre as células e o biomaterial ainda não são fortes o suficientes e as mesmas podem se soltar da superfície ao receberem o fluxo dinâmico (SCAGLIONE et al., 2006; SCHLIEPHAKE et al., 2009; ZHANG et al., 2010; BEŞKARDEŞ et al., 2018b). Dessa forma, além de favorecer o processo de diferenciação, a realização de pré-cultura estática antes do ensaio dinâmico aumenta a viabilidade e o número de células aderidas. Neste trabalho optou-se pelo período de pré-cultura por 7 dias baseando-se em estudos anteriores que apontaram diferenças significativas entre períodos curtos, i.e 24 horas ou 3 dias, quando comparados a períodos mais longos, i.e 6 dias, em relação a resposta celular à perfusão, adesão, infiltração e proliferação das células no interior do arcabouço (PLUNKETT; PARTAP; O'BRIEN, 2010). Assim, nesse estudo foi possível

demonstrar que a pré-cultura estática e a taxa de fluxo aplicada de 0.4 mL/min resultou de forma positiva em relação aos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana, permitindo a proliferação e migração das células no interior do arcabouço, ao longo do tempo.

Após 14 dias de cultura também foi possível verificar um declínio na quantidade de células nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana (**Fig. 16, D**), o que pode ser explicado pelos fatores descritos abaixo.

Várias evidências podem ser encontradas na literatura em relação à sensibilidade das CTMs ao seu ambiente, estímulos externos, propriedades físico-químicas e topografia dos arcabouços, influenciando na proliferação, propriedades morfológicas e expressão gênica destas células (CARTMELL et al., 2003; LI; XIE, 2005; KAI et al., 2016; BEŞKARDEŞ et al., 2018; MOBASSERI et al., 2018). Desse modo, acredita-se que devido ao estímulo fornecido pelo fluxo dinâmico, as células foram instigadas a se proliferar mais rapidamente e talvez iniciarem um processo de diferenciação, conforme já observado na literatura (BANCROFT et al., 2002; SIKAVITSAS et al., 2005; ZHAO; MA, 2005; VOLKMER et al., 2008; YANG et al., 2009; GRAYSON et al., 2010; ALVES DA SILVA et al., 2011; YEATTS; FISHER, 2011). Nesse contexto, sabe-se que a população de CTMs geralmente sofre uma diminuição rápida à medida que a diferenciação espontânea ocorre (MCMURRAY et al., 2011), o que pode explicar a queda na quantidade de células, observada após 14 dias de cultura.

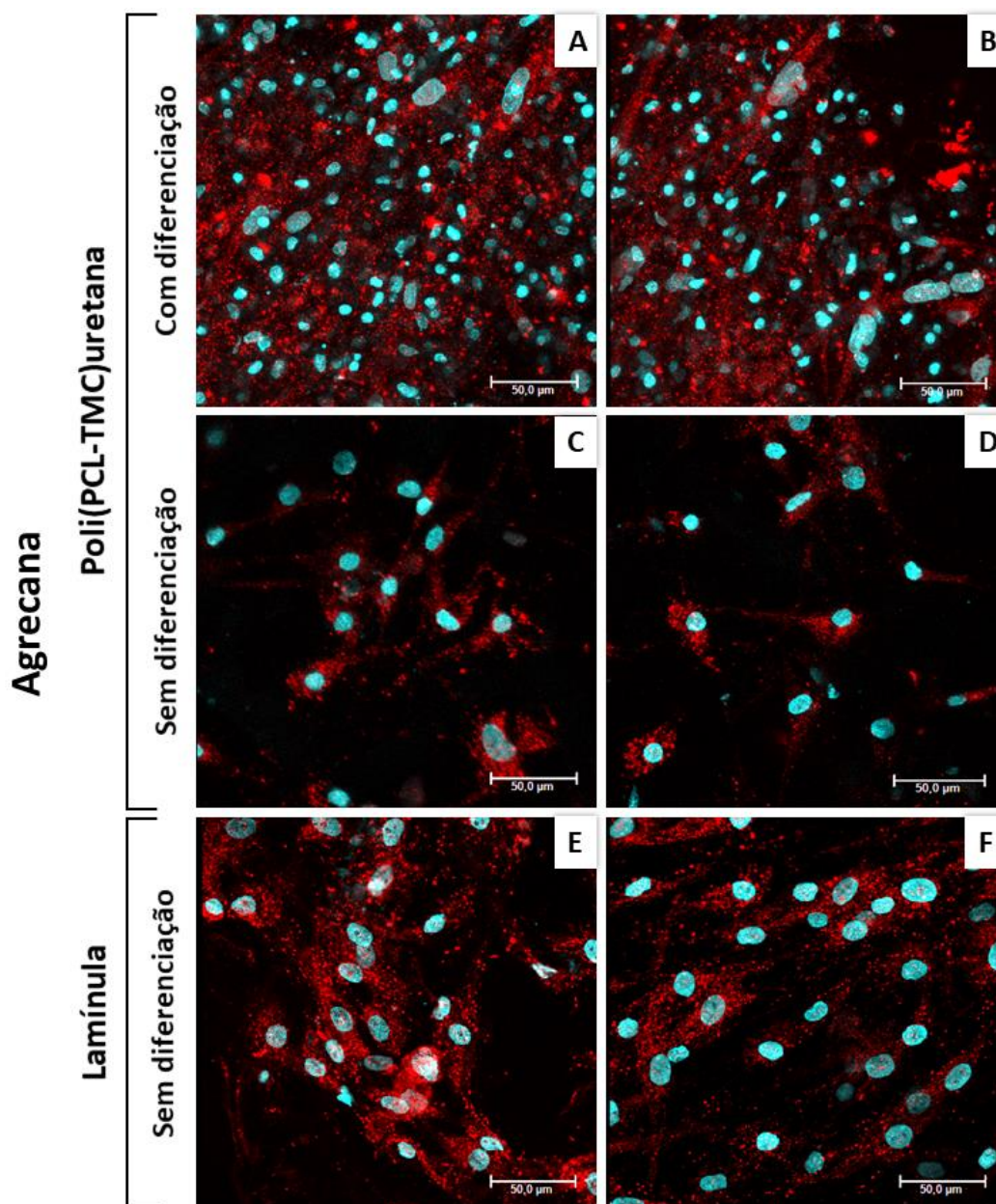
Além disso, a partir da análise dos núcleos nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana pode-se perceber que estes não apresentam características de células com indício de morte celular. Durante a morte celular, o encolhimento celular e a picnose são visíveis por microscopia. Com este encolhimento, as células são de tamanho menor, e a picnose, resultado da condensação da cromatina, resulta em núcleos completamente condensados que se segregam em vários fragmentos (HÄCKER, 2000; ELMORE, 2007). Sendo assim, nota-se que os núcleos resultantes da análise de microscopia confocal, em todo o período experimental, não apresentaram diferenças morfológicas entre si (1, 7 e 14 dias) e nem semelhanças com as características descritas acima.

### *5.6.2 Ensaio com CTMs diferenciadas em condrócitos sobre arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana*

As CTMs foram submetidas à diferenciação em condrócitos durante 21 dias em cultura estática. Após este período foram submetidas a cultura dinâmica no biorreator por 7 e 14 dias sem os fatores de diferenciação os quais estavam presentes durante os 21 dias do período de cultura estática. Ao final de 7 e 14 dias no biorreator avaliou-se a expressão de agrecana e colágeno II nos arcabouços. Portanto, as amostras foram analisadas em três tempos de cultivo, ou seja, após 21 dias, após 21 + 7 dias e após 21 + 14 dias.

A partir da MVCL dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana, após 21 dias, foi possível observar a presença de agrecana e colágeno II, que são as principais e mais abundantes moléculas constituintes da MEC do tecido cartilaginoso (**Fig. 17 e 20**). A identificação destas moléculas demonstra que houve condrogênese e a quantificação destas indica maior densidade de células diferenciadas em condrócitos ou condroblastos (BARRY et al., 2001).

**Figura 17:** Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21 dias de cultura estática, submetidas a diferenciação ou não. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para agrecana por meio da identificação de Alexafluor 647.



A análise das micrografias demonstrou predominância de núcleos de morfologia mista. Os núcleos esféricos e condensados nos arcabouços submetidos à diferenciação (**Fig. 17, A e B**), indicam características morfológicas típicas de condrócitos. Além destes, a presença de núcleos maiores, alongados



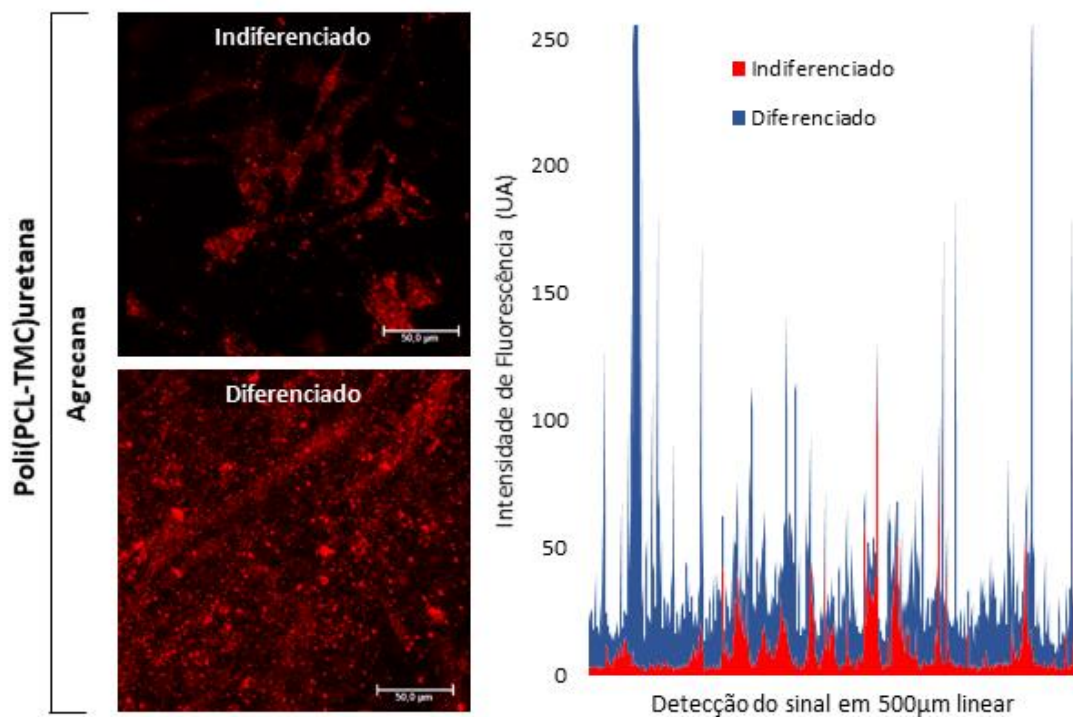
e descondensados indicam fenótipo para condroblastos. Esta apresentação é clássica das CTMs quando em processo de diferenciação, as células diminuem seus filopódios irregulares assumindo fenótipo fibroblastóide regular com núcleo descondensado inicialmente, enquanto que em estágios mais tardios assumem morfologias mais esféricas com núcleos condensados (SACCHETTI et al., 2016).

Em relação às células que não foram submetidas à diferenciação, tanto na Poli(PCL-TMC)uretana (**C e D**) quanto na lamínula (**E e F**) verificam-se núcleos com aspectos morfológicos característicos de CTMs, semelhante ao observado no ensaio anterior com as células indiferenciadas.

No que se refere à agregana, nota-se uma expressão significativa dispersa por toda a estrutura do material, com organização indicativa de cartilagem, nas amostras submetidas à diferenciação. Nota-se ainda, em algumas regiões cuja marcação se apresenta bastante intensa, a formação de aglomerados densos de matriz (**Fig. 17, A e B**). Nas imagens **C** à **F** percebe-se a presença de marcação e embora considerada pouco específica uma vez que as células não apresentam indícios morfológicos claros de diferenciação fenotípica, devido a apresentação dos núcleos ser homogênea e descondensada. Portanto, dentro do conjunto de células observadas na figura 17, foi observado que há uma dispersão tanto de condrócitos e condroblastos sendo que ambos estão expressando agregana.

A partir da comparação qualitativa da expressão de agregana, constata-se, conforme esperado a partir da análise das micrografias, uma expressão intensa e significativa de agregana nas células que receberam estímulos de diferenciação quando comparadas às CTMs indiferenciadas (**Fig. 18**).

**Figura 18:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agregcana, tanto nos arcabouços submetidos à condrogênese (diferenciado) quanto no material não submetido (indiferenciado), após 21 dias em cultura estática.

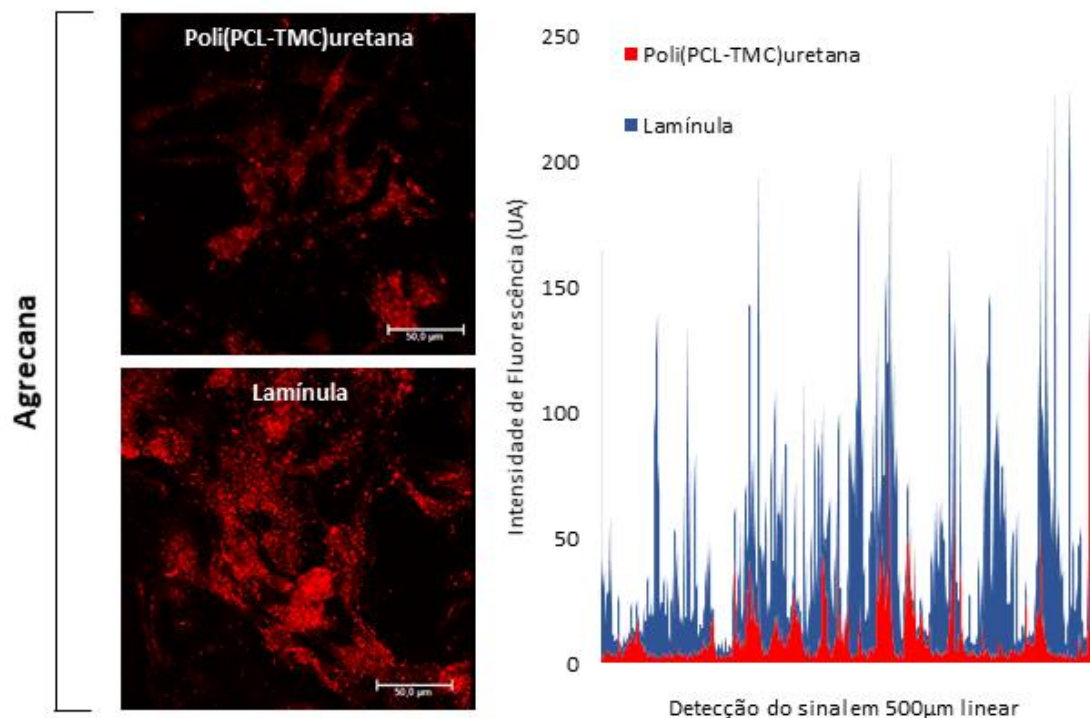


Apesar de presente, a marcação positiva para as células que não receberam estímulos de diferenciação, não é indicativa de que estas estejam se diferenciando. Uma vez que as CTMs são oriundas de tecido conjuntivo, elas são capazes de sintetizar proteínas de matriz, visto que este tecido é caracterizado por abundante material intercelular (SETAYESHMEHR et al., 2019). Além disso, mesmo que estejam em um processo de diferenciação espontânea, não é possível afirmar que estão se diferenciando especificamente em condrócitos, uma vez que a agregcana encontra-se presente também em outros tipos celulares, tais como os fibroblastos, por exemplo (TRACY; MINASIAN; CATERSON, 2016).

Assim, a condição marcante apresentada por este resultado no ensaio de diferenciação não está relacionada única e exclusivamente à expressão desta marcação, mas a um conjunto de fatores, entre eles, a apresentação fenotípica das células, como também o somatório de outras marcações, conforme será apresentado posteriormente.

Na quantificação da marcação inespecífica entre as diferentes superfícies, Poli(PCL-TMC)uretana e lamínula, percebe-se uma maior expressão de agrecana na superfície da lamínula em relação ao material (**Fig. 19**).

**Figura 19:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana, tanto nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana quanto na superfície da lamínula, ambos não submetidos à condrogênese, após 21 dias em cultura estática.



Este contraste, por sua vez, está associado às diferenças de superfície. Entre estas diferenças inclui-se o fato de que o arcabouço de Poli(PCL-TMC)uretana é tridimensional, diferente da lamínula, cujas células crescem em monocamada sobre uma superfície ideal. Entre as características que favorecem o crescimento celular nas superfícies das lamínulas, estão a topografia (lisa e homogênea), o tratamento elétrico (superfície eletricamente positiva) e químico (diminuição da tensão superficial da molécula de água aumentando a hidrofília) (MITTAL, 2004). Outra consequência destes fatores, é a adsorção gradativa dos componentes do meio e principalmente do soro fetal bovino que ao longo do tempo forma uma cobertura de moléculas presentes no soro como a albumina e fibronectina, além de moléculas do meio como aminoácidos essenciais, assim,

esse conjunto de moléculas, que vão sendo adsorvidas com o tempo, formam um fator somatório a longo prazo que favorece a adesão. Esse fenômeno ocorreu também nos arcabouços, porém não foi possível comparar o quanto de moléculas foram adsorvidas em sua superfície visto que por ser ainda um material novo, futuras análises físico-químicas deste material precisam ser realizadas.

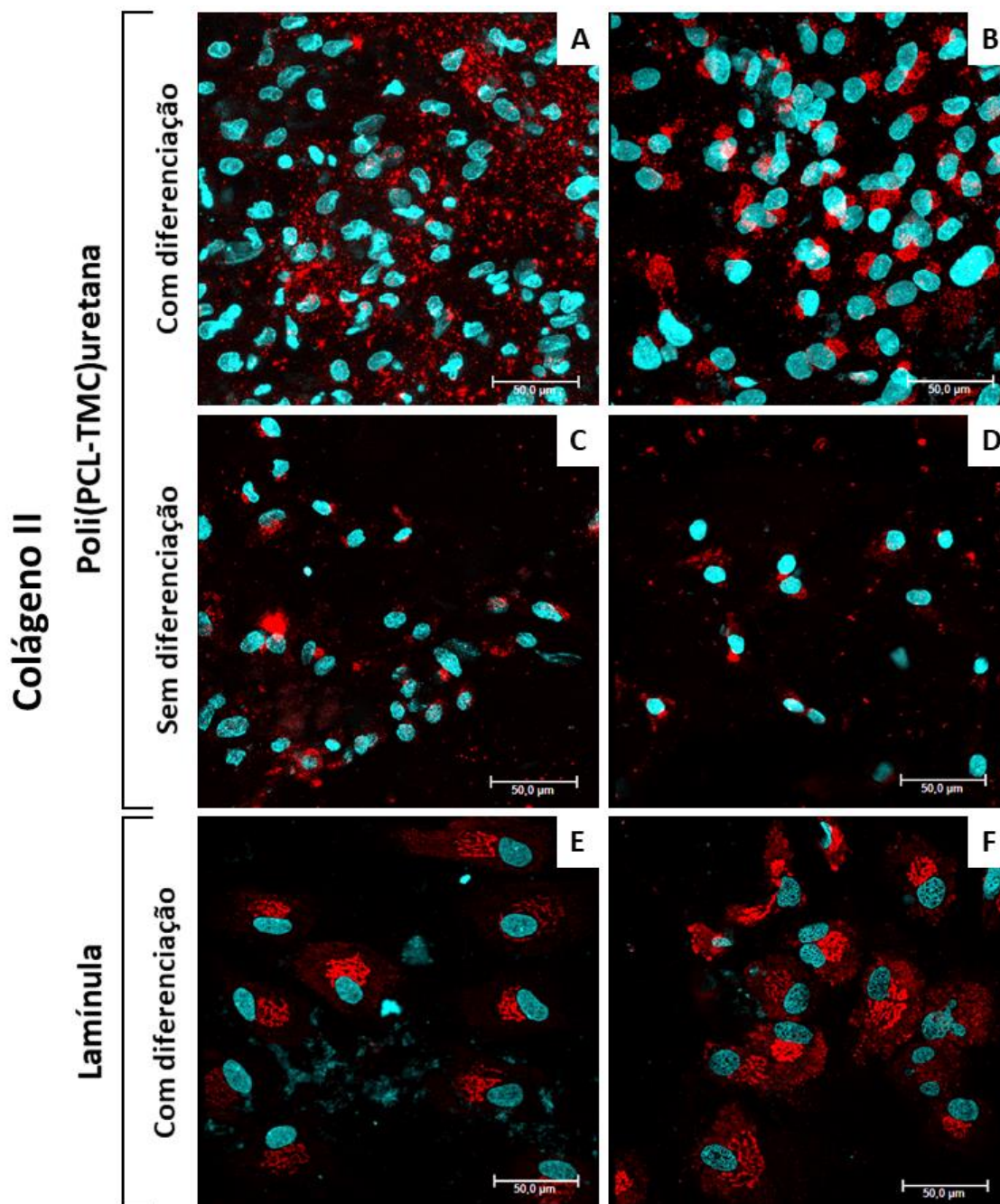
Assim, os resultados obtidos com a lamínula apenas representam um controle do método, onde fica evidente que a Poli(PCL-TMC) uretana, apesar de possuir características que possam favorecer menos a adesão e conseqüentemente a expressão de proteínas de matriz, apresenta todos os requisitos essenciais que definem a biocompatibilidade de um material, tais como: atividade metabólica, adesão, proliferação e diferenciação, entretanto em proporções diferentes ao oferecido pela superfície da lamínula. Isto, no entanto, não significa que o material não é apropriado para a aplicação pretendida. De maneira oposta, a estrutura tridimensional associada às características de tenacidade e flexibilidade, conjuntamente com as propriedades biológicas acima citadas, garantem à Poli(PCL-TMC)uretana excelente panorama para aplicações como implantes em regiões de articulação.

Foi avaliada também a expressão do colágeno II nas mesmas condições do ensaio anterior, ou seja, após 21 dias de cultura estática com e sem suplementação de fatores de condrogênese (**Fig. 20, A-D**).

Nos resultados obtidos, para as células diferenciadas, observa-se tanto a presença de condrócitos como condroblastos, estes em maior quantidade dependendo da região da amostra, o que demonstra que as células estão em ativo processo de diferenciação. Em relação às amostras de poliuretana sem diferenciação, os núcleos apresentam características morfológicas de CTMs (**C e D**), conforme observado no ensaio anterior para o grupo sem diferenciação.

Por fim, observando o controle em lamínula com as células submetidas à diferenciação, notam-se núcleos predominantemente condroblásticos, ou seja, núcleos maiores, mais alongados e descondensados (**E e F**).

**Figura 20:** Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21 dias de cultura estática, submetidas a diferenciação ou não. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, enquanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para colágeno II por meio da identificação de Alexafluor 647.



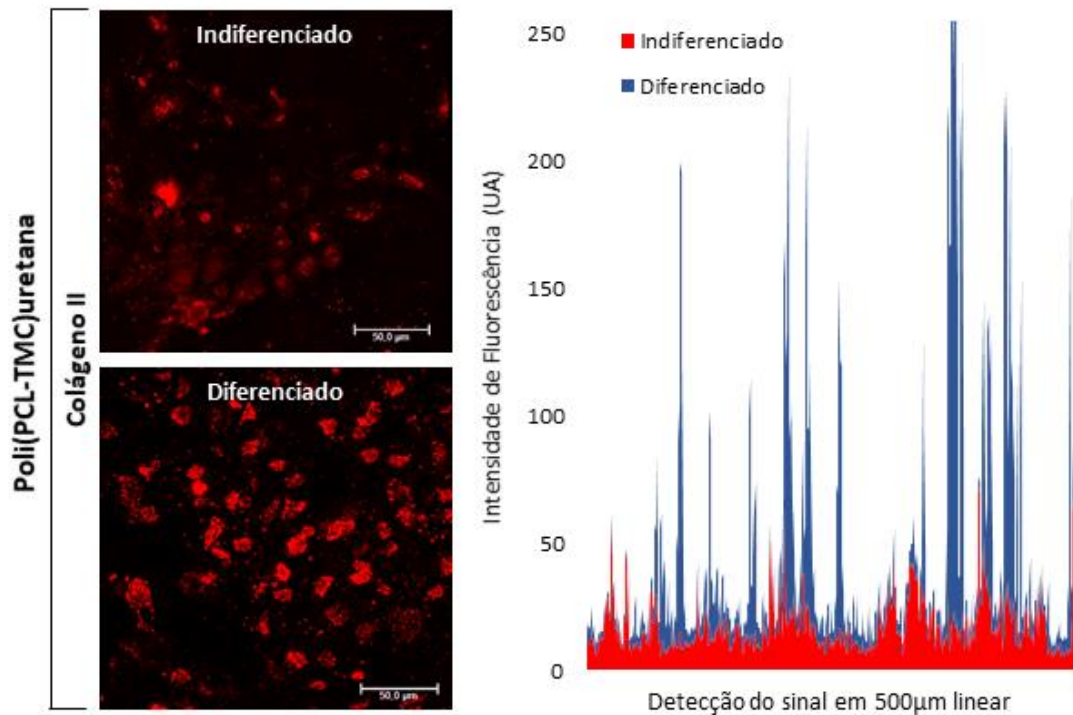
No que compete à marcação do colágeno, percebe-se uma expressão mais acentuada e difusa, típica de matriz, nas amostras de Poli(PCL-TMC)uretana quando na presença de células com núcleos mais condensados

ou quando há formação de uma estrutura semelhante a um blastema, como é possível observar em algumas regiões da **Fig. 20, A**. Nestas células, ocorre uma intensa sinalização parácrina em virtude de estímulos externos, ou seja, quando estão formando o blastema, células justapostas sinalizam entre si além da indução oriunda dos fatores de diferenciação adicionados ao meio. Logo, elas se organizam em um propósito comum direcionando a diferenciação em um tipo celular específico, neste caso, em condrócitos. Esse comportamento de formação de blastemas, por sua vez, é típico de células mesenquimais (STAPPENBECK; MIYOSHI, 2009). Nos condroblastos, entretanto, a expressão e organização do colágeno II apresenta-se preferencialmente perinuclear, evidenciando as moléculas de colágeno recém-sintetizadas no citoplasma, no complexo de Golgi (**Fig 20, B, E e F**). Nas imagens **E e F**, além da marcação perinuclear, nota-se a apresentação difusa da proteína ocupando todo o citoplasma, antes de ser exocitada.

Em relação à quantificação, nota-se a presença de expressões pontuais em poucas células no grupo indiferenciado, diferente do grupo sob diferenciação onde se vê a marcação em todas as células. Observando os picos de intensidade de fluorescência é possível perceber essa distinção (**Fig. 21**).

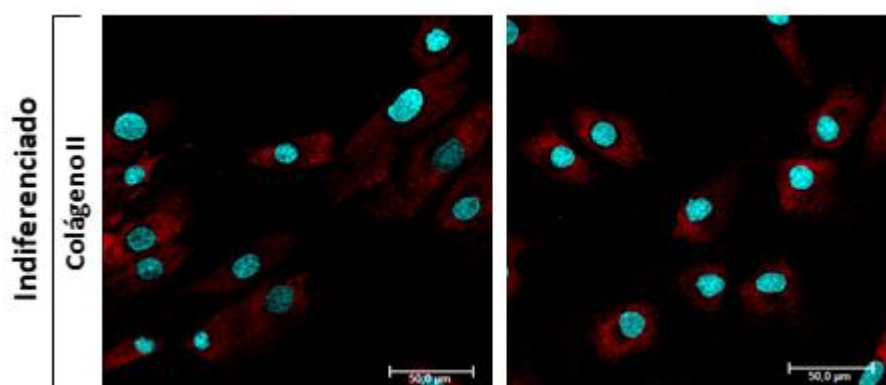


**Figura 21:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para colágeno II, tanto nos arcabouços submetidos à condrogênese (diferenciado) quanto nos arcabouços não submetidos (indiferenciado), após 21 dias em cultura estática.



A presença da marcação de colágeno mesmo que modesta, no grupo indiferenciado, pode ser explicada pela presença de colágeno tipo II já nos primeiros estágios da condrogênese, incluindo as CTMs (RICHARDSON et al., 2016). Uma vez que a morfologia nuclear destas células se mostra característica de CTMs, também não se pode afirmar que estas estão de fato diferenciadas. Assim, de forma a esclarecer a expressão observada neste grupo, após um ensaio com duração de 1 dia em lamínula, foram marcadas as células com os anticorpos anti-colágeno II e mesmo em uma cultura de pouco tempo o mesmo esteve presente (**Fig. 22**), corroborando com nossos resultados.

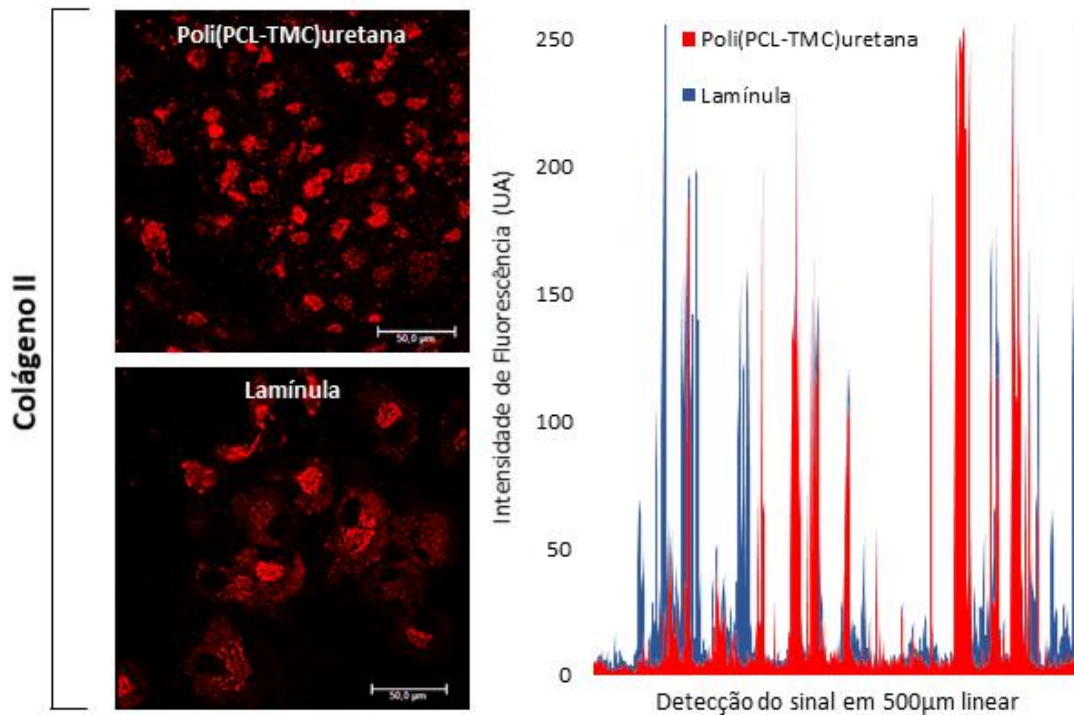
**Figura 22:** CTMs marcadas para colágeno II após 1 dia em cultura sem indução de diferenciação.



Comparando-se a expressão de colágeno na Poli(PCL-TMC)uretana e lamínula, sendo ambos diferenciados, nota-se uma intensidade maior em relação à poliuretana, exibindo expressão mais difusa em quase toda totalidade da superfície analisada (**Fig. 23**).



**Figura 23:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para colágeno II, tanto nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana quanto na superfície da lamínula, ambos submetidos à condrogênese, após 21 dias em cultura estática.



Dessa forma, pode-se afirmar que embora a Poli(PCL-TMC)uretana não possua propriedades indutoras quando em presença de moléculas sinalizadoras para diferenciação, está favorecendo este processo através da proliferação das células em condrogênese, tanto em sua superfície quanto em seu interior, em uma profundidade de até 100 µm.

Tendo em vista estes resultados, os arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana cultivados com condrócitos durante 21 dias em cultura estática foram colocados no biorreator, onde ficaram durante 7 e 14 dias com estimulação dinâmica de fluxo na taxa de 0.4 mL/min. A manutenção da taxa escolhida se deu uma vez que no ensaio com as CTMs, esse valor mostrou-se apropriado ao crescimento celular.

Analisando as micrografias obtidas, nota-se que após 7 dias em cultura dinâmica a quantidade de células é bastante expressiva. Estas, em sua maioria,

com morfologia indicativa de condroblastos. No entanto, percebe-se a presença de núcleos condrocíticos, condensados, permeados ao longo da estrutura do material (**Fig. 24**). Nesse contexto, faz-se necessário salientar que as imagens obtidas são resultado da reconstrução de diversas fatias ópticas em planos focais diferentes, totalizando até 200  $\mu\text{m}$ . Assim, considerando que uma CTM tem uma média de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de núcleo e um citoplasma variando entre 50 e 70  $\mu\text{m}$  (GE et al., 2014), o que se observa é a presença de várias camadas de células, formando estratos celulares. Logo, é possível perceber que as células superficiais livres e que se apresentam mais nítidas nas micrografias, são condroblastos, enquanto que as que estão mais profundas na estrutura da Poli(PCL-TMC)uretana são condrocitos (**Fig. 24, B e C**). Além disso, as células superficiais são mais recentes do que as que se encontram mais internamente, sendo este um processo natural de arranjo das células na formação tecidual. A diferenciação das células em condrocitos dá-se do centro para a periferia, de modo que as células mais internas já apresentam as características de condrocitos, enquanto as mais periféricas ainda são condroblastos típicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

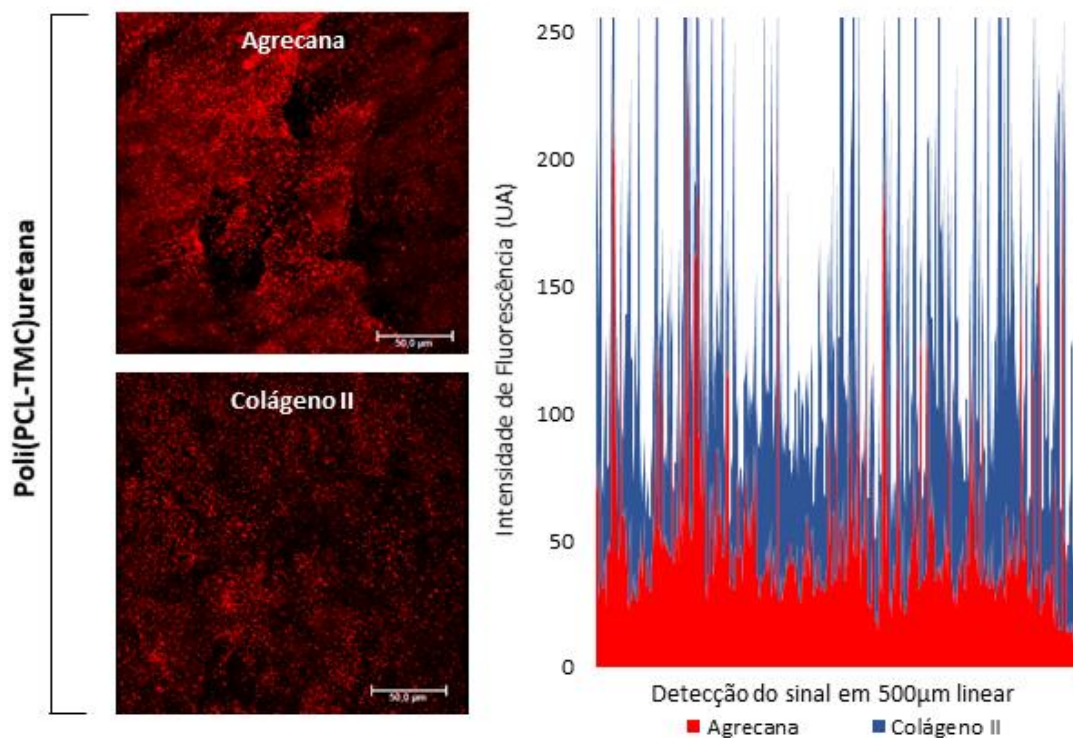


quando deslocadas para o biorreator (+ 7 dias), se deu por conta da taxa dinâmica de fluxo aplicada. Essa estimulação, portanto, como já se sabe, ativa vias bioquímicas celulares as quais definem as propriedades funcionais do tecido resultante (RATNER, D. BUDDY, HOFFMAN S. ALLAN, SCHOEN J. FREDERICK, 2013).

A presença das proteínas agrecana e colágeno II após o período de 7 dias no biorreator foi altamente expressiva (**Fig. 25**). A organização do colágeno, por sua vez, não é mais perinuclear como o observado após 21 dias. A apresentação se apresenta bastante difusa por toda a estrutura do material, assim como a agrecana.

Portanto, a presenças das duas proteínas, com esta intensidade de marcação, comprovam o processo de diferenciação das CTMs especificamente em condrócitos, uma vez que a presença concomitante de ambas é característica de formação de matriz extracelular de tecido cartilaginoso.

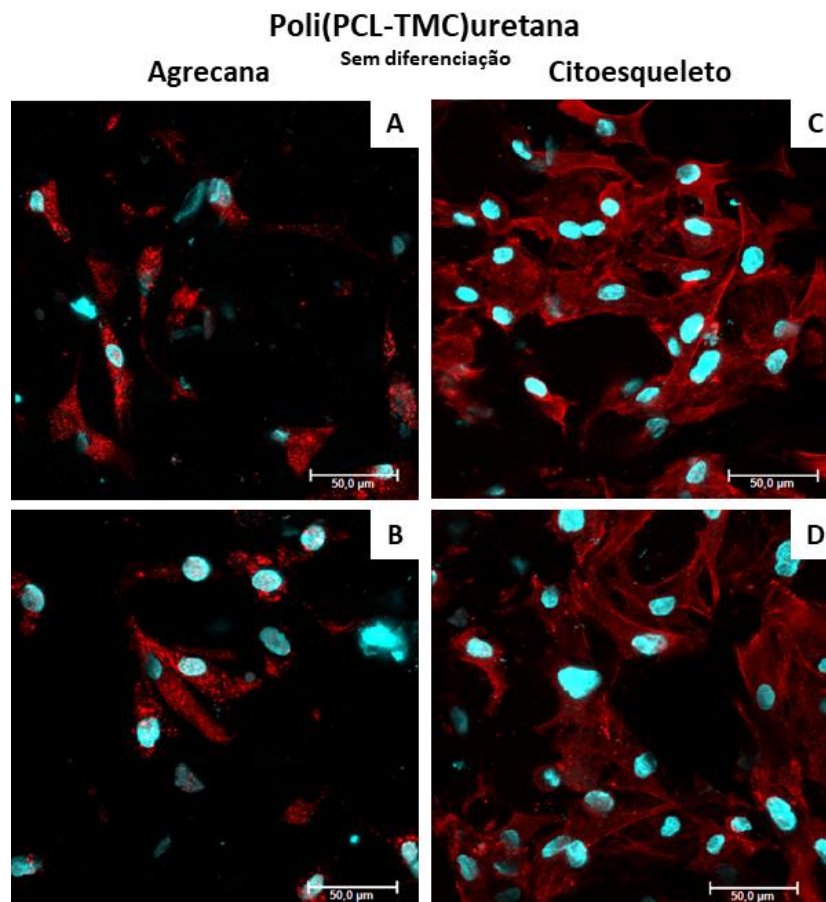
**Figura 25:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana e colágeno II nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana submetidos à condrogênese, após 7 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator.





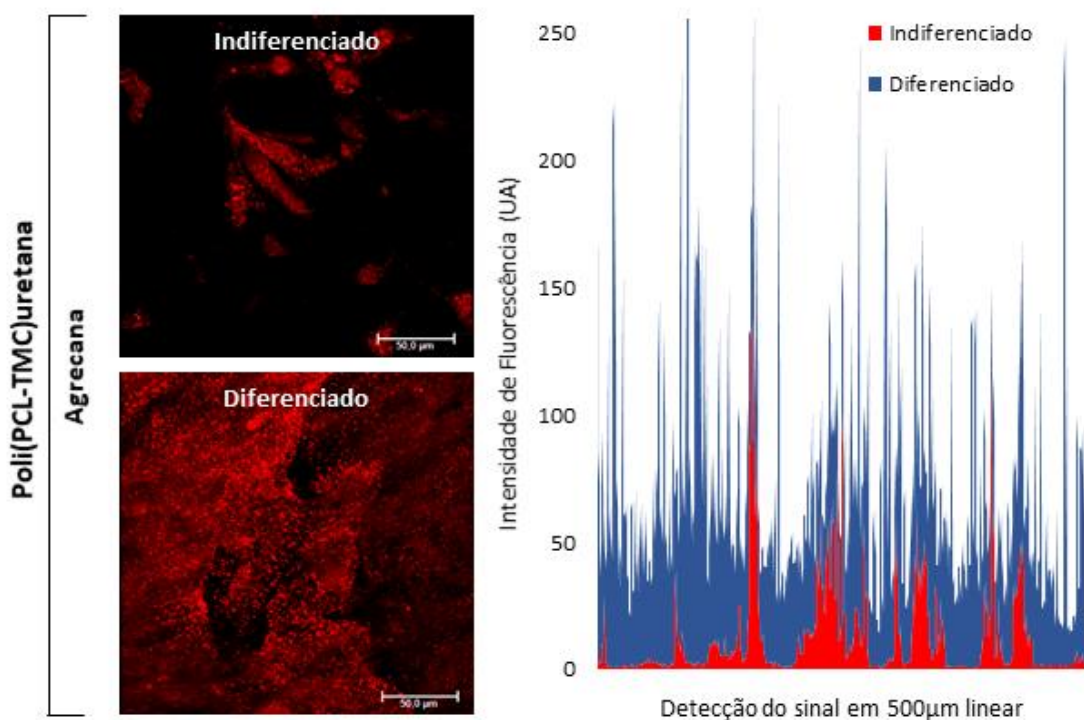
Para os arcabouços cuja cultura estática (21 dias) se deu com meio de cultura padrão, ou seja, sem a adição de fatores de diferenciação, avaliou-se que após os 7 dias de cultura no biorreator, a apresentação morfológica dos núcleos e citoplasmas é coerente com a apresentação fenotípicas das CTMs (**Fig. 26**). Assim, o que é possível constatar é a morfologia celular com aspecto fibroblásticoide poligonal irregular, representativo de célula-tronco mesenquimal (**Fig. 26, C e D**). Adicionalmente, foi observado que nem toda as células observadas apresentavam marcação para agrecana, ou seja, indicam claramente que há uma expressão espontânea não específica e heterogênea.

**Figura 26:** Micrografias de varredura confocal a laser identificando as CTMs aderidas em arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana após 21+7 dias de cultura dinâmica no biorreator, não submetidas a diferenciação. Em azul é identificado o núcleo pela marcação com DAPI, em quanto que em vermelho evidencia-se marcação indireta para agrecana (à esquerda) e citoesqueleto (à direita) por meio da identificação de Alexafluor 647.



A comparação entre os arcabouços diferenciados e indiferenciados no que compete à intensidade de fluorescência de agrecana, deixa evidente o que já fora discutido: a presença marcante de agrecana após o estímulo dinâmico de meio e a baixa expressão da mesma para os arcabouços indiferenciados (**Fig. 27**), lembrando que esta baixa expressão pode estar associada à diferenciação espontânea da CTM em outro tipo celular dentro de sua multipotência.

**Figura 27:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana, tanto nos arcabouços submetidos à condrogênese (diferenciado) quanto nos arcabouços não submetidos (indiferenciado), após 7 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator. A detecção linear da fluorescência nas imagens obtidas revela qualitativamente a predominância da agrecana de acordo com cada grupo avaliado.



Por fim, foram analisados os arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana diferenciados em condrócitos após 14 dias de cultura no biorreator. De acordo com a morfologia dos núcleos bem como do citoesqueleto observados, nota-se que as longas fibras tensionais de actina são indicativas de modificação fenotípica de condroblastos (**Fig. 28**).

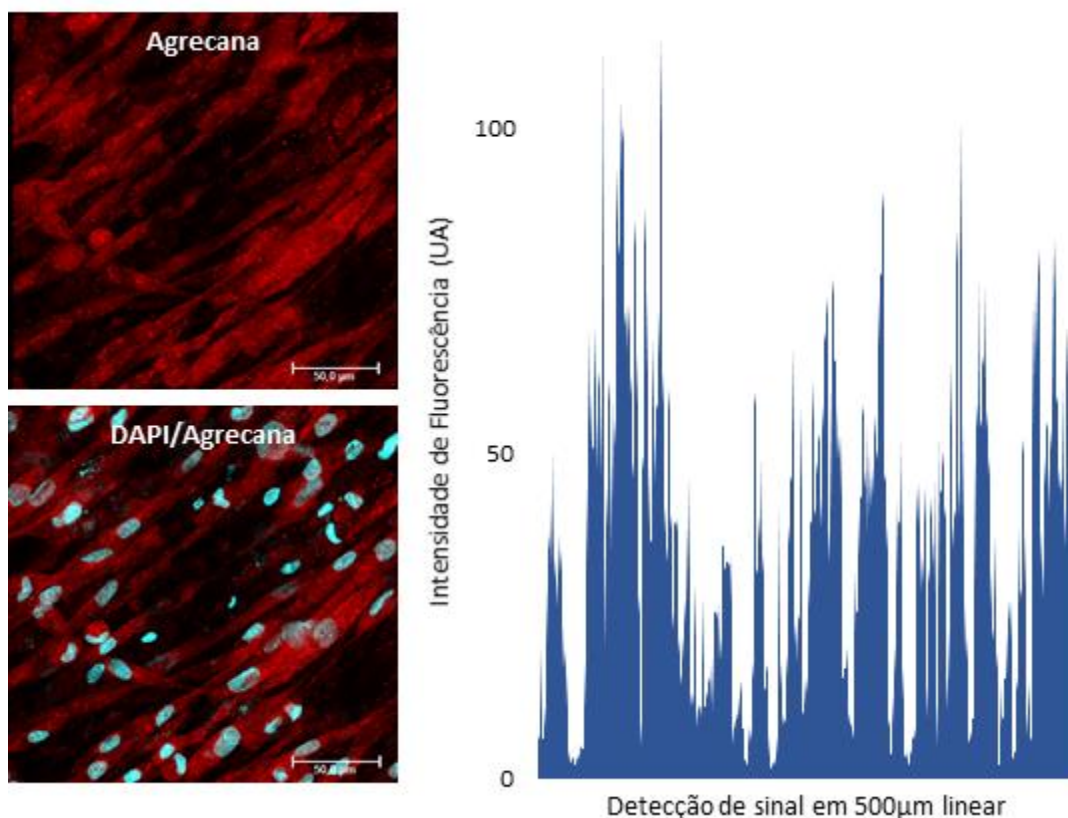




Entretanto, a diferença entre ambos – citoesqueleto e agrecana – é notada uma vez que na agrecana não se observa aspecto fibroso, característico das fibras de actina que compõem o citoesqueleto e que são visíveis nas imagens **C e D**.

Dessa forma, a marcação da agrecana se apresenta de forma difusa e amorfa, totalmente dispersa pelo citosol, que em último estágio será liberada pela célula para compor a MEC. A intensidade de fluorescência medida demonstra que há uma quantidade bastante expressiva de agrecana, conforme a **Fig. 29**. A detecção linear da fluorescência revela qualitativamente a predominância da agrecana no grupo avaliado.

**Figura 29:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agrecana, nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana submetidos à condrogênese, após 14 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator. Observa-se a marcação da agrecana em vermelho (acima) e a sobreposição com núcleos em azul (abaixo).



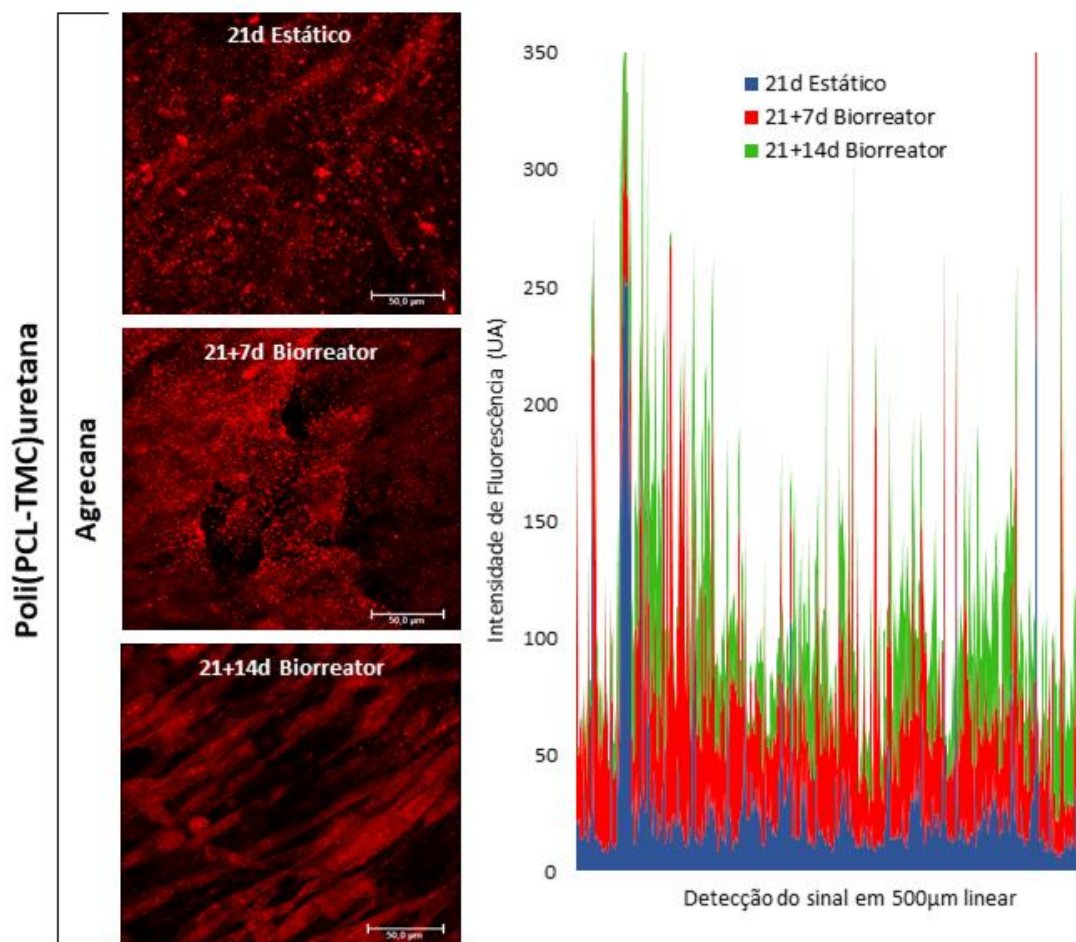
Pode causar questionamento o fato de que após 35 dias em cultura, com estímulos diversos de diferenciação, as células tenham se mantido



preferencialmente como condroblastos, entretanto, vale lembrar que uma vez se tratando de cultura *in vitro*, algumas limitações impedem a exata mimetização do que acontece no tecido, apesar da influência da dinâmica de fluido. Entre estas limitações está a ausência de uma matriz que aumenta em densidade e aprisiona o condrócito em seu interior, fazendo com que estes fiquem espacialmente separados e condensados, originando condrócitos esféricos com a morfologia clássica do tecido cartilaginoso (LI et al., 2018a; SIMON; JACKSON, 2018).

A análise global dos resultados obtidos culminou com a comparação qualitativa da expressão de agregana, expressa nos três tempos avaliados e nas três condições de experimento: 21 dias em cultura estática; 21+7 dias em biorreator dinâmico e 21+14 dias em biorreator dinâmico (**Fig. 30**).

**Figura 30:** Avaliação do sinal fluorescente oriundo da marcação específica para agregcana, tanto nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana submetidos à condrogênese, após 21 dias em cultura estática, 7 e 14 dias em cultura sob modo dinâmico no biorreator.



Analisando os picos de intensidade de fluorescência, nota-se que a expressão foi exponencial entre 21 dias estático e 21+7 dias no biorreator, evidenciando a influência positiva da estimulação dinâmica proporcionada pelo biorreator, quando comparado à cultura estática. Quando a cartilagem articular é carregada em tensão ou compressão no ambiente *in vivo*, o fluido intersticial que preenche a matriz extracelular é movido para regiões de baixa pressão para retornar ao estado inicial, apenas quando a carga for removida. Esse movimento induz um fluxo de fluido oscilatório em todo o tecido cartilaginoso (BRUNELLI; PERRAULT; LACROIX, 2019). Assim, a estimulação promovida pelo biorreator, *in vitro*, favorece a formação de um tecido com aspectos funcionais semelhantes à cartilagem nativa (PEROGLIO et al., 2017; ROSSER; THOMAS, 2018b).

Após 21+14 dias, há distribuição intensa no interior do citoplasma das células acompanhando a morfologia celular. Essa preferencialmente intracelular, não foi observada após 21+7 dias cuja distribuição se apresentou difusa por toda a superfície do material e preferencialmente extracelular.

Portanto, o conjunto de resultados demonstra que a diferenciação das CTMs sobre o material foi bastante eficiente uma vez que tanto a agrecana quanto o colágeno II, proteínas específicas da MEC da cartilagem, estavam presentes ao longo dos experimentos realizados. Conforme abordado anteriormente, algumas características das células-tronco, tais como diferenciação e manutenção de sua multipotência, são reguladas não apenas por fatores biológicos, mas também pelo microambiente onde estas estão inseridas. Logo, fatores como composição química, morfologia dos biomateriais e estimulação mecânica e dinâmica são muito importantes para garantir o processo de diferenciação destas células.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de uma nova poliuretana, os ensaios de citocompatibilidade sobre as membranas poliméricas, obtidas por evaporação do solvente, realizados para avaliar a resposta celular sobre uma superfície plana antes do estudo nos arcabouços, demonstraram adesão e crescimento celular, definindo a biocompatibilidade inicial do material.

A microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços obtidos por liofilização evidenciou estrutura porosa da Poli(PCL-TMC)uretana com poros interconectados por toda a estrutura do material.

Os arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana cultivados com CTMs submetidas ou não à condrogênese, após 21 dias em cultura estática, mostraram que as células foram capazes de aderir e crescer, enquanto as células diferenciadas foram capazes de suplantarem as fases da condrogênese, verificado pela presença de condrócitos e condroblastos onde a marcação de agrecana e colágeno II se mostrou evidente.

Os estudos preliminares dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana cultivados com CTMs no biorreator mostraram que a força de 2N, fluxo de 0.4 mL/min, associados à frequência em tempos de 5 segundos mantiveram o material comprimido por um tempo muito longo, diminuindo o tamanho dos poros e dificultando a proliferação celular. Este resultado conduziu as alterações de parâmetro para os ensaios posteriores.

O estudo dos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana cultivadas com CTMs submetidas à diferenciação condrogênica no biorreator, sob forças intermitentes de 1N e taxa de fluxo de 0,4 mL/min, mostrou que inicialmente as células aderiram, multiplicaram e diferenciaram mas, ao longo do período avaliado, o material entrou em processo de fadiga, diminuindo a população inicial de células. A análise por MVCL mostrou que as mesmas adentraram até 200 $\mu$ m na estrutura 3D da poliuretana.

Nos ensaios com CTMs indiferenciadas nos arcabouços de Poli(PCL-TMC)uretana em biorreator dinâmico sob taxa de fluxo de 0,4 mL/min, observou-se que a taxa aplicada foi promissora para o crescimento celular. O mesmo foi

verificado para as células submetidas à condrogênese, que diferenciaram e apresentaram elevada marcação de agrecana e colágeno II.

Os resultados obtidos no biorreator em módulo dinâmico, nos permite concluir que embora os valores de força de 1N e 2N impostos aos arcabouços restringiram o crescimento celular, a taxa de fluxo de 0,4 mL/min permitiu o crescimento normal das células.

Portanto, por meio dos resultados obtidos conclui-se que a Poli(PCL-TMC)uretana atende aos requisitos de biocompatibilidade apresentando grande potencial como carreador celular em aplicações como prótese de menisco. Devido a versatilidade do biorreator, do próprio material e também por conta de uma literatura vasta no que tange aos parâmetros como força e frequência utilizadas, estudos futuros serão necessários para otimização destes considerando as propriedades e estrutura de cada material.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGUILAR, S.; SCOTTON, C. J.; MCNULTY, K.; NYE, E.; STAMP, G.; LAURENT, G.; BONNET, D.; JANES, S. M. Bone Marrow Stem Cells Expressing Keratinocyte Growth Factor via an Inducible Lentivirus Protects against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e8013, 24 nov. 2009.
- AGRAWAL, P.; PRAMANIK, K.; BISWAS, A. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on silk fibroin:chitosan–glucosamine scaffold in dynamic culture. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 545–558, jul. 2018.
- AKTER, F. What is Tissue Engineering? In: **Tissue Engineering Made Easy**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 1–2.
- ALEXANDER, P. G.; HOFER, H. R.; CLARK, K. L.; TUAN, R. S. Mesenchymal Stem Cells in Musculoskeletal Tissue Engineering. **Principles of Tissue Engineering**, p. 1171–1199, 1 jan. 2014.
- ALEXIS, F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. **Polymer International**, v. 54, n. 1, p. 36–46, 1 jan. 2005.
- ALLEN, L. T.; TOSETTO, M.; MILLER, I. S.; O’CONNOR, D. P.; PENNEY, S. C.; LYNCH, I.; KEENAN, A. K.; PENNINGTON, S. R.; DAWSON, K. A.; GALLAGHER, W. M. Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. **Biomaterials**, v. 27, n. 16, p. 3096–3108, jun. 2006.
- ALPERIN, C.; ZANDSTRA, P. W.; WOODHOUSE, K. A. Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7377–7386, 1 dez. 2005.
- ALTANKOV, G.; GRINNELL, F.; GROTH, T. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, n. 3, p. 385–391, mar. 1996.
- ALVES DA SILVA, M. L.; MARTINS, A.; COSTA-PINTO, A. R.; CORRELO, V. M.; SOL, P.; BHATTACHARYA, M.; FARIA, S.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in chitosan-based scaffolds using a flow-perfusion bioreactor. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, n. 9, p. 722–732, out. 2011.
- ANDERSON, D. E.; JOHNSTONE, B. Dynamic Mechanical Compression of Chondrocytes for Tissue Engineering: A Critical Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, 11 dez. 2017.
- ANDERSON, J. M. Inflammatory response to implants. **ASAIO transactions /**

**American Society for Artificial Internal Organs**, v. 34, n. 2, p. 101–7, 1988.

ANDERSON, J. M.; MILLER, K. M. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. **Biomaterials**, v. 5, n. 1, p. 5–10, jan. 1984.

ASSIS-RIBAS, T.; FORNI, M. F.; WINNISCHOFER, S. M. B.; SOGAYAR, M. C.; TROMBETTA-LIMA, M. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. **Developmental Biology**, v. 437, n. 2, p. 63–74, 15 maio 2018.

ATALA, A.; MOONEY, D. J. **Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds**, [s.l.] Birkhäuser, 1997.

BACAKOVA, L.; ZARUBOVA, J.; TRAVNICKOVA, M.; MUSILKOVA, J.; PAJOROVA, J.; SLEPICKA, P.; KASALKOVA, N. S.; SVORCIK, V.; KOLSKA, Z.; MOTARJEMI, H.; MOLITOR, M. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 4, p. 1111–1126, 1 jul. 2018.

BAGNO, L.; HATZISTERGOS, K. E.; BALKAN, W.; HARE, J. M. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 7, p. 1610–1623, 5 jul. 2018.

BAKER, B. M.; HANDORF, A. M.; IONESCU, L. C.; LI, W.-J.; MAUCK, R. L. New directions in nanofibrous scaffolds for soft tissue engineering and regeneration. **Expert review of medical devices**, v. 6, n. 5, p. 515–32, set. 2009.

BANCROFT, G. N.; SIKAVITSAS, V. I.; VAN DEN DOLDER, J.; SHEFFIELD, T. L.; AMBROSE, C. G.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12600–5, 1 out. 2002.

BARRY, F.; BOYNTON, R. E.; LIU, B.; MURPHY, J. M. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. **Experimental Cell Research**, v. 268, n. 2, p. 189–200, 15 ago. 2001.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 4, p. 568–584, abr. 2004.

BAT, E.; KOTHMAN, B. H. M.; HIGUERA, G. A.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; FEIJEN, J.; GRIJPMA, D. W. Ultraviolet light crosslinking of poly(trimethylene carbonate) for elastomeric tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8696–8705, 1 nov. 2010.

BAUER, S.; PARK, J.; MARK, K. von der; SCHMUKI, P. Improved attachment

of mesenchymal stem cells on super-hydrophobic TiO<sub>2</sub> nanotubes. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1576–1582, 1 set. 2008.

BEŞKARDEŞ, I. G.; AYDIN, G.; BEKTAŞ, Ş.; CENGİZ, A.; GÜMÜŞDERELİOĞLU, M. A systematic study for optimal cell seeding and culture conditions in a perfusion mode bone-tissue bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 6 jan. 2018a.

BEŞKARDEŞ, I. G.; AYDIN, G.; BEKTAŞ, Ş.; CENGİZ, A.; GÜMÜŞDERELİOĞLU, M. A systematic study for optimal cell seeding and culture conditions in a perfusion mode bone-tissue bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 132, p. 100–111, 15 abr. 2018b.

BIAN, L.; FONG, J. V.; LIMA, E. G.; STOKER, A. M.; ATESHIAN, G. A.; COOK, J. L.; HUNG, C. T. Dynamic mechanical loading enhances functional properties of tissue-engineered cartilage using mature canine chondrocytes. **Tissue engineering. Part A**, v. 16, n. 5, p. 1781–90, maio 2010.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell stem cell**, v. 2, n. 4, p. 313–9, 10 abr. 2008.

BIRMINGHAM, E.; GROGAN, J. A.; NIEBUR, G. L.; MCNAMARA, L. M.; MCHUGH, P. E. Computational Modelling of the Mechanics of Trabecular Bone and Marrow Using Fluid Structure Interaction Techniques. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 41, n. 4, p. 814–826, 4 abr. 2013.

BOUGAULT, C.; PAUMIER, A.; AUBERT-FOUCHER, E.; MALLEIN-GERIN, F. Molecular analysis of chondrocytes cultured in agarose in response to dynamic compression. **BMC Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 71, 15 set. 2008.

BRUNELLI, M.; PERRAULT, C.; LACROIX, D. A Review of Bioreactors and Mechanical Stimuli. In: [s.l: s.n.]p. 1–22. 2019.

CAO, Y.; VACANTI, J. P.; PAIGE, K. T.; UPTON, J.; VACANTI, C. A. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 100, n. 2, p. 297- 302; discussion 303–4, ago. 1997.

CAO, H.; MCHUGH, K.; CHEW, S. Y.; ANDERSON, J. M. The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the *in vivo* and *in vitro* foreign body reaction. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 9999A, n. 3, p. NA-NA, 1 jun. 2009.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641–650, set. 1991.

CARTMELL, S. H.; PORTER, B. D.; GARCÍA, A. J.; GULDBERG, R. E. Effects of Medium Perfusion Rate on Cell-Seeded Three-Dimensional Bone Constructs



*in Vitro. Tissue Engineering*, v. 9, n. 6, p. 1197–1203, 2003.

CASALINI, T. Bioresorbability of polymers: Chemistry, mechanisms, and modeling. **Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications**, p. 65–83, 1 jan. 2017.

CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. **Surface Science**, v. 500, n. 1–3, p. 28–60, 10 mar. 2002.

CHANG, C.-H.; LIN, F.-H.; LIN, C.-C.; CHOU, C.-H.; LIU, H.-C. Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 71B, n. 2, p. 313–321, 15 nov. 2004.

CHEN, M.; ZAMORA, P. O.; SOM, P.; PEÑA, L. A.; OSAKI, S. Cell attachment and biocompatibility of polytetrafluoroethylene (PTFE) treated with glow-discharge plasma of mixed ammonia and oxygen. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 14, n. 9, p. 917–35, 2003.

CHEN, Y.; SHAO, J.-Z.; XIANG, L.-X.; DONG, X.-J.; ZHANG, G.-R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 5, p. 815–820, 1 jan. 2008.

CHOWDHURY, T. T.; BADER, D. L.; SHELTON, J. C.; LEE, D. A. Temporal regulation of chondrocyte metabolism in agarose constructs subjected to dynamic compression. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 417, n. 1, p. 105–11, 1 set. 2003.

CLYNE, A. M. Thermal Processing of Tissue Engineering Scaffolds. **Journal of Heat Transfer**, v. 133, n. 3, p. 034001, 1 mar. 2011.

COOPER, S. L.; GUAN, J. **Advances in Polyurethane Biomaterials**. [s.l.: s.n.]. 2016.

CORDNER, S.; MCKELVIE, H. Organ and Tissue Transplantation: Ethical and Practical Issues. In: **Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 624–631.

DAI, N.-T.; WILLIAMSON, M. R.; KHAMMO, N.; ADAMS, E. F.; COOMBES, A. G. A. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4263–4271, 1 ago. 2004.

DAVISSON, T.; KUNIG, S.; CHEN, A.; SAH, R.; RATCLIFFE, A. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, n. 4, p. 842–848, jul. 2002.

DE REZENDE DUEK, E. A.; CRISTINA MOTTA, A. Bioresorbable Polymers ☆. **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, n. April

2016, p. 1–11, 1 jan. 2017.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 8, p. 875–884, 1 ago. 2000.

DÍAZ-CELORIO, E.; FRANCO, L.; RODRÍGUEZ-GALÁN, A.; PUIGGALÍ, J. Synthesis of glycolide/trimethylene carbonate copolymers: Influence of microstructure on properties. **European Polymer Journal**, v. 48, n. 1, p. 60–73, 1 jan. 2012.

DOWLING, D. P.; MILLER, I. S.; ARDHAOU, M.; GALLAGHER, W. M. Effect of Surface Wettability and Topography on the Adhesion of Osteosarcoma Cells on Plasma-modified Polystyrene. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 3, p. 327–347, 21 set. 2011.

DUMBAULD, D. W.; LEE, T. T.; SINGH, A.; SCRIMGEOUR, J.; GERSBACH, C. A.; ZAMIR, E. A.; FU, J.; CHEN, C. S.; CURTIS, J. E.; CRAIG, S. W.; GARCÍA, A. J. How vinculin regulates force transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 24, p. 9788–93, 11 jun. 2013.

ELHAMIAN, S. M. M.; ALIZADEH, M.; SHOKRIEH, M. M.; KARIMI, A. A depth dependent transversely isotropic micromechanic model of articular cartilage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 111, 11 fev. 2015.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

ERMOLAEVA, M.; NERI, F.; ORI, A.; RUDOLPH, K. L. Cellular and epigenetic drivers of stem cell ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1, 1 jun. 2018.

FAUCHEUX, N.; SCHWEISS, R.; LÜTZOW, K.; WERNER, C.; GROTH, T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2721–2730, jun. 2004.

FELICE, B.; SÁNCHEZ, M. A.; SOCCI, M. C.; SAPPPIA, L. D.; GÓMEZ, M. I.; CRUZ, M. K.; FELICE, C. J.; MARTÍ, M.; PIVIDORI, M. I.; SIMONELLI, G.; RODRÍGUEZ, A. P. Controlled degradability of PCL-ZnO nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering and their antibacterial activity. **Materials Science and Engineering: C**, 8 ago. 2018.

FRIEDENSTEIN, A. I. Osteogenic stem cells of the bone marrow. **Ontogenez**, v. 22, n. 2, p. 189–197, 1990.

FRITH, J. E.; THOMSON, B.; GENEVER, P. G. Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 4, p. 735–749, ago. 2010.

FUKUSHIMA, K. Poly(trimethylene carbonate)-based polymers engineered for biodegradable functional biomaterials. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 1, p. 9–24, 15 dez. 2016.

GABRIEL, L. P.; SANTOS, M. E. M. dos; JARDINI, A. L.; BASTOS, G. N. T.; DIAS, C. G. B. T.; WEBSTER, T. J.; MACIEL FILHO, R. Bio-based polyurethane for tissue engineering applications: How hydroxyapatite nanoparticles influence the structure, thermal and biological behavior of polyurethane composites. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 201–208, 1 jan. 2017.

GAO, C.; PENG, S.; FENG, P.; SHUAI, C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, p. 17059, 21 dez. 2017.

GE, J.; GUO, L.; WANG, S.; ZHANG, Y.; CAI, T.; ZHAO, R. C. H.; WU, Y. The Size of Mesenchymal Stem Cells is a Significant Cause of Vascular Obstructions and Stroke. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 10, n. 2, p. 295–303, 7 abr. 2014.

GECKELER, K. E.; WACKER, R.; AICHER, W. K. Biocompatibility correlation of polymeric materials using human osteosarcoma cells. **Die Naturwissenschaften**, v. 87, n. 8, p. 351–4, ago. 2000.

GEIGER, B.; BERSHADSKY, A.; PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 11, p. 793–805, 1 nov. 2001.

GHORBANI, F. M.; KAFFASHI, B.; SHOKROLLAHI, P.; SEYEDJAFARI, E.; ARDESHIRYLAJIMI, A. PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 133–142, 15 mar. 2015.

GLOWACKI, J.; MIZUNO, S.; GREENBERGER, J. S. Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture. **Cell transplantation**, v. 7, n. 3, p. 319–326, 1998.

GOMES, M. E.; SIKAVITSAS, V. I.; BEHRAVESH, E.; REIS, R. L.; MIKOS, A. G. Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 67A, n. 1, p. 87–95, 1 out. 2003.

GOMES, R. C.; [HTTP://LATTES.CNPQ.BR/9974151176548878](http://lattes.cnpq.br/9974151176548878). Síntese e Caracterização do Poli(PCL-TMC)uretana para utilização como Biomaterial. 3 mar. 2017.

GRÄSSEL, S.; STÖCKL, S.; JENEI-LANZL, Z. Isolation, Culture, and Osteogenic/Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**.

[s.l: s.n.]879p. 203–267. 2012.

GROGAN, S. P.; BARBERO, A.; DIAZ-ROMERO, J.; CLETON-JANSEN, A.-M.; SOEDER, S.; WHITESIDE, R.; HOGENDOORN, P. C. W.; FARHADI, J.; AIGNER, T.; MARTIN, I.; MAINIL-VARLET, P. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 2, p. 586–595, fev. 2007.

GRAYSON, W. L.; FRÖHLICH, M.; YEAGER, K.; BHUMIRATANA, S.; CHAN, M. E.; CANNIZZARO, C.; WAN, L. Q.; LIU, X. S.; GUO, X. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Engineering anatomically shaped human bone grafts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3299–304, 23 fev. 2010.

GRODZINSKY, A. J.; LEVENSTON, M. E.; JIN, M.; FRANK, E. H. Cartilage Tissue Remodeling in Response to Mechanical Forces. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 691–713, ago. 2000.

GUAN, J.; FUJIMOTO, K. L.; SACKS, M. S.; WAGNER, W. R. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3961–3971, 1 jun. 2005.

GUELCHER, S. A. Biodegradable Polyurethanes: Synthesis and Applications in Regenerative Medicine. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 14, n. 1, p. 3–17, 10 mar. 2008.

HÄCKER, G. **The morphology of apoptosis** *Cell and Tissue Research*, 2000.

HAO, L.; YANG, H.; DU, C.; FU, X.; ZHAO, N.; XU, S.; CUI, F.; MAO, C.; WANG, Y. Directing the fate of human and mouse mesenchymal stem cells by hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers with varying wettability. **Journal of materials chemistry. B**, v. 2, n. 30, p. 4794–4801, 14 ago. 2014.

HENCH, L. L.; JONES, J. R.; INSTITUTE OF MATERIALS, M. **Biomaterials, artificial organs and tissue engineering**. [s.l.] CRC Press, 2005.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v. 4, n. 7, p. 518–524, 1 jul. 2005.

HONARMANDI, P.; LEE, H.; LANG, M. J.; KAMM, R. D. A microfluidic system with optical laser tweezers to study mechanotransduction and focal adhesion recruitment. **Lab on a chip**, v. 11, n. 4, p. 684–94, 21 fev. 2011.

HUNG, C. T.; MAUCK, R. L.; WANG, C. C. B.; LIMA, E. G.; ATESHIAN, G. A. A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading. **Annals of biomedical engineering**, v. 32, n. 1, p. 35–49, jan. 2004.

HUNG, S.-P.; YANG, M.-H.; TSENG, K.-F.; LEE, O. K. Hypoxia-Induced

Secretion of TGF- $\beta$ 1 in Mesenchymal Stem Cell Promotes Breast Cancer Cell Progression. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 10, p. 1869–1882, out. 2013.

IKADA, Y. Surface modification of polymers for medical applications. **Biomaterials**, v. 15, n. 10, p. 725–736, 1 ago. 1994.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 3, n. 10, p. 589–601, 22 out. 2006.

INTHANON, K.; SARANWONG, N.; WONGKHAM, W.; WANICHAPICHART, P.; PRAKRAJANG, K.; SUWANNAKACHORN, D.; YU, L. D. PIII-induced enhancement and inhibition of human cell attachment on chitosan membranes. **Surface and Coatings Technology**, v. 229, p. 112–119, 25 ago. 2013.

JAKUS, A. E.; GEISENDORFER, N. R.; LEWIS, P. L.; SHAH, R. N. 3D-printing porosity: A new approach to creating elevated porosity materials and structures. **Acta Biomaterialia**, v. 72, p. 94–109, 1 maio 2018.

JANIK, H.; MARZEC, M. **A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds** **Materials Science and Engineering C**, mar. 2015.

JIANG, J.; WANG, Y.; LIU, B.; CHEN, X.; ZHANG, S. Challenges and research progress of the use of mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke. **Brain and Development**, v. 40, n. 7, p. 612–626, 1 ago. 2018.

JOHNSTONE, B.; ALINI, M.; CUCCHIARINI, M.; DODGE, G. R.; EGLIN, D.; GUILAK, F.; MADRY, H.; MATA, A.; MAUCK, R. L.; SEMINO, C. E.; STODDART, M. J. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. **European cells & materials**, v. 25, p. 248–67, 2 maio 2013.

JORGENSEN, C.; GORDELADZE, J.; NOEL, D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 406–410, 1 out. 2004.

JULIAN, C.; AL-RUBEAI, M. **Bioreactors for Tissue Engineering Principles, Design and Operation**. [s.l.] Springer, 2005. v. 3

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556 p.

KAI, D.; REN, W.; TIAN, L.; CHEE, P. L.; LIU, Y.; RAMAKRISHNA, S.; LOH, X. J. Engineering Poly(lactide)–Lignin Nanofibers with Antioxidant Activity for Biomedical Application. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 10, p. 5268–5276, 3 out. 2016.

KALVELYTĖ, A. V.; IMBRASAITĖ, A.; KRESTNIKOVA, N.; STULPINAS, A. Adult Stem Cells and Anticancer Therapy. In: **Advances in Molecular Toxicology**. [s.l.: s.n.]11p. 123–202. 2017.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and

osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 1 set. 2005.

KATO, Y.; KIM, M.-H.; KINO-OKA, M. Comparison of growth kinetics between static and dynamic cultures of human induced pluripotent stem cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 6, p. 736–740, jun. 2018.

KAUPP, J. A.; WEBER, J. F.; WALDMAN, S. D. Mechanical Stimulation of Chondrocyte-agarose Hydrogels. **Journal of Visualized Experiments**, n. 68, p. e4229, 27 out. 2012.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, n. 3, p. 112–118, jun. 2014.

KELLY, T.-A. N.; FISHER, M. B.; OSWALD, E. S.; TAI, T.; MAUCK, R. L.; ATESHIAN, G. A.; HUNG, C. T. Low-Serum Media and Dynamic Deformational Loading in Tissue Engineering of Articular Cartilage. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 5, p. 769–779, 26 maio 2008.

KELLY, T.-A. N.; ROACH, B. L.; WEIDNER, Z. D.; MACKENZIE-SMITH, C. R.; O'CONNELL, G. D.; LIMA, E. G.; STOKER, A. M.; COOK, J. L.; ATESHIAN, G. A.; HUNG, C. T. Tissue-engineered articular cartilage exhibits tension–compression nonlinearity reminiscent of the native cartilage. **Journal of Biomechanics**, v. 46, n. 11, p. 1784–1791, 26 jul. 2013.

KHALILI, A. A.; AHMAD, M. R. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p. 18149–84, 5 ago. 2015.

KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y. J.; YEE, A. J.; YANG, B. B. Structure and function of aggrecan. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 19–32, 1 mar. 2002.

KISIDAY, J. D.; JIN, M.; DIMICCO, M. A.; KURZ, B.; GRODZINSKY, A. J. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. **Journal of Biomechanics**, v. 37, n. 5, p. 595–604, maio 2004.

KOBOLAK, J.; DINNYES, A.; MEMIC, A.; KHADEMHOSEINI, A.; MOBASHERI, A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p. 62–68, 15 abr. 2016.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484, dez. 2009.

LAM, C. N. .; WU, R.; LI, D.; HAIR, M. .; NEUMANN, A. . Study of the advancing and receding contact angles: liquid sorption as a cause of contact angle hysteresis. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 96, n. 1–3, p. 169–191, 25 fev. 2002.

LAM, C. X. F.; HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J.-T.; WOODRUFF, M. A.; TEOH, S. H. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90A, n. 3, p. 906–919, 1 set. 2009.

LEE, J. H.; KHANG, G.; LEE, J. W.; LEE, H. B. Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 205, n. 2, p. 323–330, 15 set. 1998.

LEE, S.-H.; KIM, B.-S.; KIM, S. H.; CHOI, S. W.; JEONG, S. I.; KWON, I. K.; KANG, S. W.; NIKOLOVSKI, J.; MOONEY, D. J.; HAN, Y.-K.; KIM, Y. H. Elastic biodegradable poly(glycolide-co-caprolactone) scaffold for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 66A, n. 1, p. 29–37, 1 jul. 2003.

LI, D.; TANG, T.; LU, J.; DAI, K. Effects of flow shear stress and mass transport on the construction of a large-scale tissue-engineered bone in a perfusion bioreactor. **Tissue engineering. Part A**, v. 15, n. 10, p. 2773–83, out. 2009.

LI, F.; TRUONG, V. X.; FISCH, P.; LEVINSON, C.; GLATTAUER, V.; ZENOBI-WONG, M.; THISSEN, H.; FORSYTHE, J. S.; FRITH, J. E. Cartilage tissue formation through assembly of microgels containing mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 77, p. 48–62, 1 set. 2018a.

LI, J. J.; SYDNEY, N.; HEALTH, L.; LEONARDS, S. **Tissue Response to Biomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2018b.

LI, L.; XIE, T. STEM CELL NICHE: Structure and Function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 605–631, nov. 2005.

LI, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, n. 3, p. 342–353, 1 jan. 1999.

LI, S.; L'HEUREUX, N.; ELISSEEFF, J. **Stem Cell and Tissue Engineering**. [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2011.

LIESHOUT, M. Van; PETERS, G.; RUTTEN, M.; BAAIJENS, F. A Knitted, Fibrin-Covered Polycaprolactone Scaffold for Tissue Engineering of the Aortic Valve. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 3, p. 481–487, mar. 2006.

LIN, S.; MEQUANINT, K. Bioreactor-induced mesenchymal progenitor cell differentiation and elastic fiber assembly in engineered vascular tissues. **Acta Biomaterialia**, v. 59, p. 200–209, 1 set. 2017.

LOTFI, M.; NEJIB, M.; NACEUR, M. Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility. In: **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**. [s.l.] InTech, 2013.

MA, X.; LIU, K.; LI, F.; JIANG, X.; JIANG, L.; LI, H. Human mesenchymal stem cells increases expression of  $\alpha$ -tubulin and angiopoietin 1 and 2 in focal

cerebral ischemia and reperfusion. **Current neurovascular research**, v. 10, n. 2, p. 103–11, maio 2013.

MADL, C. M.; HEILSHORN, S. C.; BLAU, H. M. Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. **Nature**, v. 557, n. 7705, p. 335–342, 16 maio 2018.

MARION, N. W.; MAO, J. J. Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering. **Methods in Enzymology**, v. 420, p. 339–361, 1 jan. 2006.

MARLOVITS, S.; TICHY, B.; TRUPPE, M.; GRUBER, D.; SCHLEGEL, W. Collagen expression in tissue engineered cartilage of aged human articular chondrocytes in a rotating bioreactor. **The International journal of artificial organs**, v. 26, n. 4, p. 319–30, abr. 2003.

MÁRQUEZ, Y.; FRANCO, L.; PUIGGALÍ, J. Thermal degradation studies of poly(trimethylene carbonate) blends with either polylactide or polycaprolactone. **Thermochimica Acta**, v. 550, p. 65–75, 20 dez. 2012.

MARTIN, I.; WENDT, D.; HEBERER, M. **The role of bioreactors in tissue engineering** *Trends in Biotechnology*, fev. 2004.

MARZEC, M.; KUCIŃSKA-LIPKA, J.; KALASZCZYŃSKA, I.; JANIK, H. **Development of polyurethanes for bone repair** *Materials Science and Engineering C* Elsevier, , 1 nov. 2017.

MAUCK, R. L.; SOLTZ, M. A.; WANG, C. C.; WONG, D. D.; CHAO, P. H.; VALHMU, W. B.; HUNG, C. T.; ATESHIAN, G. A. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. **Journal of biomechanical engineering**, v. 122, n. 3, p. 252–60, jun. 2000.

MAUCK, R. L.; BYERS, B. A.; YUAN, X.; TUAN, R. S. Regulation of Cartilaginous ECM Gene Transcription by Chondrocytes and MSCs in 3D Culture in Response to Dynamic Loading. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 6, n. 1–2, p. 113–125, 12 jan. 2007.

MBARKI, M.; SHARROCK, P.; FIALLO, M.; ELFEKI, H. Hydroxyapatite bioceramic with large porosity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 985–990, 1 jul. 2017.

MCMURRAY, R. J.; GADEGAARD, N.; TSIMBOURI, P. M.; BURGESS, K. V.; MCNAMARA, L. E.; TARE, R.; MURAWSKI, K.; KINGHAM, E.; OREFFO, R. O. C.; DALBY, M. J. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. **Nature Materials**, v. 10, n. 8, p. 637–644, 17 ago. 2011.

MENG, Q.; HU, J.; ZHU, Y.; LU, J.; LIU, Y. Polycaprolactone-based shape memory segmented polyurethane fiber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, n. 4, p. 2515–2523, 15 nov. 2007.



MESALLATI, T.; BUCKLEY, C. T.; NAGEL, T.; KELLY, D. J. Scaffold architecture determines chondrocyte response to externally applied dynamic compression. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 12, n. 5, p. 889–899, 16 out. 2013.

MITTAL, K. L. **Contact Angle, Wettability and Adhesion**. [s.l.] CRC Press, 2004.

MOBASSERI, R.; TIAN, L.; SOLEIMANI, M.; RAMAKRISHNA, S.; NADERI-MANESH, H. Peptide modified nanofibrous scaffold promotes human mesenchymal stem cell proliferation and long-term passaging. **Materials Science and Engineering: C**, v. 84, p. 80–89, 1 mar. 2018.

MORAIS, L. S. de; GUIMARÃES, G. S.; ELIAS, C. N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 6, p. 48–53, dez. 2007.

MORONI, L.; BURDICK, J. A.; HIGHLEY, C.; LEE, S. J.; MORIMOTO, Y.; TAKEUCHI, S.; YOO, J. J. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, p. 1, 26 abr. 2018.

MOUW, J. K.; IMLER, S. M.; LEVENSTON, M. E. Ion-channel Regulation of Chondrocyte Matrix Synthesis in 3D Culture Under Static and Dynamic Compression. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 6, n. 1–2, p. 33–41, 10 jan. 2007.

NATTA, F. J. van; HILL, J. W.; CAROTHERS, W. H. Studies of Polymerization and Ring Formation. XXIII. <sup>1</sup> ε-Caprolactone and its Polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 2, p. 455–457, fev. 1934.

NEBELUNG, S.; GAVENIS, K.; LÜRING, C.; ZHOU, B.; MUELLER-RATH, R.; STOFFEL, M.; TINGART, M.; RATH, B. Simultaneous anabolic and catabolic responses of human chondrocytes seeded in collagen hydrogels to long-term continuous dynamic compression. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 194, n. 4, p. 351–358, jul. 2012.

OSHIMA, M.; INOUE, K.; NAKAJIMA, K.; TACHIKAWA, T.; YAMAZAKI, H.; ISOBE, T.; SUGAWARA, A.; OGAWA, M.; TANAKA, C.; SAITO, M.; KASUGAI, S.; TAKANO-YAMAMOTO, T.; INOUE, T.; TEZUKA, K.; KUBOKI, T.; YAMAGUCHI, A.; TSUJI, T. Functional tooth restoration by next-generation bio-hybrid implant as a bio-hybrid artificial organ replacement therapy. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6044, 13 maio 2015.

PALSSON, B.; BHATIA, S. **Tissue engineering**. [s.l.] Pearson Prentice Hall, 2004.

PEROGLIO, M.; GASPAR, D.; ZEUGOLIS, D. I.; ALINI, M. Relevance of bioreactors and whole tissue cultures for the translation of new therapies to humans. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 1, p. 10–21, 3 ago. 2017.

PERTICI, G. Introduction to bioresorbable polymers for biomedical applications. **Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications**, p. 3–29, 1 jan. 2017.

PHILLIPS, B. L.; CALLAGHAN, C. The immunology of organ transplantation. **Surgery (Oxford)**, v. 35, n. 7, p. 333–340, 1 jul. 2017.

PITTENGER, M. F.; KERR, C. Chapter 2 – Stem Cells. In: **Tissue Engineering**. [s.l: s.n.]p. 23–65. 1999.

PLUNKETT, N. A.; PARTAP, S.; O'BRIEN, F. J. Osteoblast response to rest periods during bioreactor culture of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. **Tissue engineering. Part A**, v. 16, n. 3, p. 943–51, mar. 2010.

PRITCHARD, J. Developmental and Cellular Skeletal Biology. **Journal of anatomy**, v. 129, n. Pt 2, p. 447, 1979.

RATNER, D. BUDDY, HOFFMAN S. ALLAN, SCHOEN J. FREDERICK, L. E. J. Chapter I.2.1 – Introduction: The Diversity and Versatility of Biomaterials. In: **Biomaterials Science**. [s.l: s.n.]p. 63–64. 2013.

RICHARDSON, S. M.; KALAMEGAM, G.; PUSHPARAJ, P. N.; MATTA, C.; MEMIC, A.; KHADEMHOSEINI, A.; MOBASHERI, R.; POLETTI, F. L.; HOYLAND, J. A.; MOBASHERI, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. **Methods**, v. 99, p. 69–80, 15 abr. 2016.

ROCHA, D. N.; BRITES, P.; FONSECA, C.; PÊGO, A. P. Poly(Trimethylene Carbonate-co- $\epsilon$ -Caprolactone) Promotes Axonal Growth. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88593, 27 fev. 2014.

ROSSER, J.; THOMAS, D. J. Bioreactor processes for maturation of 3D bioprinted tissue. **3D Bioprinting for Reconstructive Surgery**, p. 191–215, 1 jan. 2018a.

ROSSER, J.; THOMAS, D. J. Bioreactor processes for maturation of 3D bioprinted tissue. **3D Bioprinting for Reconstructive Surgery**, p. 191–215, 1 jan. 2018b.

ROUGHLEY, P. J.; MORT, J. S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. **Journal of experimental orthopaedics**, v. 1, n. 1, p. 8, dez. 2014.

RUIZ, A.; FLANAGAN, C. E.; MASTERS, K. S. Differential support of cell adhesion and growth by copolymers of polyurethane with hyaluronic acid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 10, p. 2870–2882, 1 out. 2013.

SACCHETTI, B.; FUNARI, A.; REMOLI, C.; GIANNICOLA, G.; KOGLER, G.; LIEDTKE, S.; COSSU, G.; SERAFINI, M.; SAMPAOLESI, M.; TAGLIAFICO, E.;

TENEDINI, E.; SAGGIO, I.; ROBEY, P. G.; RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. No Identical “Mesenchymal Stem Cells” at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. **Stem Cell Reports**, v. 6, n. 6, p. 897–913, 14 jun. 2016.

SADTLER, K.; SINGH, A.; WOLF, M. T.; WANG, X.; PARDOLL, D. M.; ELISSEEFF, J. H. Design, clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 7, p. 16040, 7 jul. 2016.

SAIF, M. T. A.; SAGER, C. R.; COYER, S. Functionalized Biomicroelectromechanical Systems Sensors for Force Response Study at Local Adhesion Sites of Single Living Cells on Substrates. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 31, n. 8, p. 950–961, set. 2003.

SALTZMAN, W. M. **Tissue engineering : engineering principles for the design of replacement organs and tissues**. [s.l.] Oxford University Press, 2004.

SANTORO, R.; OLIVARES, A. L.; BRANS, G.; WIRZ, D.; LONGINOTTI, C.; LACROIX, D.; MARTIN, I.; WENDT, D. Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 8946–8952, dez. 2010.

SCAGLIONE, S.; BRACCINI, A.; WENDT, D.; JAQUIERY, C.; BELTRAME, F.; QUARTO, R.; MARTIN, I. Engineering of osteoinductive grafts by isolation and expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 181–187, 5 jan. 2006.

SCHLIEPHAKE, H.; ZGHOUL, N.; JÄGER, V.; VAN GRIENSVEN, M.; ZEICHEN, J.; GELINSKY, M.; WÜLFING, T. Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90A, n. 2, p. 429–437, ago. 2009.

SEIDEL, J. O.; PEI, M.; GRAY, M. L.; LANGER, R.; FREED, L. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Long-term culture of tissue engineered cartilage in a perfused chamber with mechanical stimulation. **Biorheology**, v. 41, n. 3–4, p. 445–58, 2004.

SETAYESHMEHR, M.; ESFANDIARI, E.; RAFIENIA, M.; HASHEMIBENI, B.; TAHERI-KAFRANI, A.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; KAPLAN, D. L.; MORONI, L.; JOGHATAEI, M. Hybrid and composite scaffolds based on extracellular matrices for cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, p. ten.TEB.2018.0245, 16 jan. 2019.

SHAHIN, K.; DORAN, P. M. Strategies for Enhancing the Accumulation and Retention of Extracellular Matrix in Tissue-Engineered Cartilage Cultured in Bioreactors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23119, 15 ago. 2011.

SHI, Y.; SU, J.; ROBERTS, A. I.; SHOU, P.; RABSON, A. B.; REN, G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. **Trends in immunology**, v. 33, n. 3, p. 136–43, mar. 2012.

SIKAVITSAS, V. I.; BANCROFT, G. N.; LEMOINE, J. J.; LIEBSCHNER, M. A. K.; DAUNER, M.; MIKOS, A. G. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. **Annals of biomedical engineering**, v. 33, n. 1, p. 63–70, jan. 2005.

SIMON, T. M.; JACKSON, D. W. Articular Cartilage. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 26, n. 1, p. 31–39, mar. 2018.

SKALAK, R.; FOX, C. F. Tissue engineering, UCLA symposia on molecular and cellular biology new series. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 92, 1 abr. 1988.

SMITH, L. J.; LI, P.; HOLLAND, M. R.; EKSER, B. FABRICA: A Bioreactor Platform for Printing, Perfusing, Observing, & Stimulating 3D Tissues. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7561, 15 dez. 2018.

SOLCHAGA, L. A.; PENICK, K. J.; WELTER, J. F. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 698, p. 253–78, 2011.

SOMOZA, R. A.; WELTER, J. F.; CORREA, D.; CAPLAN, A. I. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 20, n. 6, p. 596–608, dez. 2014.

STAPPENBECK, T. S.; MIYOSHI, H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5935, p. 1666–9, 26 jun. 2009.

STERODIMAS, A.; DE FARIA, J.; NICARETTA, B.; PITANGUY, I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): Current and future applications. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1886–1892, 1 nov. 2010.

STIEHLER, M.; BÜNGER, C.; BAATRUP, A.; LIND, M.; KASSEM, M.; MYGIND, T. Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89, n. 1, p. 96–107, abr. 2008.

STROMPS, J.-P.; PAUL, N. E.; RATH, B.; NOURBAKSH, M.; BERNHAGEN, J.; PALLUA, N. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: a new path in articular cartilage defect management? **BioMed research international**, v. 2014, p. 740926, 2014.

THOMAS, V.; JOSE, M. V.; CHOWDHURY, S.; SULLIVAN, J. F.; DEAN, D. R.; VOHRA, Y. K. Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds

of polycaprolactone fabricated by electrospinning. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 17, n. 9, p. 969–84, 2006.

TONELLI, F. M. P.; DE CÁSSIA OLIVEIRA PAIVA, N.; DE MEDEIROS, R. V. B.; PINTO, M. C. X.; TONELLI, F. C. P.; RESENDE, R. R. Tissue Engineering: The Use of Stem Cells in Regenerative Medicine. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications**. [s.l.: s.n.]p. 315–324. 2016.

TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. **Advances in wound care**, v. 5, n. 3, p. 119–136, 1 mar. 2016.

TSUANG, Y.-H.; LIN, Y.-S.; CHEN, L.-T.; CHENG, C.-K.; SUN, J.-S. Effect of dynamic compression on in vitro chondrocyte metabolism. **The International journal of artificial organs**, v. 31, n. 5, p. 439–49, maio 2008.

TURNBULL, G.; CLARKE, J.; PICARD, F.; RICHES, P.; JIA, L.; HAN, F.; LI, B.; SHU, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278–314, 1 set. 2018.

VENUGOPAL, J. R.; ZHANG, Y.; RAMAKRISHNA, S. In Vitro Culture of Human Dermal Fibroblasts on Electrospun Polycaprolactone Collagen Nanofibrous Membrane. **Artificial Organs**, v. 30, n. 6, p. 440–446, jun. 2006.

VERT, M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything †. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 538–546, mar. 2005.

VETSCH, J. R.; MÜLLER, R.; HOFMANN, S. The evolution of simulation techniques for dynamic bone tissue engineering in bioreactors. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 8, p. 903–917, ago. 2015.

VILLANUEVA, I.; WEIGEL, C. A.; BRYANT, S. J. Cell–matrix interactions and dynamic mechanical loading influence chondrocyte gene expression and bioactivity in PEG-RGD hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 2832–2846, out. 2009.

VINATIER, C.; MRUGALA, D.; JORGENSEN, C.; GUICHEUX, J.; NOËL, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 307–314, 1 maio 2009.

VOLKMER, E.; DROSSE, I.; OTTO, S.; STANGELMAYER, A.; STENGELE, M.; KALLUKALAM, B. C.; MUTSCHLER, W.; SCHIEKER, M. Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 8, p. 1331–1340, ago. 2008.

WAKITANI, S.; KIMURA, T.; HIROOKA, A.; OCHI, T.; YONEDA, M.; YASUI, N.; OWAKI, H.; ONO, K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. **The Journal of bone and joint**

**surgery. British volume**, v. 71, n. 1, p. 74–80, jan. 1989.

WANG, P.-Y.; CHOW, H.-H.; TSAI, W.-B.; FANG, H.-W. Modulation of Gene Expression of Rabbit Chondrocytes by Dynamic Compression in Polyurethane Scaffolds with Collagen Gel Encapsulation. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 4, p. 347–366, 12 jan. 2009.

WANG, T.; GARDINER, B. S.; LIN, Z.; RUBENSON, J.; KIRK, T. B.; WANG, A.; XU, J.; SMITH, D. W.; LLOYD, D. G.; ZHENG, M. H. Bioreactor design for tendon/ligament engineering. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 19, n. 2, p. 133–46, abr. 2013.

WANG, Y.-W.; WU, Q.; CHEN, G.-Q. Reduced mouse fibroblast cell growth by increased hydrophilicity of microbial polyhydroxyalkanoates via hyaluronan coating. **Biomaterials**, v. 24, n. 25, p. 4621–4629, 1 nov. 2003.

WEI, Q.; FRENETTE, P. S. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 632–648, 17 abr. 2018.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, out. 2009.

WILLIAMS, D. F. (David F. **The Williams dictionary of biomaterials**. [s.l.] Liverpool University Press, 1999.

WISEMAN, M.; HENSON, F.; LEE, D. A.; BADER, D. L. Dynamic compressive strain inhibits nitric oxide synthesis by equine chondrocytes isolated from different areas of the cartilage surface. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 451–456, 5 jan. 2010.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, 1 out. 2010.

XIE, J.; HAN, Z. Y.; MATSUDA, T. Mechanical compressive loading stimulates the activity of proximal region of human COL2A1 gene promoter in transfected chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 4, p. 1192–1199, 16 jun. 2006.

XU, L.-C.; SIEDLECKI, C. A. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. **Biomaterials**, v. 28, n. 22, p. 3273–83, ago. 2007.

Y., Z.; GARCIADIEGO-CZARES, D.; PARRA- CID, C.; AGUILAR-GAYTN, R.; VELASQUILLO, C.; IBARRA, C.; CASTRO CARMO, J. S. Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies. In: **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. [s.l.] InTech, 2013.

YANG, J.; CAO, C.; WANG, W.; TONG, X.; SHI, D.; WU, F.; ZHENG, Q.; GUO, C.; PAN, Z.; GAO, C.; WANG, J. Proliferation and osteogenesis of immortalized

bone marrow-derived mesenchymal stem cells in porous polylactic glycolic acid scaffolds under perfusion culture. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 9999A, n. 3, p. NA-NA, 1 mar. 2009.

YEATTS, A. B.; FISHER, J. P. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 17, n. 3, p. 337–48, mar. 2011.

YU, J. Z.; KORKMAZ, E.; BERG, M. I.; LEDUC, P. R.; OZDOGANLAR, O. B. Biomimetic scaffolds with three-dimensional undulated microtopographies. **Biomaterials**, v. 128, p. 109–120, jun. 2017.

ZARRINTAJ, P.; MANOUCHEHRI, S.; AHMADI, Z.; SAEB, M. R.; URBANSKA, A. M.; KAPLAN, D. L.; MOZAFARI, M. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 187, p. 66–84, 1 maio 2018.

ZHANG, Y.; WANG, F.; CHEN, J.; NING, Z.; YANG, L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus bone marrow nucleated cells in the treatment of chondral defects. **International Orthopaedics**, v. 36, n. 5, p. 1079–1086, 28 maio 2012.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; CHANG, F.; XU, W.; DING, J. Repair of full-thickness articular cartilage defect using stem cell-encapsulated thermogel. **Materials Science and Engineering: C**, v. 88, p. 79–87, 1 jul. 2018.

ZHANG, Z.-Y.; TEOH, S. H.; TEO, E. Y.; KHOON CHONG, M. S.; SHIN, C. W.; TIEN, F. T.; CHOO LANI, M. A.; CHAN, J. K. Y. A comparison of bioreactors for culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8684–8695, nov. 2010.

ZHAO, F.; MA, T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: Dynamic cell seeding and construct development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 4, p. 482–493, 20 ago. 2005.

ZHAO, J.; GRIFFIN, M.; CAI, J.; LI, S.; BULTER, P. E. M.; KALASKAR, D. M. **Bioreactors for tissue engineering: An update** *Biochemical Engineering Journal* Elsevier, , 15 maio 2016.

ZHONG, Y.; HE, S.; JI, B. MECHANICS IN MECHANOSENSITIVITY OF CELL ADHESION AND ITS ROLES IN CELL MIGRATION. **International Journal of Computational Materials Science and Engineering**, v. 01, n. 04, p. 1250032, 4 dez. 2012.

ZHU, K. J.; HENDREN, R. W.; JENSEN, K.; PITT, C. G. Synthesis, properties, and biodegradation of poly(1,3-trimethylene carbonate). **Macromolecules**, v. 24, n. 8, p. 1736–1740, abr. 1991.

ZIGNEGO, D. L.; HILMER, J. K.; JUNE, R. K. Mechanotransduction in primary human osteoarthritic chondrocytes is mediated by metabolism of energy, lipids, and amino acids. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 16, p. 4253–4261, 16

dez. 2015.