

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA – UNIARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

***RENATA AQUINO DE CARVALHO***

**SUPORTE BIOATIVO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) E  
FIBRINA CELULARIZADO PARA USO EM MEDICINA  
REGENERATIVA ÓSSEA.**

**ARARAQUARA - SP**

**2017**

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA – UNIARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

**SUPORTE BIOATIVO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) E  
FIBRINA CELULARIZADO PARA USO EM MEDICINA  
REGENERATIVA ÓSSEA.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal - PPGB da Universidade de Araraquara, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monica Rosas da Costa Iemma

**ARARAQUARA - SP**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C327s Carvalho, Renata Aquino de  
Suporte bioativo de Poli (Ácido Lático) e fibrina celularizado para  
uso em medicina regenerativa óssea/Renata Aquino de Carvalho. –  
Araraquara: Universidade de Araraquara, 2017.  
65f.

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal –  
UNIARA

Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral  
Co-Orientador: Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma

1. Medicina regenerativa óssea. 2. Terapia celular. 3. Poli (Ácido  
Lático). 4. Fibrina. 5. Plasma rico em plaqueta puro. I. Título.

CDU 610

## DADOS CURRICULARES

### RENATA AQUINO DE CARVALHO

#### 1 DADOS PESSOAIS.

- 1.1 Nascimento :. 19 de agosto de 1979.
- 1.2 Nacionalidade: Brasileira.
- 1.3 Naturalidade: Araraquara.
- 1.4 Estado Civil: Casada.
- 1.5 Filiação: Pai: Aldo de Aquino.  
Mãe: Vilma Aparecida Casuscelli de Aquino.
- 1.6 Profissão: Bióloga
- 1.7 Endereço: Rua Papa João Paulo I, 757, Jd. Higienópolis, Araraquara-SP.
- 1.8 Endereço profissional: Rua Carlos Gomes, 1217, Centro, Araraquara-SP.

#### 2 FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2.1 Bacharel em Ciências Biológicas – Centro Universitário de Araraquara - 2000.
- 2.2 Especialista em Biologia Molecular e Citogenética – IPESP – 2009.

#### 3 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RELEVANTES

CARVALHO R.A., VERONESE G., CARVALHO A. J. F., BARBU E., AMARAL A. C., TROVATTI E.: The potential of TEMPO-oxidized nanofibrillar cellulose beads for cell delivery applications. *Cellulose*, 2016.

LUSTRI W.R., LAZARINI S. C., LUSTRI B. C., CORBI P. P., SILVA M. A. C., NOGUEIRA F. A. R., CARVALHO R. A. , AMARAL A. C., FILHO O. T., MASSABNI A. C., BARUD H. S.: Spectroscopic characterization and biological studies in vitro of a new silver complex with furosemide: Prospective of application as an antimicrobial agent. *Journal of Molecular Structure*, 2016.

LAZARINI S. C., CARVALHO R. A., AMARAL A. C., LUSTRI B.C., CORBI F.C.A., CORBI P. P., BARUD H. S., LUSTRI W.R. : Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. *Cellulose*, 2016

#### 4 ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Bióloga responsável pelo Laboratório de Citogenética da Universidade de Araraquara – De 2005 até data atual.

“A sabedoria é um grande paradoxo. O homem que mais sabe é aquele que mais reconhece a vastidão da sua ignorância.”

Friedrich Nietzsche

*Dedico este trabalho ao meu filho, Guilherme. Luz da minha vida, que me tem proporcionado grandes momentos de alegria.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Vilma e Aldo. Em especial minha mãe, que por diversas vezes não me deixou desanimar, cuidou e amou meu filho nos momentos que não pude estar presente.

Ao meu marido Eduardo, pela paciência e por entender minha ausência em vários momentos de nossas vidas.

Ao professor e orientador Dr. André Capaldo Amaral, meu sincero agradecimento pela orientação, confiança e amizade, pela paciência e por acreditar em mim.

A minha co orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica Rosas da Costa Iemma, que além de professora, tornou se amiga para a vida toda.

A professora Dr<sup>a</sup> Eliane Trovatti, pela parceria e ensinamentos, pela doçura e paciência, pela amizade que levarei para sempre.

Agradeço a colaboração dos professores Dr. Hernane Barud e Dr. Wilton Rogério Lustri, que estiveram disponíveis sempre que precisei.

Aos amigos do laboratório, Guilherme, Andréia e Silmara que por vezes me socorreram não só nos experimentos de bancada, mas nos desafios da vida.

Ao Valmir Vieira Rocha Júnior, graduando na Escola da Engenharia da Universidade de São Paulo, pela impressão dos suportes de PLA. Obrigada dedicação e comprometimento por este trabalho.

A querida secretária do PPGBiotec e amiga Sandra Pavanelli, sempre disposta a nos ajudar.

A minha aluna de IC, Sarah Felício pela oportunidade de compartilharmos conhecimento.

A Santa Casa de Araraquara pelas análises laboratoriais;

A Dr<sup>a</sup> Kelli Micocci, Dr<sup>a</sup> Grazielle Pisani e Dr<sup>a</sup> Janaína de Andréa Dernowsek pela ajuda com as análises celulares.

Às prof<sup>as</sup> Dr<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo e Dr<sup>a</sup> Angela Cristina Malheiros Luzo e Prof.s Dr. Reginaldo Teixeira e Dr. Antonio Carvalho pela parceria e disponibilidade.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse aonde cheguei.

## RESUMO

A medicina regenerativa óssea busca superar as limitações das abordagens terapêuticas convencionais aplicadas ao reparo ósseo, tendo como objetivo a adoção de estratégias que atuem como substitutos temporários capazes de orientar e estimular o reparo do tecido, reduzindo, ou eliminando, a necessidade de áreas doadoras autólogas em caso de necessidade de substitutos ósseos. O objetivo deste estudo é construir um suporte tridimensional bioativo de Poli(ácido láctico) (PLA) e fibrina celularizado para avaliar sua bioatividade, *in vitro*, buscando estabelecer sua potencialidade para o uso futuro na medicina regenerativa óssea. Para esta finalidade foram produzidos suportes de PLA, em conformação tridimensional por meio de uma impressora 3D pela técnica de manufatura aditiva denominada FDM (*Fused Deposition Modeling*). Estes suportes foram embebidos em uma suspensão constituída de Plasma Rico em Plaquetas Puro - humano (PRP-Ph) e células tronco mesenquimais de gordura infrapatelar de joelho humano (CTMGih), sendo então submetidos a ativação exógena por trombina e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) para a polimerização da fibrina e a formação do suporte celularizado. Os suportes foram mantidos em condições de cultura por 5 3 10 dias, utilizando meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e antibióticos, sem suplementação de qualquer outra fonte de fatores de crescimento. As análises de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência demonstraram que as células, quando cultivadas no suporte tridimensional de PLA e fibrina autóloga, obtidas através do PRP-Ph, mantiveram-se viáveis em ambos os períodos experimentais. Os resultados obtidos sugerem que a combinação de PLA e fibrina podem dar origem a um suporte tridimensional rígido e bioativo, assegurando a manutenção da viabilidade celular na estrutura tridimensional, utilizando apenas os fatores de crescimento plaquetários.

Palavras - chave: Medicina Regenerativa Óssea, Terapia Celular, Poli(Ácido Láctico), Fibrina, Plasma Rico em Plaquetas Puro .



## ABSTRACT

Bone regenerative medicine aims to overcome the limitations of the conventional bone repair treatments, in attempt to develop therapeutic strategies based on materials capable of acting as temporary substitutes for guiding and stimulating the tissue repair, in order to reduce or eliminate the need for autologous donor tissues. The objective of this study is to evaluate the *in vitro* viability of a poly (lactic acid) (PLA) and fibrin device, aiming to establish its potential for use in bone regenerative medicine. For this purpose, three-dimensional PLA supports were produced by Fused Deposition Modeling (FDM) additive manufacturing technique. These supports were embedded into a suspension of human platelet rich plasma (P-PRPh) and human Infrapatellar fat pad mesenchymal stem cells. Then, they were activated by exogenous thrombin and calcium chloride, leading the fibrin to polymerize and the formation of the cell loaded device. The supports were maintained in culture conditions for and 10 days. Scanning Electron Microscopy (SEM) and fluorescence microscopy suggested the cells kept viable in the experimental period of time. The results also suggested that the combination of PLA with fibrin generated a support with enough mechanical properties to ensure the cellularization within the three-dimensional structure, besides the availability of platelet growth factors.

Key words: Bone Regenerative Medicine, Cell Therapy, Poly(Lactic Acid), Fibrin, Pure Platelet Rich Plasma

## LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS.

$(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$	Hidroxiapatita
3D	Tridimensional
AR	Alizarina red
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
CAD	<i>Computer Assisted Design</i>
CAM	<i>Computer Assisted Manufacturing</i>
$CH_3CHOHCOOH$	Poli(ácido láctico)
$CO_2$	Gás Carbônico
CT	Célula Tronco
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
CTMGIJ h	Célula Tronco Mesenquimal de Gordura Infrapatelar de Joelho humano
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epitelial
ESTREP.	Estreptomicina
FC	Fator de Crescimento
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
IBMX	Isobutilmetilxantina
IGF-I	Fator de Crescimento semelhante á Insulina do tipo I
MA	Manufatura Aditiva
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura
MR	Medicina Regenerativa

<i>ORO</i>	<i>Oil Red</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDLA	Poli(D-ácido láctico)
PDLLA	Poli(D,L-ácido láctico)
PEN	Penicilina
PLA	Poli(ácido láctico)
PLLA	Poli(L-ácido láctico)
PRP- Ph	Plasma rico em plaquetas puro- humano
SBF	Soro Bovino Fetal
TGF- $\beta$ 1	Fator de Crescimento de Transformação $\beta$ tipo 1
UV	Ultra Violeta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Corte transversal de um osso.

**Figura 2:** Processo de reparo ósseo.

**Figura 3:** Estratégia da medicina regenerativa.

**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura do fibrinogênio pré e pós ativação do fibrinogênio com a trombina e cloreto de cálcio

**Figura 5:** Moléculas de PLA.

**Figura 6:** Processos de síntese do PLA.

**Figura 7:** Organograma representativo das etapas experimentais para obtenção do suporte tridimensional de PLA e fibrina bioativo celularizado.

**Figura 8:** Planejamento computacional dos suportes de PLA.

**Figura 9:** Representação ilustrativa da celularização do suporte de PLA e fibrina.

**Figura 10:** Representação do planejamento computacional dos suportes tridimensionais de PLA.

**Figura 11:** Caracterização macro e microscópica dos suportes tridimensionais de PLA.

**Figura 12:** Representação fotográfica das CTMGlh.

**Figura 13:** Análise macroscópica de suportes de PLA e PLA associado à fibrina.

**Figura 14:** Foromicrografias obtidas por MEV demonstrando a estrutura interna do suporte tridimensional de PLA e o suporte tridimensional de PLA e fibrina.

**Figura 15:** Fotomicrografia obtida por MEV demonstra células com diferentes dimensões e morfologia circundadas ela matriz de fibrina.

**Figura 16:** Fotomicrografias obtidas por MEV demonstram aglomerados multicelulares.

**Figura 17:** Análises obtidas por microscopia de fluorescência.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Valores de referência de Leucócitos, Hemácias e Plaquetas no sangue total e valores referentes à quantificação dessas células no sangue total e no plasma fracionado após protocolo de centrifugação

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 O OSSO.....	18
2.2 ENXERTO ÓSSEO .....	20
2.3 MEDICINA REGENERATIVA ÓSSEA .....	22
2.3.1 O SUPORTE .....	23
2.3.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL .....	29
2.3.3 MOLÉCULAS BIOATIVAS .....	30
3. HIPÓTESE.....	32
4. OBJETIVOS .....	33
4.1 OBJETIVOS GERAIS .....	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
5.1 SUJEITOS.....	35
5.2 SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA.....	35
5.3 FIBRINA RICA EM PLAQUETAS .....	36
5.3.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS PURO - HUMANO (PRP-Ph).....	36
5.4 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE GORDURA INFRAPATELAR HUMANO (CTMG <sup>lh</sup> ) .....	37
5.4.1 ISOLAMENTO DAS CTMG <sup>lh</sup> .....	37
5.4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMG <sup>lh</sup> POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	37
5.5 SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA E FIBRINA, BIOATIVOS CELULARIZADOS .....	38
5.5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SUPORTE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	39
5.6 BIOATIVIDADE DOS FATORES DE CRESCIMENTO PLAQUETARIOS.....	40
5.6.1 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	40
6. RESULTADOS.....	41
6.1 SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA:.....	41
6.2 FIBRINA RICA EM PLAQUETAS.....	42
6.2.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS PURO HUMANO (PRP-Ph):.....	42
6.3 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL DE GORDURA INFRAPATELAR DE JOELHO HUMANO.....	43
6.3.1 ISOLAMENTO DAS CTMG <sup>lh</sup> .....	43

6.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMGH.....	44
6.4 SUPORTE TRIDIMENSIONAL CELULARIZADO DE PLA E FIBRINA .....	45
6.5 CELULARIZAÇÃO DOS SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA E FIBRINA .....	45
6.6 BIOATIVIDADE DO SUPORTE TRIDIMENSIONAL DE PLA E FIBRINA. ....	47
7. DISCUSSÕES .....	50
8. CONCLUSÕES.....	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
10. ANEXO.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

Os ossos são estruturas altamente dinâmicas, crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo. Esta potencialidade adaptativa, também denominada plasticidade óssea, proporciona ainda a capacidade de auto reparo em resposta a lesões (DIMITRIOU *et al.*, 2011).

No entanto, existem condições nas quais as lesões ósseas não são capazes de se auto regenerar, como nos casos em que o processo de regeneração é comprometido por condições biológicas e/ou biomecânicas desfavoráveis ou na reconstrução de grandes defeitos ósseos criados por trauma, infecção, tumores e anormalidades esqueléticas (LICHTE *et al.*, 2011).

Nestas situações, o padrão atual de tratamento é a utilização de enxerto ósseo. Estes enxertos podem ser classificados de acordo com sua origem em autoenxerto, aloenxerto ou xenoenxerto. Contudo, o uso do enxerto ósseo possui limitações como a quantidade a ser obtida, necessidade de um maior tempo operatório, geração de um trauma adicional ao local doador, risco de transmissão de doenças, geração de reações imunológicas e necessidade de um banco de ossos (SCHROEDER, MOSHEIFF, 2011).

A medicina regenerativa consiste em um conjunto de conhecimentos e técnicas para a reconstrução de novos órgãos ou tecidos. Baseada nas ciências biomédica e engenharia de materiais busca superar as limitações dos tratamentos convencionais de reparo ósseo, tendo como objetivo a integração de suportes biológicos, células e/ou biomoléculas com a finalidade de orientar e estimular a regeneração do novo tecido (OLIVEIRA, 2010; LI *et al.*, 2015).

Os suportes biológicos, componente estrutural destas estratégias, seguem critérios de concepção ideal incluindo o tipo de material, sua arquitetura, porosidade, química de superfície, bem como resistência mecânica. O material precisa ser biocompatível e biodegradável, assim, o suporte deve servir para proporcionar uma estrutura temporária que, subsequentemente, degrade-se concomitantemente com a formação de novo tecido ao longo do tempo (LIU *et al.*, 2013; COX *et al.*, 2015).

Dentre as tecnologias existentes para a produção dos suportes, destaca-se a manufatura aditiva (popularmente denominada impressão 3D) que pode ser definida como um processo de fabricação por meio da adição sucessiva de material na forma de camadas, com informações obtidas diretamente de uma representação geométrica computacional 3D originado de um sistema CAD, do componente (VOLPATO, 2017).



A vantagem desta técnica é a customização dos suportes tridimensionais, altamente porosos e com poros interconectados, podendo ser controlados, também, a topografia e a conformação estrutural, com reflexo direto sobre as suas propriedades mecânicas (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2015).

O poli(ácido láctico) (PLA) é um polímero sintético, biodegradável, biocompatível, com boa resistência mecânica, plasticidade térmica e bioabsorvível. Devido a estas características, vem sendo muito utilizado na medicina regenerativa para a fabricação de suportes (LASPRILLA *et al.*, 2012). Entretanto, esses polímeros apresentam alta hidrofobicidade, bem como a falta de grupos funcionais que possam interagir com o meio biológico, fazendo com que o PLA se mostre pouco atrativo à adesão celular e interferindo na viabilidade e proliferação celular (MUENPRASAT *et al.*, 2010; NYANHONGO *et al.*, 2013)

Muitas estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar a compatibilidade desse polímero através de reações para imobilização química de macromoléculas bioativas, tais como gelatina, quitosana, colágeno e fibrina (PETRY, PRANKE, 2014).

A fibrina é uma proteína que está envolvida no processo de coagulação sanguínea, produzida por uma sequência de reações enzimáticas que converte o fibrinogênio em fibrina (RODRIGUES *et al.*, 2012).

O coágulo de fibrina representa uma matriz biodegradável, biocompatível, de natureza autóloga, apresentando-se em conformação tridimensional e de fácil processamento, viabilizando a obtenção de diversas formas e tamanhos (RAJANGAM, AN, 2013). O coágulo de fibrina pode ser produzido, *in vitro*, a partir do plasma rico em plaquetas, que é, também, fonte de fibrinogênio autólogo. A formação do coágulo se dá com a ativação exógena do fibrinogênio pela adição de trombina e cloreto de cálcio, que culmina em transformar o fibrinogênio em uma rede complexa de fibrina. Além disso, as plaquetas retidas no interior do coágulo liberam fatores de crescimento, que contribuem com a neoformação tecidual (KHADEMHOSEINI *et al.*, 2006).

O coágulo de fibrina tem se mostrado um suporte promissor para a medicina regenerativa, contudo existem desvantagens significativas, tais como, baixa propriedade mecânica e desintegração progressiva do coágulo, com subsequente perda de forma e volume antes da formação do novo tecido (MUNIRAH *et al.*, 2008).

Após estas considerações, baseado nos benefícios individuais do PLA e da fibrina, com a associação de ambos, buscamos o desenvolvimento de um suporte com características ideais para o uso em MR óssea.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O OSSO

O osso é um tecido dinâmico e bastante vascularizado que cresce, renova-se e mantém-se ativo durante toda a vida do organismo sem deixar cicatriz (SOMMERFELDT, RUBIN, 2001). Sua principal função é fornecer suporte estrutural para o corpo, além de servir como reservatório de minerais, fornecer proteção para órgãos internos, abrigar elementos biológicos necessários para a hematopoiese e manter a homeostase de eletrólitos (CLARKE, 2008).

O osso é um material heterogêneo, constituído de uma matriz mineralizada, composta de 1) uma fase orgânica (principalmente colágeno) responsável pela viscoelasticidade e resistência; 2) uma fase mineral composta de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), responsável pelo reforço estrutural, rigidez e homeostase; 3) proteínas não colagenosas, responsáveis por formar um microambiente e estimular as funções celulares (HENKEL, 2013).

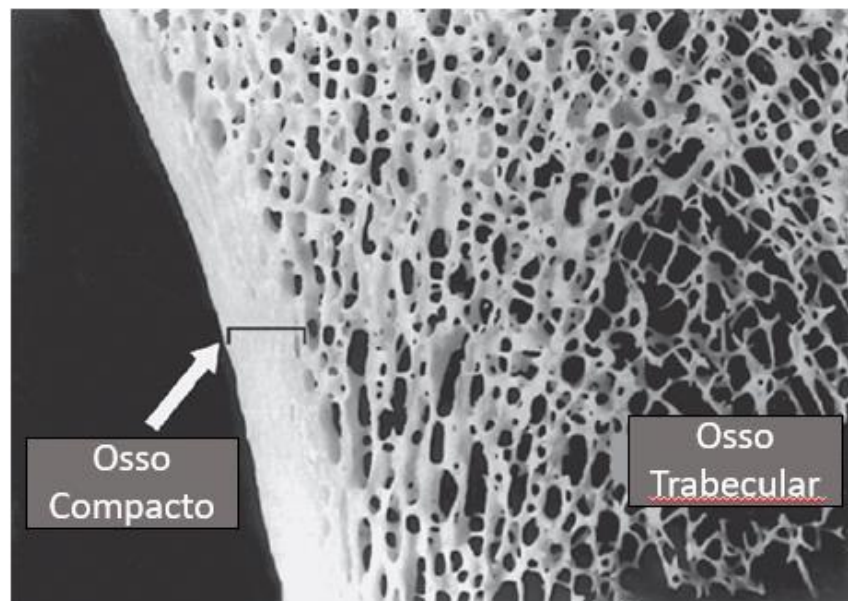
Aproximadamente, 10% do volume total do osso é composto por células ósseas, que são originadas a partir de duas linhas celulares: osteoprogenitora, ou células-tronco mesenquimais que se diferenciarem em osteoblastos e osteócitos; e os osteoclastos, que são de origem hematopoiética (POLO-CORRALES, ESTEVER, VICK, 2014).

A função dos osteoblastos está relacionada com a formação do osso. Os osteócitos são as células mais abundantes do osso e promovem a manutenção ao tecido, e os osteoclastos intervêm na reabsorção óssea (BOSE *et al.* 2013).

Macroscopicamente, é possível classificar o tecido ósseo em dois tipos (Figura1). O primeiro tipo é o osso trabecular ou osso esponjoso, com 50-95% de porosidade. O segundo tipo é o osso cortical ou compacto, com porosidade de 5-10% e diferentes tipos de poros. Como citado anteriormente, o osso é caracterizado por sua capacidade de crescimento, regeneração e remodelamento. Seu processo de formação envolve a atividade de células tronco mesenquimais que podem se diferenciar diretamente em osteoblastos ou em condrócitos, que serão posteriormente substituídos por osteoblastos (AMINI *et al.* 2012).

A consolidação óssea é um processo extremamente complexo e que pode ser dividido em três fases: inflamatória, reparo e remodelamento (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

**Figura 1:** Corte transversal de um osso mostrando a estrutura interna do osso. O osso compacto denso externo (também chamado de osso cortical) e o osso interno esponjoso preenchido com espículas (trabecular).



Fonte: Adaptado de Mesher AI: Junqueira Histologia Básica: Texto e atlas, 12 edição: <http://www.accessmedicine.com>, Editora McGraw-Hill.

A fase inflamatória começa imediatamente após a fratura, com a formação de um hematoma que preenche rapidamente o intervalo da fratura, também denominado foco fraturário. O exsudato do hematoma contém vários mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, células locais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (SOUSA, 2003; DYCE *et al.*, 2004).

A regeneração do tecido ósseo não ocorre sem a angiogênese, uma rede de capilares neoformada no início do processo de reparo, necessária para que o osso possa receber nutrientes para o desenvolvimento dos eventos celulares do processo (DYCE *et al.*, 2004; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

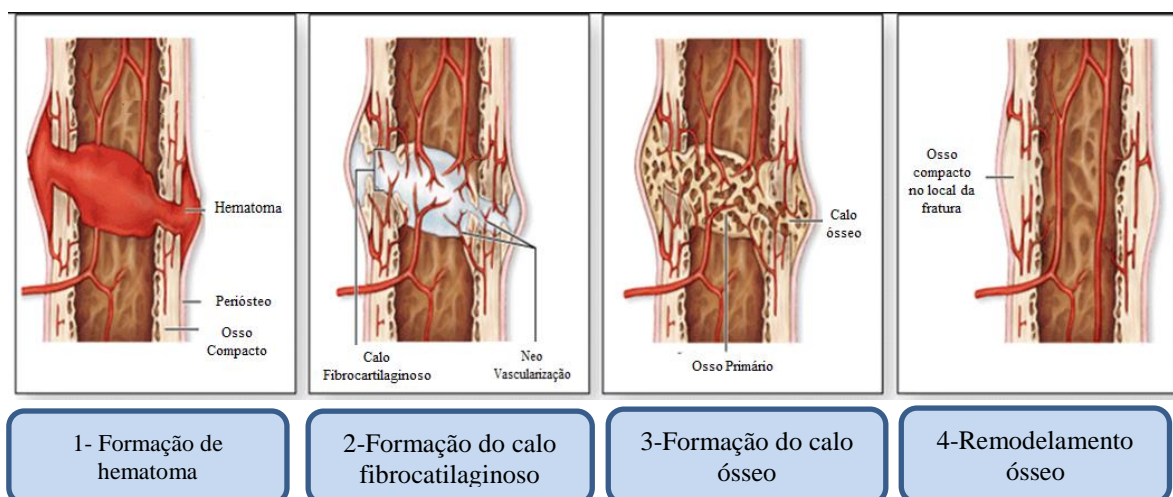
A característica mais evidente nos estágios iniciais do processo de reparo é a proliferação de células do periósteo e do endósteo próximos à fratura. Tais células são precursoras de osteoblastos, que posteriormente sedimentarão a substância intercelular (CROCI *et al.*, 2003).

O tecido celular formado após a fratura se diferencia em osteoblastos ou condroblastos. Os osteoblastos depositam uma matriz intercelular de colágeno e

polissacarídeos que se torna impregnada de sais de cálcio, formando o osso primário que se transforma, gradualmente, em osso maduro, com conformação lamelar típica, denominado calo ósseo (CROCI *et al.*, 2003; BETTI, 2004).

Este calo é posteriormente reabsorvido. Neste processo, atuam os osteoclastos e osteoblastos, removendo e depositando osso respectivamente (SOUSA, 2003). Os osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados. Por outro lado, a reabsorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos (BETTI, 2004) (Figura 2).

**Figura 2:** Processo de reparo ósseo. O reparo das fraturas envolve uma série de etapas progressivas: (1) formação de hematoma, (2) formação de calo fibrocartilaginoso, (3) formação de calo ósseo e (4) remodelação do calo ósseo.



Fonte: Adaptado de Mesher, Al: Junqueira Histologia Básica: Texto e atlas, 12 edição: <http://www.accessmedicine.com>, Editora McGraw-Hill.

## 2.2 ENXERTO ÓSSEO

Ao contrário de outros tecidos, a maioria das lesões ósseas é reparada sem a formação de um tecido cicatricial, o osso é regenerado com suas propriedades pré-existent restauradas, restaurando sua função e estrutura originais (DIMITRIOU *et al.*, 2011).

No entanto, em casos de grandes defeitos ósseos, onde a quantidade de osso é maior que a capacidade intrínseca de reparo, ou para reconstrução de grandes defeitos ósseos criados por trauma, infecção, ressecção de tumores e/ou anormalidades esqueléticas, ou casos em que

o processo de regeneração é comprometido, incluindo os casos de necrose avascular, o enxerto ósseo é uma das opções mais utilizadas (DIMITRIOU, 2011).

Um enxerto ósseo é definido como um material implantado que promove o reparo ósseo isoladamente ou em combinação com outro(s) material(is), por meio de osteogênese, osteoindução e osteocondução. A seleção de um enxerto ósseo depende de vários fatores tais como a viabilidade do tecido, o tamanho do defeito, o tamanho do enxerto, sua forma e volume, características biomecânicas, os custos relacionados ao enxerto, questões éticas, características biológicas e outras complicações associadas. Os materiais utilizados no enxerto ósseo podem ser divididos em várias categorias de acordo com a sua origem, incluindo autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos (ORYAN *et al.*, 2014).

Atualmente os autoenxertos são considerados o "padrão ouro" na reconstrução de defeitos ósseos. Também denominado como enxerto autólogo, envolve a utilização de um osso obtido a partir do próprio indivíduo que o receberá. Este material apresenta propriedades osteoindutoras e osteocondutoras essenciais para a formação óssea, além de disponibilizar fatores de crescimento e células osteogênicas sem a determinação de nenhuma reação imune. Contudo, existem as desvantagens como possível dor e complicações no local doador, probabilidade de perda de sangue ou hematomas, infecções, fraturas, lesões neurovasculares, além disso, a disponibilidade de osso autógeno em um paciente representa um limitante significativo (ATHANASIOU, 2010; EHRLER, VACCARO, 2000).

Os aloenxertos, ossos recolhidos a partir de um cadáver da mesma espécie, representam uma alternativa para os autoenxertos, porém, também apresentam limitações, como o alto custo, são pouco osteoindutores, com baixa propriedade mecânica, além dos potenciais riscos de infecções (YAZAR, 2010; MOSHIRI, ORYAN, 2012).

Nos xenoenxertos, o tecido a ser implantado é originado de uma espécie diferente da espécie humana (bovino ou suíno), que pode ser liofilizado, desmineralizado ou desproteínizado. São de fácil disponibilização, são osteocondutores, apresentam boas propriedades mecânicas e são de baixo custo. Em contrapartida, apresentam uma grande desvantagem que está relacionada com o risco das zoonoses transmitidas dos animais para os seres humanos, sendo, por este motivo, pouco utilizados. (MOSHIRI, ORYAN, 2012; ORYAN, ALIDADI, MOSHIRI, 2013)

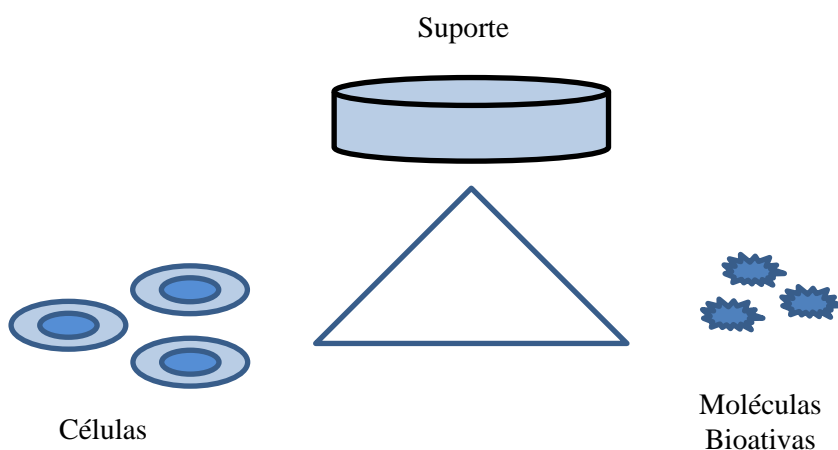
## 2.3 MEDICINA REGENERATIVA ÓSSEA

Com a evolução acelerada da biotecnologia nas últimas décadas do século XX, tanto ao nível da obtenção de novos conhecimentos como também no aumento do número de processos biotecnológicos e do seu emprego na criação de materiais e dispositivos aplicados nas áreas da saúde e da prestação de serviços, surge a medicina regenerativa (M.R.) (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A MR vem sendo utilizada como opção alternativa dos tratamentos convencionais, com a finalidade de reduzir os problemas anteriormente descritos, e é definida como a prática de substituir tecidos e órgãos danificados estimulando mecanismos intrínsecos de reparo do corpo para reestabelecer as funções normais do tecido, utilizando suportes biológicos associados a moléculas bioativas e/ou células tronco (SACHLOS, CZERNUSZKA, 2003; ROSENTHAL, BADYLAK, 2016).

Trata-se de uma ciência multidisciplinar, que aplica princípios das engenharias e das ciências biológicas, através da combinação de conhecimento da física, química, engenharia de materiais, biologia e medicina de forma integrada para alcançar o objetivo final, criar substitutos teciduais que melhorem o reparo e a regeneração (O'KEEFE, MAO, 2011).

**Figura 3:** Estratégia da medicina regenerativa A MR é baseada na utilização, de forma individual ou associada, de: (1) suporte biocompatível que mimetize a matriz extracelular óssea natural, (2) células tronco, (3) moléculas bioativas que ajudem a orientar as células para o reparo tecidual.



Fonte: AMINI *et. al*, 2012.

### **2.3.1 O SUPORTE**

A estratégia da medicina regenerativa, geralmente, tem início com a produção de um suporte, que representa uma estrutura temporária que atua como molde de matriz extracelular, auxiliando na proliferação celular e estimulando o crescimento do novo tecido (LITCHE, 2011). Além disso, atuam como modelo para a neovascularização e podem participar ativamente no processo de regeneração através da liberação de fatores de crescimento ou diferenciação, presentes em sua estrutura (SALGADO, COUTINHO, REIS, 2003)

O suporte ideal deve ser (1) tridimensional e altamente poroso, com uma rede interligada de poros para o crescimento celular e transporte de nutrientes e resíduos metabólicos; (2) deve ter propriedades de superfície que proporcionem a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular; (3) ser biocompatível, não induzir uma resposta imune, (4) que seja biodegradável com uma taxa de degradação controlável para complementar a maturação do tecido; (5) as propriedades mecânicas devem ser compatíveis com as do tecido no local de implantação e (6) a estrutura do suporte deve ser fácil e eficientemente reproduzível em vários formatos e tamanhos (HENKEL, 2013). Outros critérios importantes na concepção dos suportes incluem o tipo de material e a facilidade de produção e manipulação.

### ***OS BIOPOLÍMEROS***

Polímeros são moléculas longas, de alto peso molecular, sintetizadas a partir de vários monômeros de repetição (PARK, *et. al*, 2016), formados portanto, pela união destas unidades repetitivas monoméricas.

Estes materiais apresentam características variáveis, sendo que muitos deles apresentam boas características de processamento, o que permite a produção de peças, custo razoável e disponibilidade de encontrar materiais com propriedades físicas e mecânicas desejadas para aplicações específicas. Estas características fazem com que os polímeros sejam utilizados com sucesso na área da saúde, principalmente na produção de dispositivos biomédicos, materiais implantáveis, órgãos artificiais e na produção de suportes para o uso em medicina regenerativa (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

Para tal aplicação destaca-se a classe dos biodegradáveis, polímeros que se hidrolisam e resultam em subprodutos não tóxicos que podem ser excretados ou absorvidos pelo organismo (DHANDAYUTHAPANI, 2011). Por esta razão, estes polímeros tem se mostrado

um material eficiente para a produção de suportes biológicos para medicina regenerativa, pois a degradação do suporte se dá ao longo do tempo, em sincronia com a neoangiogênese, na qual os poros e os espaços liberados pelos polímeros degradados são preenchidos pelo tecido recém-formado (HUTMACHER, 2012).

Os polímeros são classificados como naturais (polissacáridos e proteínas) ou sintéticos (ésteres, amidas, éteres, uretanos) ou de acordo com sua origem.

Os polímeros biodegradáveis naturais apresentam baixo teor imunogênico, com potencial bioativo, capazes de interagir com o tecido hospedeiro (SALGADO, COUTINHO, REI, 2004); os polímeros biodegradáveis sintéticos apresentam vantagens como controle da cinética de degradação, podendo ser facilmente produzidos e moldados de acordo com a necessidade da utilização (PLANELL *et al.*, 2009).

## A FIBRINA

A fibrina, um biopolímero natural, é uma proteína, que em condições fisiológicas desempenha um papel importante na hemostasia, uma vez que em ação conjunta com as plaquetas, produzem um suporte tridimensional sobre o local lesionado com a finalidade de estancar o sangramento (MOSESSON, 2005).

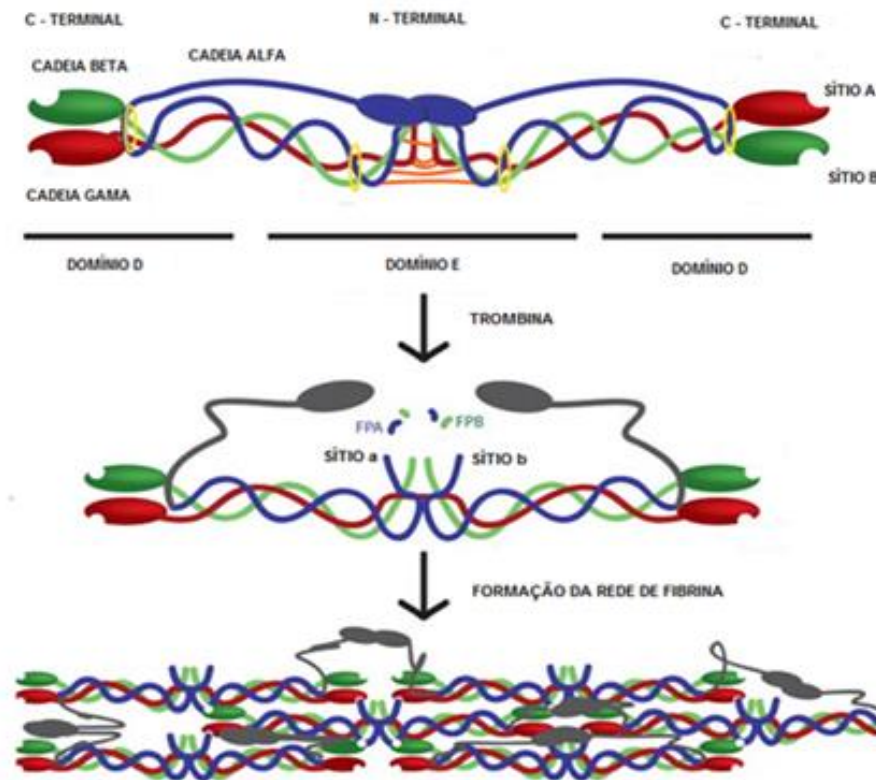
A matriz de fibrina é formada a partir de seu monômero, o fibrinogênio, uma proteína solúvel, abundante no plasma. Estruturalmente é formado por duas cadeias  $\alpha$ , duas cadeias  $\beta$  e duas cadeias  $\gamma$  unidas por ligações dissulfeto. As regiões C-terminais das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  formam os domínios D, e as regiões N-terminais das cadeias restantes, formam o domínio E. Os domínios D se encontram conectados ao domínio E por dois segmentos de  $\alpha$ -hélices contorcidas. As regiões C-terminais  $\alpha$  são globulares e encontram-se ligadas ao domínio E (BURTON *et al.*, 2006; TSURUPA *et al.*, 2009). (Figura 5A)

O processo de formação da fibrina tem início com a clivagem proteolítica da região N-terminal de  $\alpha$  e  $\beta$ , pela trombina, com a liberação dos fibrinopeptídeo A (FPA) e B (FPB). Esta clivagem enzimática expõe as sequências peptídicas N-terminais das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , designados por sítios "a" e "b", respectivamente, que são ficam disponíveis para interagir com sítios complementares 'A' e 'B' localizados nos terminais C das cadeias respectivamente (Figura 5B). (BROWM, 2014).



A malha de fibrina vem sendo utilizada como selante em várias aplicações cirúrgicas e na utilização de suportes para o uso em medicina regenerativa, podendo ser obtida comercialmente ou de fonte autóloga.

**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura do fibrinogênio. As cadeias  $\alpha$  são mostradas em azul, as cadeias  $\beta$  são mostradas em verde e as cadeias  $\gamma$  são mostrados em vermelho. Após ativação com trombina ocorre a polimerização da matriz de fibrina.



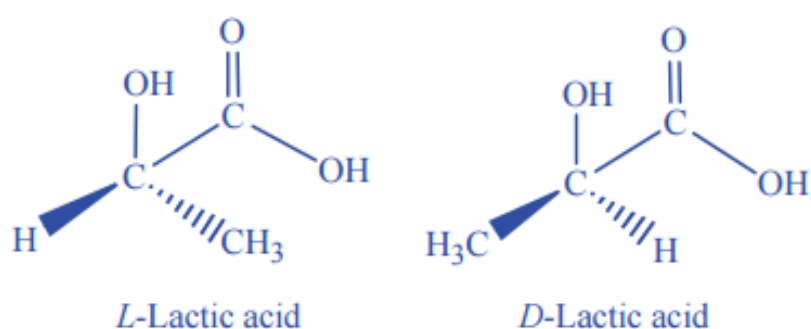
Fonte: BROWN *et al.*, 2014

Quando obtidas de fonte autóloga, a estrutura tridimensional da malha de fibrina proporciona a adesão, migração e multiplicação das células em todo o suporte, facilitam a difusão de nutrientes e resíduos e o desenvolvimento na neovascularização, além disso, estimula e acelera o reparo por influencia dos fatores de crescimento aprisionados no coágulo (DE LA PUENTE, 2014)

## O POLI ÁCIDO LÁCTICO (PLA)

O PLA é um polímero sintético, sintetizado a partir do ácido láctico ( $\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$ ), uma molécula quiral simples que existe na forma de dois enantiômeros, L- e D-láctico, que diferem no seu efeito de luz polarizada, como mostra Figura 6 (XIAO *et al.*, 2012).

**Figura 5:** Moléculas de PLA na forma dos enantiômeros do PLLA e PDLA.



Fonte: XIÃO *et al.*, 2012.

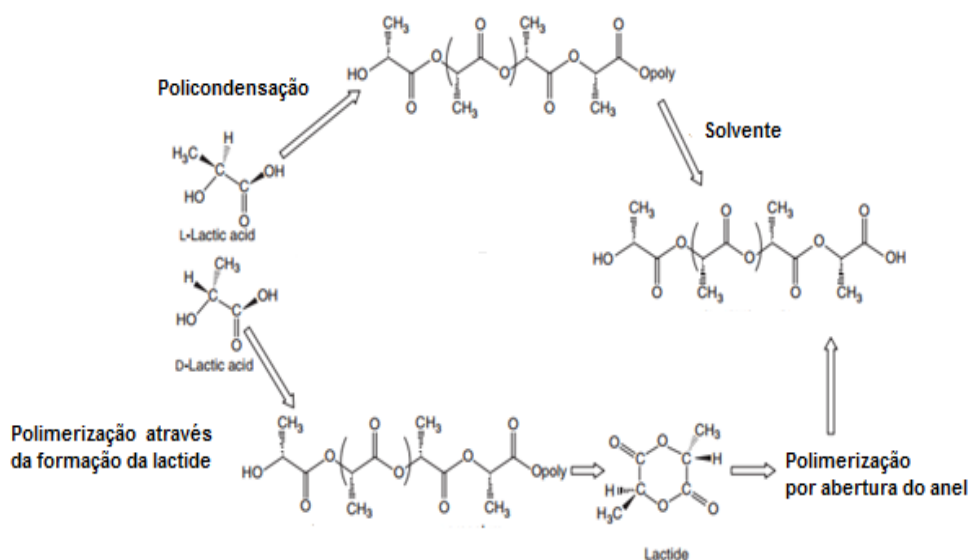
Sendo assim, o PLA possui dois estereoisômeros: poli(L-ácido láctico) (PLLA) e o poli(D-ácido láctico) (PDLA), sua mistura racêmica gera o poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) (VERT *et al.*, 1992). O PDLA e o PLLA são imagens espaciais um do outro, ambos opticamente puros e semicristalinos (AURAS, 2010), enquanto o PDLLA é racêmico, amorfo e opticamente inativo (TSUJI, 1996)

A síntese do PLA pode ocorrer por diversas rotas químicas incluindo policondensação, polimerização direta e polimerização por abertura de anel. As rotas mais utilizadas para a produção do PLA são a policondensação e a polimerização por abertura de anel. (Figura 7) (AVINE; KHODDAMI, 2010).

O processo de policondensação é realizado a vácuo, a alta temperatura e com a utilização de solventes para a extração de água produzida pela reação de condensação. A polimerização via abertura de anel envolve um dímero cíclico de ácido láctico, o lactídeo, na presença de um catalisador. Durante a síntese é possível associar tempo, temperatura e concentração do catalisador o que permite controlar as proporções e as sequências de unidades de D- e L-láctico no polímero final (LOPES *et al.*, 2014).

O PLA é um poliéster hidrofóbico e hidroliticamente degradável, gerando dióxido de carbono e água que são eliminados através do ciclo de Krebs e na urina (LUNELLI, 2012).

**Figura 6:** Processos de síntese do PLA.



**Fonte:** Adaptado de Auras *et al.*, 2010.

Por apresentar características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de apresentar boa resistência mecânica, elevado módulo Young, elevada plasticidade térmica e capacidade de processamento, tem sido utilizado com sucesso em aplicações biomédicas, como *stents*, suturas cirúrgicas, placas e parafusos para fixação óssea craniomaxilofacial, parafusos de interferência no tornozelo, no joelho e na mão; tachas e alfinetes para ligamentos, âncoras, gaiolas espinhais, implantes de tecidos moles, dispositivos de liberação de fármacos suportes para o uso em medicina regenerativa (FARAH, ANDERSON, LANGER, 2016).

Para o uso em medicina regenerativa, o PLA é um polímero promissor, pois é facilmente moldável, altamente reprodutível e podem ser sintetizados em grandes quantidades (CHENG *et al.*, 2009).

Além disso, devido a sua transição vítrea que varia entre 55 a 59°C é considerado material ideal para a produção de suportes tridimensionais porosos utilizando a tecnologia de impressão 3D.

## A MANUFATURA ADITIVA

A manufatura aditiva (MA), também conhecida popularmente como impressão 3D, é uma tecnologia que constrói objetos com ampla variedade de tamanhos, camada por camada, feito de polímeros, cerâmica, metal ou outros materiais (LIPSON, 2012). Esta tecnologia está sendo aplicados em uma escala de customização de aplicações médicas, incluindo próteses, implantes, suportes para uso em medicina regenerativa e modelos anatômicos baseados em imagem (WONG; PFAHNL, 2014).

A MA baseia-se no (1) uso de um *software* de desenho assistido por computador (*Computer Assisted Design*) para a criação de um protótipo virtual, com a geometria e porosidade pretendidas para a construção do suporte; (2) a transfiguração do protótipo criado em contínuas camadas através de um *software* de execução assistida por computador (*Computer Assisted Manufacturing*); e (3) a elaboração do suporte fundamentada na concepção de camada por camada pela adição de várias porções de material (BOSE, 2013).

Dentre as várias técnicas existentes, destaca-se a modelagem por fusão e deposição (FDM) A tecnologia FDM adiciona material na forma de um filamento polimérico o qual é extrudado. O princípio da adição de material consiste na extrusão de um filamento termoplástico aquecido (em estado semi-líquido). A construção do protótipo é realizada através do cabeçote de extrusão que se move num plano X-Y e uma plataforma que, conforme decorrida a deposição de uma camada, se movimenta no eixo Z (VOLPATO *et al.*, 2007).

A cabine da máquina é mantida sob uma temperatura inferior à do material que esta sendo depositado, de forma que o mesmo endurece rapidamente ao contato com a camada anterior. Após esse endurecimento a plataforma é abaixada ligeiramente e o bocal de extrusão deposita uma nova camada sobre a anterior. A plataforma é movida na direção do eixo Z ao término de cada camada, deslocando-se numa distância equivalente à espessura da mesma. Nesta plataforma, existe uma base de poliuretano poroso rígido ou uma placa de policarbonato que garante a planicidade da superfície e serve de âncora para a fixação do protótipo (VOLPATO *et al.*, 2007).

Dentre as vantagens desta técnica, destacam-se a rapidez de obtenção de suportes com geometrias complexas e a redução do planeamento de produção, através de uma sequência única, segundo a qual é possível controlar dimensões, geometria e distribuição dos poros, garantindo a sua interconectividade (CHIA; WU, 2015).

### 2.3.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL

Células-tronco são células indiferenciadas, sem função específica nos tecidos, capazes de multiplicar-se mantendo-se indiferenciada por longos períodos (*in vitro* ou *in vivo*, mas que diante de estímulos específicos podem se diferenciar em células maduras e funcionais dos tecidos (ZAGO, COVAS, 2007). As células tronco têm a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, apresentam capacidade de autorrenovação, capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado e proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, mais interessante ainda, sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, tornando-as extremamente interessantes dentro do campo da medicina regenerativa (LEMISCHKA, 2005).

As células-tronco estão presentes no embrião, quando são designadas células-tronco embrionárias, mas podem também ser encontradas em tecidos adultos, originando as células-tronco adultas (VOGEL, 2003).

As células tronco mesenquimais (CTMs) são progenitores multipotentes, isoladas a partir de um tecido adulto e apresentam a capacidade de se proliferar e se diferenciar preferencialmente em osteoblasto, adipócitos e condrócitos (PITTENGER *et al.*, 1999).

Com a finalidade de identificar as CTMs, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs critérios mínimos de classificação: (1) estas células devem ter a capacidade de aderência às superfícies plásticas, (2) devem expressar as moléculas de superfície CD105, CD 73 e CD 90 (típicas de células da mesoderme) e não expressar CD34(marcador de progenitores hematopoiéticos e endoteliais), CD45(marcador leucocitário), CD14 (marcadores de monócitos e macrófagos), CD79 $\alpha$  OU CD19(marcadores de células B), (3) devem se diferenciar, *in vitro*, em tecidos de origem mesenquimal (LV *et al.*, 2014).

Estas células multipotentes podem ser isoladas de diferentes fontes, tais como medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, sangue periférico, entre outros. Células tronco derivadas da medula óssea foram isoladas e extensivamente caracterizadas, sendo as mais utilizadas. No entanto, o procedimento de extração é altamente invasivo e determina elevada morbidade aos pacientes. As CTMs isoladas a partir de tecido adiposo representam uma boa alternativa e, recentemente, foi demonstrado que a gordura infrapatelar contém células tronco altamente clonogênicas e com elevado potencial osteogênico (JURGENS, *et al.*, 2009).

### 2.3.3 MOLÉCULAS BIOATIVAS

São consideradas moléculas bioativas aquelas que sinalizam e modulam a atividade celular, promovendo a viabilidade e o desenvolvimento do tecido, a adesão celular, migração e diferenciação celular e também a síntese de proteínas. Dentre elas destacam-se os hormônios, as citocinas, os fatores de crescimento entre outros (MITCHELL *et al.*, 2015).

Os fatores de crescimento (FC) são proteínas morfogenéticas que instruem o comportamento das células e guiam a regeneração e renovação dos tecidos. São proteínas secretadas naturalmente a partir de células circulantes ou teciduais que podem interagir com a matriz extracelular, estimulando a transdução de sinais e desencadeando eventos como migração adesão, proliferação e divisão celular. Numa escala maior, essas respostas celulares, estimuladas pelos fatores de crescimento, estão envolvidas no desenvolvimento dos organismos, angiogênese e reparo tecidual (MITCHELL *et al.*, 2015).

FCs autólogos podem ser obtidos a partir da tecnologia de plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP é o aumento da concentração de plaquetas no plasma sanguíneo. Em um indivíduo normal, a quantidade média de plaquetas circulantes no sangue varia entre 150.000 a 350.000 / $\mu$ L, enquanto que o PRP é frequentemente definido como pelo menos 1.000.000 de plaquetas / $\mu$ L de plasma (ARNOCZKY *et al.*, 2011).

As plaquetas são fragmentos celulares, em forma de discos, anucleados, derivados dos megacariócitos da medula óssea. Sua estrutura é composta por citoesqueleto e filamentos de actina e miosina. No citosol encontram-se numerosas organelas incluindo peroxissomos, lisossomos, mitocôndrias, grânulos  $\alpha$  e grânulos densos (THON; ITALIANO, 2012).

Os grânulos  $\alpha$  são considerados como os principais reservatórios biológicos de fatores de crescimento, os quais são cruciais na regeneração, cicatrização e angiogênese do tecido. Dentre inúmeros fatores de crescimento nos grânulos  $\alpha$ , destacam fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-I), fator de crescimento de transformação  $\beta$  tipo 1 (TGF- $\beta$  1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epitelial (EGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF), entre outros (ARNOCZKY *et al.*, 2011).

Quando as plaquetas são ativadas, elas mudam sua conformação, passando a ser esféricas, emitem pseudópodes que promovem a agregação plaquetária e posterior liberação do conteúdo dos grânulos via sistema canicular (THON; ITALIANO, 2012).

Sendo assim, considerando as plaquetas como veículo de armazenamento de fatores de crescimento, o PRP tem sido considerado um ótimo estimulador no reparo de tecidos para o uso em MR.

### **3. HIPÓTESE**

É possível construir de um suporte tridimensional rígido, customizável, bioativo e celularizado a partir da associação de células tronco mesenquimais adultas, filamentos de PLA e fibrina oriunda de plasma sanguíneo contendo altas concentrações de plaquetas. Com tais características, essa estratégia poderia ser futuramente utilizada em medicina regenerativa óssea.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVOS GERAIS**

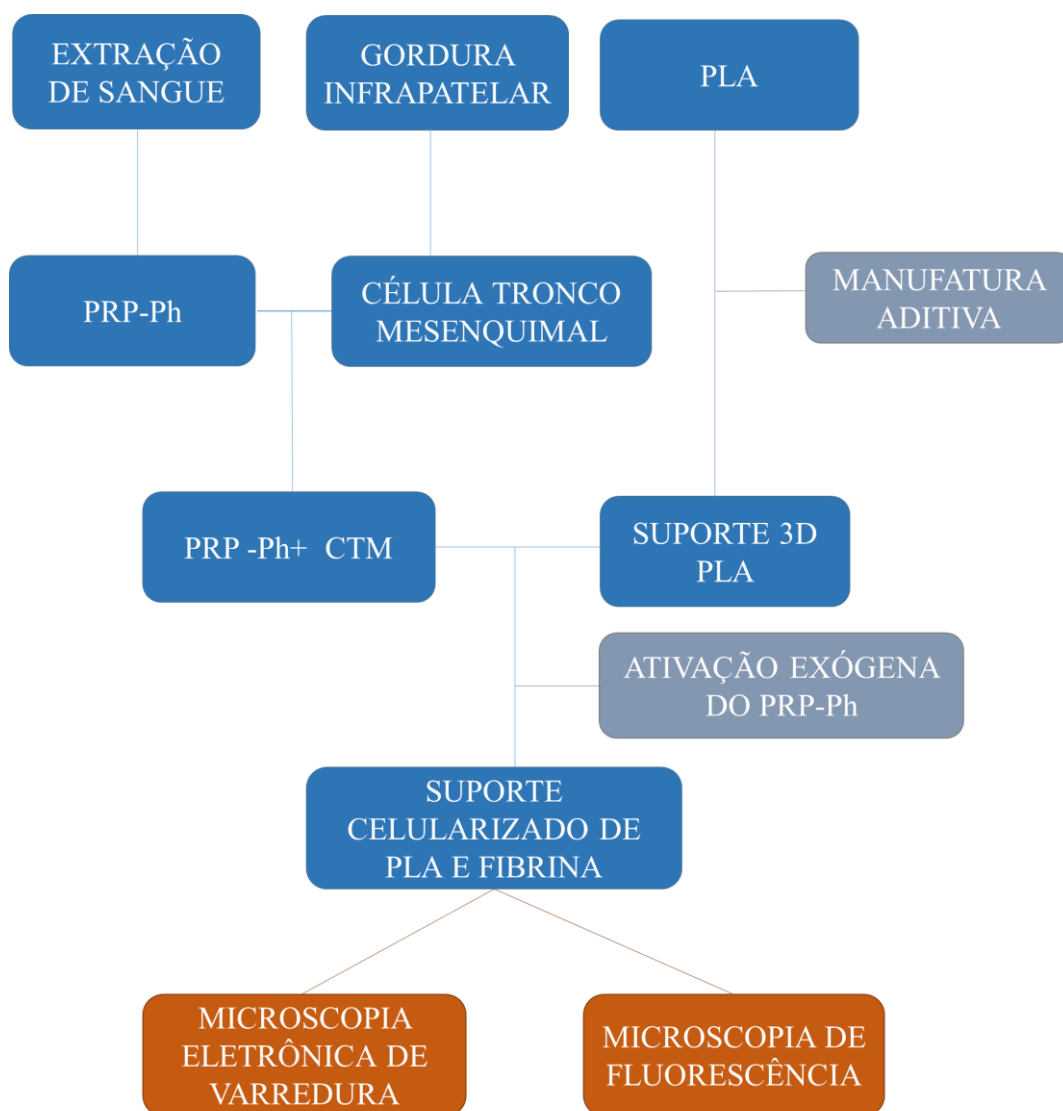
O objetivo desta pesquisa foi elaborar uma “prova de conceito” para um suporte tridimensional de PLA e fibrina celularizado e avaliar, *in vitro*, sua viabilidade e bioatividade, buscando estabelecer a potencialidade dessa estratégia para o uso futuro em medicina regenerativa óssea.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Produzir suportes de PLA, em conformação tridimensional, a partir da técnica de MA por FDM (*Fused Deposition Modeling*). Pretende-se obter um suporte tridimensional rígido e com poros micrométricos interconectados;
- Produzir um suporte de fibrina a partir da técnica do Plasma Rico em Plaquetas- Puro humano (PRP-Ph) capaz de preencher os poros de PLA e atuar como matriz de interação celular que proporcione a sua manutenção em conformação tridimensional;
- Utilizar os fatores de crescimento (FC) plaquetários, associadas ao PRP-Ph, como fonte de fatores de crescimento para manutenção de viabilidade, conferindo assim bioatividade ao suporte;
- Extrair Célula Tronco Mesenquimal de Gordura Infrapatelar de Joelho humano (CTMGih), caracterizar e testar atividade de multilinhagem em adipócitos e osteoblastos;
- Celularizar o suporte de PLA e fibrina com as CTMGih a fim de avaliar, *in vitro*, o potencial de viabilidade intrínseco do suporte (bioatividade).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

**Figura 7:** Organograma representativo das etapas experimentais para obtenção do suporte tridimensional de PLA e fibrina bioativo celularizado.



## 5.1 SUJEITOS

Para esta pesquisa, foram selecionados dois voluntários clinicamente saudáveis. O primeiro, um homem de 30 anos de idade, não fumante e que não fez uso de medicamento nos 6 meses que antecederam a coleta do material biológico (sangue). O segundo, uma mulher de 35 anos, que foi submetida a um procedimento cirúrgico artroscópico do joelho como forma de tratamento de uma lesão de menisco.

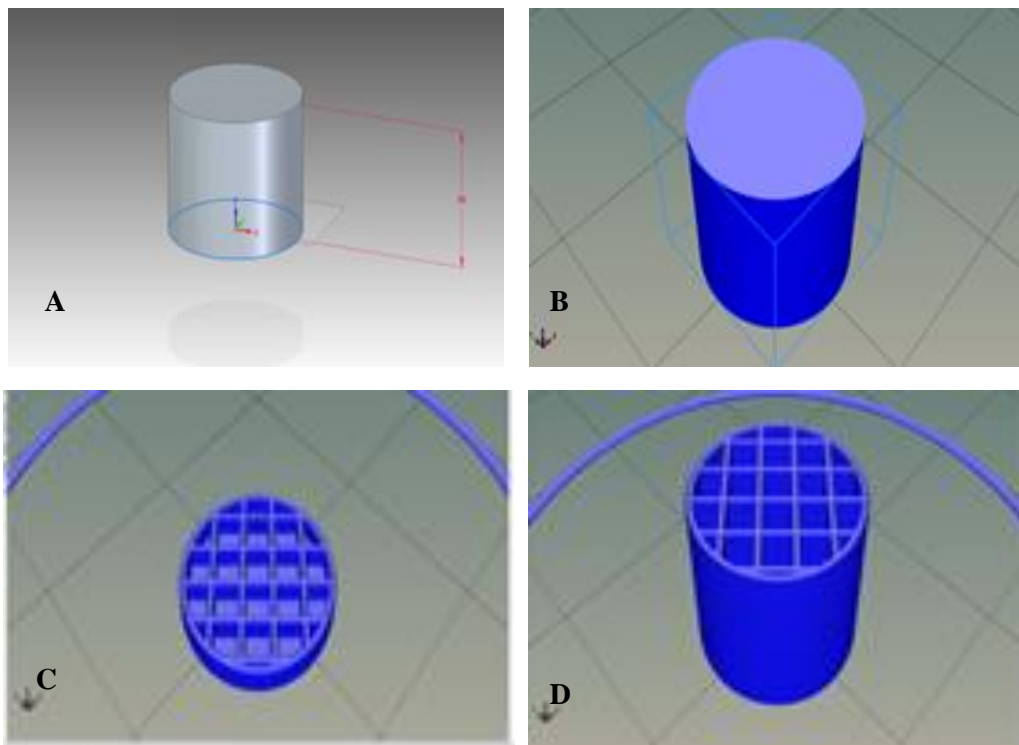
Os voluntários submetidos a esta pesquisa assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com as normas previstas pela CNS nº 441, de 2012 do Ministério da Saúde. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Araraquara, CEP UNIARA, sob o registro 1.438.584.

## 5.2 SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA

Os suportes foram planejados e projetados utilizando o *software* CAD (*computer aided drawing*), que possibilitou o desenho de um cilindro de 8 mm de diâmetro, 10 mm de altura, com fundo sólido e borda, preenchido internamente com padrão em grade com 2mm de distância entre os as traves. Após desenho no CAD, o arquivo da imagem foi transferido para um outro *software*, denominado *Slicer*, que controla a impressão via computador, fatiando o modelo após definidos de parâmetros, como tipo de material, temperatura, velocidade de impressão, qualidade de impressão, estrutura da peça, diâmetro da parede, preenchimento ou *grid* (Figura 7). Após a definição dos parâmetros a peça foi impressa por impressora 3D (UP3D Plus 2- modelo 3DP-14-4) utilizando filamentos de PLA natural (MovTech).

Esses suportes tridimensionais foram produzidos em parceria com os Docentes/pesquisadores Reginaldo Teixeira Coelho e Eraldo Jannone da Silva, o Doutorando Alex Bottene e o graduando Valmir Vieira Rocha Júnior, do Laboratório de Processos Avançados e Sustentabilidade (LAPRAS) da Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo em São Carlos - (EESC/USP)

**Figura 8:** Planejamento computacional dos suportes de PLA. A peça foi desenhada no software CAD (a) e transferida para o *software Slicer* (b). Após definidos os parâmetros a peça é fatiada. A imagem mostra as primeiras 11 camadas (c) e a peça finalizada com o total de 79 camadas (d).



### 5.3 FIBRINA RICA EM PLAQUETAS

#### 5.3.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS PURO - HUMANO (PRP-Ph)

Os procedimentos para obtenção e processamento do PRP-Ph foram realizados junto ao Laboratório de Hematologia e Imunologia da Universidade de Araraquara - UNIARA. O voluntário foi submetido à coleta de sangue periférico por meio de punção venosa realizada por profissional biomédico devidamente habilitado, seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial.

Foram colhidos 25mL de sangue do voluntário. O material foi acondicionado em 5 tubos estéreis a vácuo contendo anticoagulante (Citrato de sódio). Uma alíquota de 5 mL do sangue total foi encaminhada ao laboratório de análises clínicas da Santa Casa de Araraquara para a contagem de plaquetas, leucócitos e hemácias; os outros tubos, contendo 5 mL de

sangue, foram inicialmente centrifugados a 400g por 10 minutos. Após centrifugação, todo o plasma foi transferido para um tubo falcon de 15 mL e submetido à centrifugação de 700g por 17 minutos. O *pellet* formado foi ressuspenso em 2mL de plasma, que passou a constituir o PRP-Ph.

## **5.4 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE GORDURA INFRAPATELAR HUMANO (CTMG<sub>h</sub>)**

### **5.4.1 ISOLAMENTO DAS CTMG<sub>h</sub>**

Durante o procedimento de artroscopia, realizado em centro cirúrgico, fragmentos de gordura infrapatelar, resultantes do desbridamento do tecido foram colhidos, armazenados em tampão fosfato (PBS) 1X, mantidos em condições estéreis e encaminhados imediatamente para o Laboratório de Ensaios Celulares e Engenharia Regenerativa da Universidade de Araraquara - LECER/UNIARA.

As amostras de tecido foram submetidas à digestão enzimática através de imersão em solução contendo colagenase tipo-I (1mg/mL) (Sigma/Aldrich) e incubação a 37°C sob suave agitação. Concluída a fase de digestão, a colagenase foi removida através de lavagens com PBS, seguida por duas lavagens adicionais com meio de cultivo celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (SIGMA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (v/v) e 1% penicilina (10 000U)/estreptomicina (10mg). A amostra foi centrifugada a 300g por 3 minutos, para a formação do *pellet* de células. O *pellet* foi ressuspenso em DMEM contendo 10% de SBF e a suspensão acondicionada em garrafas para cultura de células de 75 cm<sup>2</sup> (KASVI) que foram, então, incubadas em estufa de cultura celular (Modelo - panasônico) à 37° C, com ar atmosférico umidificado contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48h o meio foi removido para o descarte das células não aderidas e fragmentos de matriz extracelular resultantes do processo de digestão enzimática. Quando as garrafas atingiram 80% de confluência, as células foram removidas com 0,25% de tripsina/EDTA (Sigma) para a realização do subcultivo.

### **5.4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMG<sub>h</sub> POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Os procedimentos para a caracterização das CTMG<sub>h</sub> foram realizados no Hemocentro de Campinas - UNICAMP, em parceria com a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ângela Cristina Malheiros Luzo,

diretora médica do Serviço de Transfusão e banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário.

A citometria de fluxo foi utilizada para caracterização fenotípica das CTMGIh, de acordo com o protocolo descrito por Dernowsek (2014). A análise foi realizada com células na 3<sup>a</sup> passagem e quando atingiu confluência, as CTMGIhs indiferenciadas foram caracterizadas por citometria de fluxo para avaliar a presença de moléculas de superfície celular CD73, CD90 e CD 31 que são consideradas marcadores característicos de células tronco mesenquimais. Para avaliar a possível presença de células tronco hematopoiéticas, foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34 e CD45.

Um contingente celular de  $1 \times 10^6$  CTMGIhs foi incubado separadamente com  $1 \mu\text{g}$  de anticorpos monoclonais, específicos para as moléculas de superfície acima citadas, 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com  $1 \mu\text{g}$  do anticorpo secundário por mais 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . As células foram novamente lavadas em PBS e, após, fixadas em formaldeído 2%. Como controle negativo de fluorescência, também foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade.

## **5.5 SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA E FIBRINA, BIOATIVOS CELULARIZADOS**

Para a celularização dos suportes tridimensionais de PLA e fibrina, os suportes de PLA foram esterilizados com imersão em álcool 70% por 30 minutos e submetidos à luz ultravioleta (UV) por 6 horas, fazendo inversão da peça a cada 1 hora.

Após esterilização as peças foram acondicionadas em placa de cultura de 48 poços com diâmetro de aproximadamente 8,4mm.

As CTMGIhs, em cultivo foram tripsinizadas e centrifugadas a 300g por 3 minutos. O *pellet* formado foi ressuspenso em  $500 \mu\text{L}$  de PRP-Ph.

A ativação do PRP-Ph celularizado se deu com a utilização com a adição  $83 \mu\text{L}$  de trombina e  $\text{CaCl}_2$  ( $10.000\text{U/mL}$ ).

Sabendo-se que a polimerização da fibrina, pela ação da solução de trombina e  $\text{CaCl}_2$ , se dá de forma imediata, o PRP-Ph celularizado e a referida solução de ativação foram

adicionados simultaneamente sobre o suporte de PLA, almejando a celularização por toda a estrutura tridimensional.

Os suportes foram mantidos em condições ideais de cultivo, com a isenção de SFB, nos períodos experimentais de 5 e 10 dias, sendo realizada a troca do meio de cultivo a cada 48 horas.

**Figura 9:** Representação ilustrativa da celularização do suporte de PLA e fibrina. A estrutura tridimensional de PLA foi acondicionada em placa de cultura. Um contingente celular de aproximadamente  $1 \times 10^5$  foi suspenso no PRP-Ph. Foi preparada uma solução de trombina e cloreto de cálcio. E ambas, as soluções, foram adicionadas simultaneamente sobre o suporte de PLA.



### 5.5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SUPORTE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A caracterização morfológica do suporte foi obtida por MEV (XL50, Philips). Estas análises foram realizadas junto ao Laboratório de Polímeros e Materiais de Fontes Renováveis- LPMFR, do Departamento de Engenharia de Materiais – SMM, Escola de Engenharia de São Carlos – EESC, Universidade de São Paulo – USP.

Para tal análise, os suportes foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) durante 40 min em temperatura ambiente e desidratados em sequência de álcool nas concentrações de 50%, 70%, 90% e 100%, mantidas por 15 minutos em cada concentração por 2 vezes. Após desidratação as amostras foram revestidas com carbono (Q150R Quorum Technologies) e analisadas por MEV.

## **5.6 BIOATIVIDADE DOS FATORES DE CRESCIMENTO PLAQUETARIOS**

Para avaliar a bioatividade, *in vitro*, dos FC plaquetários disponibilizados pela ativação do L-PRPh concomitantemente à polimerização da fibrina, foram preparados dois grupos experimentais distintos. No primeiro grupo os suportes tridimensionais de PLA e fibrina foram produzidos a partir do fibrinogênio autólogo, obtido pela técnica do L-PRPh. No segundo grupo os suportes tridimensionais de PLA e fibrina foram produzidos com a utilização de fibrinogênio comercial (Beriplast® P).

Ambos os suportes foram celularizados e mantidos em condições ideais de cultivo, com isenção total de fatores de crescimento oriundo de SFB, nos períodos de 5 e 10 dias de cultivo.

A potencialidade dos fatores de crescimento plaquetários, em relação à manutenção da viabilidade celular, foi avaliada utilizando análises de microscopia de fluorescência.

### **5.6.1 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

Os procedimentos para a caracterização dos suportes por meio de microscopia de fluorescência foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, em parceria com a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.

Para estas análises as amostras foram fixadas de acordo com o protocolo descrito acima. Após fixação, as células foram marcadas com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole), um corante fluorescente específico para marcação de núcleos celulares por 10 minutos.

Para a caracterização por microscopia de fluorescência foi utilizado o sistema de imagem *ImageXpress* (*Molecular Devices*) utilizando o *software Metaxpress*.

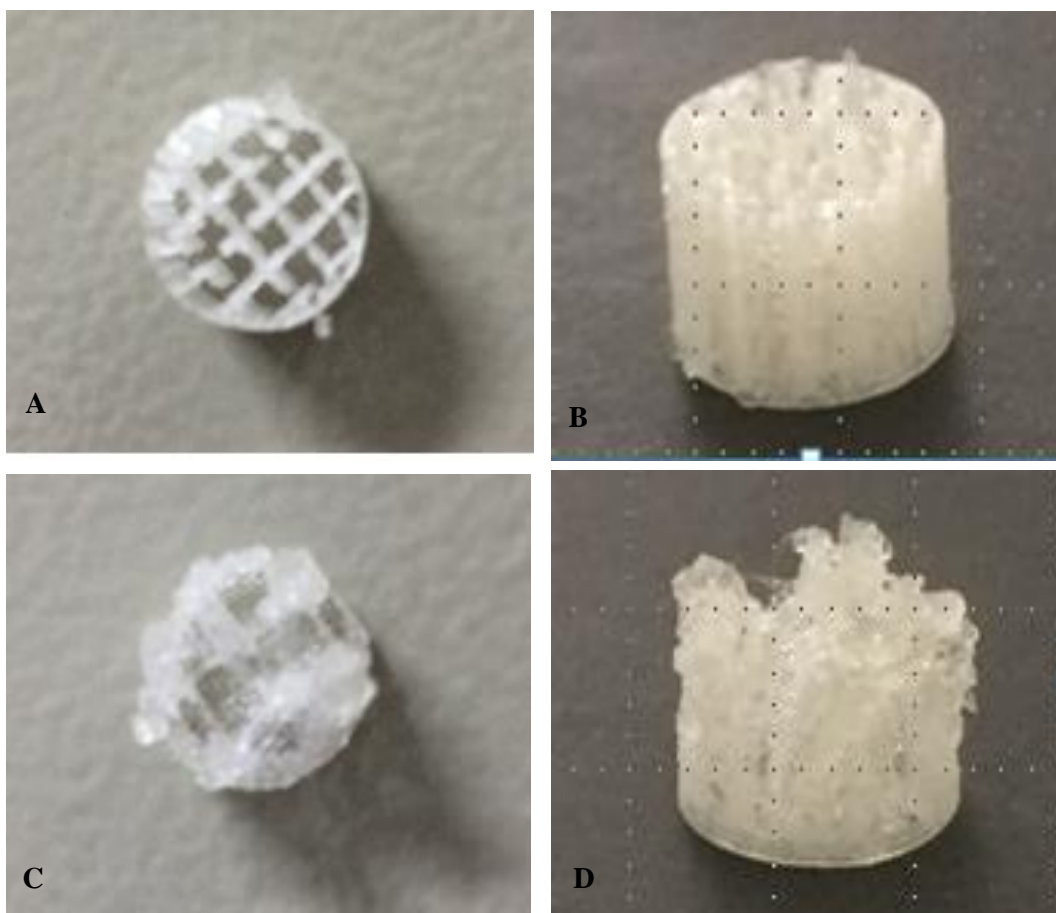


## 6. RESULTADOS

### 6.1 SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA:

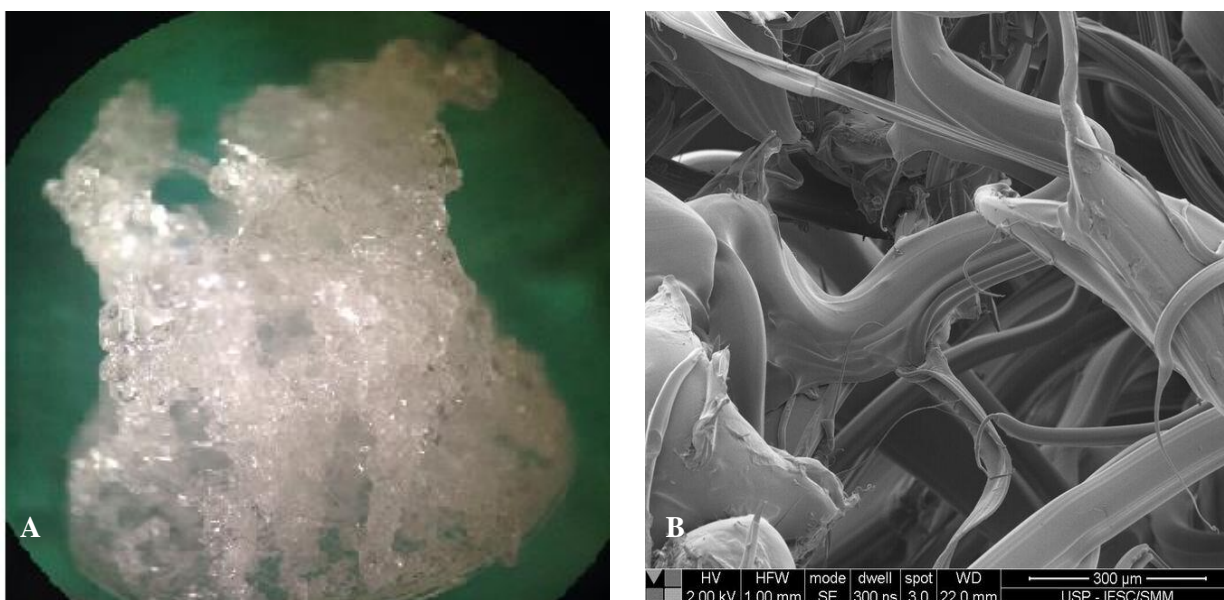
Considerando a tecnologia da impressão tridimensional pelo método FDM, as peças, quando extrudadas, tendem a possuir filamentos finos depositados de maneira homogênea, camada por camada, formando uma estrutura bem definida. Embora o resultado da impressão tenha gerado suportes que apresentavam elevado grau de porosidade, não se obtinha o padrão desejável de interconecção dos poros. Sendo assim, e conhecendo-se a influência dos parâmetros de operação da impressora, optou-se pelo aumento da velocidade padrão de impressão. Isso permitiu a obtenção de uma peça com deposição aleatória e desorganizada dos filamentos, o que proporcionou uma estrutura com porosidade micrométrica e poros interconectados, mimetizando fielmente o tecido ósseo trabecular (Figura 9).

**Figura 10:** Representação do planejamento computacional dos suportes tridimensionais de PLA (A e B). Suportes de PLA impressos de acordo com o planejamento computacional (C e D) e os suportes impressos com o aumento da velocidade de impressão (E e F).



A análise macroscópica dos suportes tridimensionais de PLA evidenciou uma estrutura aberta, com poros de dimensões variadas e interconectados. A caracterização microscópica realizada pela microscopia eletrônica de varredura demonstrou uma estrutura com elevado grau de porosidade, com poros com dimensões micrométricas heterogêneas e interconectados em todo suporte. Evidenciou-se ainda a heterogeneidade na espessura, conformação e relevo de superfície dos filamentos (Figura 10).

**Figura 11:** Caracterização macro (A) e microscópica através de MEV (B) dos suportes tridimensionais de PLA, demonstrando a alta porosidade no interior do suporte além de evidenciar os poros interconectados.



## 6.2 FIBRINA RICA EM PLAQUETAS.

### 6.2.1 PLASMA RICO EM PLAQUETAS PURO HUMANO (PRP-Ph):

A quantificação do contingente de plaquetas, leucócitos e hemácias no plasma sanguíneo, fracionado e utilizado para a produção da fibrina dentro do suporte de PLA, constituiu uma etapa essencial, considerando o objetivo de utilizar os FC produzidos e liberados pelas plaquetas concomitante a ativação da polimerização da fibrina. Os resultados de referência e a contagem de células no sangue e no plasma sanguíneo após fracionamento por centrifugação são descritos na tabela 1.

A contagem de células do sangue total foi compatível com os valores de referência de um indivíduo saudável em relação à quantidade de leucócitos e hemácias. Contudo, o número de plaquetas apresentou-se ligeiramente inferior ao valor limítrofe inferior de referência.

**Tabela 1:** Valores de referência de Leucócitos, Hemácias e Plaquetas no sangue total e valores referentes à quantificação dessas células no sangue total e no plasma fracionado após protocolo de centrifugação.

	<b>Valores de referência</b> (x10 <sup>3</sup> /μL)	<b>Sangue Total</b> (x10 <sup>3</sup> /μL)	<b>Plasma sanguíneo</b> (x10 <sup>3</sup> /μL)
<b>Leucócitos</b>	4 – 11	3,87	0,12
<b>Hemácias</b>	4.500 - 6.100	5.190	90
<b>Plaquetas</b>	150 – 400	145	986

Depois de realizado o protocolo de centrifugação, foi possível observar uma redução de 32 vezes no número de leucócitos e aproximadamente 57 vezes no número de hemácias no plasma quando comparados com os valores estabelecidos no sangue total. Em relação às plaquetas, houve um aumento de 7 vezes quando estabelecida a mesma comparação. Diante desses valores, foi possível confirmar a obtenção dos critérios de especificação compatíveis com um PRP-P.

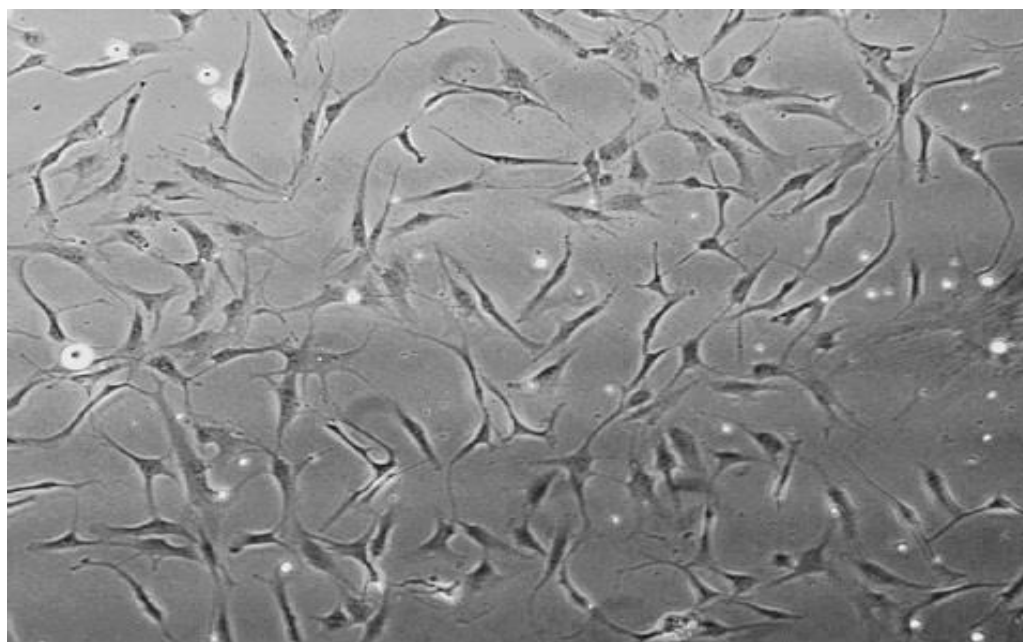
### **6.3 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL DE GORDURA INFRAPATELAR DE JOELHO HUMANO.**

#### **6.3.1 ISOLAMENTO DAS CTMGH**

Após transcorrido o período estabelecido de adesão do contingente mesenquimal, observou-se, pela microscopia ótica, uma cultura heterogênea, composta por células aderidas na superfície da garrafa de cultivo, células não aderidas e partículas lipídicas como sobrenadante no meio de cultivo. Fez-se, então, a troca do meio, o que proporcionou a remoção das células não aderentes e das partículas lipídicas, resultando em uma cultura homogênea, constituída apenas por células aderidas, com formato fusiforme e dispersas por

toda extensão da garrafa de cultivo (Figura 11). Tais características morfológica foram mantidas durante todo o período de cultivo.

**Figura 12:** Representação fotográfica das CTMGih, aderidas a garrafa de cultura, com formato fusiforme (100x).



### 6.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMGih.

O ensaio de citometria de fluxo realizado com as células isoladas da gordura infrapatelar de joelho humano demonstrou que um elevado percentual de células que constituíam o contingente analisado expressava os marcadores de superfície compatíveis com células tronco mesenquimais (CD90, CD73 E CD31) e não expressava os marcadores referentes ao perfil genotípico de células tronco hematopoiéticas (CD 34 e CD 45). Tais resultados confirmam que os processos de extração e isolamento realizados nessa pesquisa proporcionaram a obtenção de um contingente de células tronco mesenquimais.

## 6.4 SUPORTE TRIDIMENSIONAL CELULARIZADO DE PLA E FIBRINA

A análise macroscópica do suporte após ativação do PRP-Ph celularizado revelou uma polimerização instantânea da fibrina, o que determinou uma matriz de preenchimento dos poros existentes na configuração tridimensional do suporte de PLA (Figura 12).

**Figura 13:** Análise macroscópica de suportes de PLA. A esquerda observa-se um suporte tridimensional de PLA (A) e a direita um suporte tridimensional de PLA preenchido com a matriz de fibrina após polimerização (B).



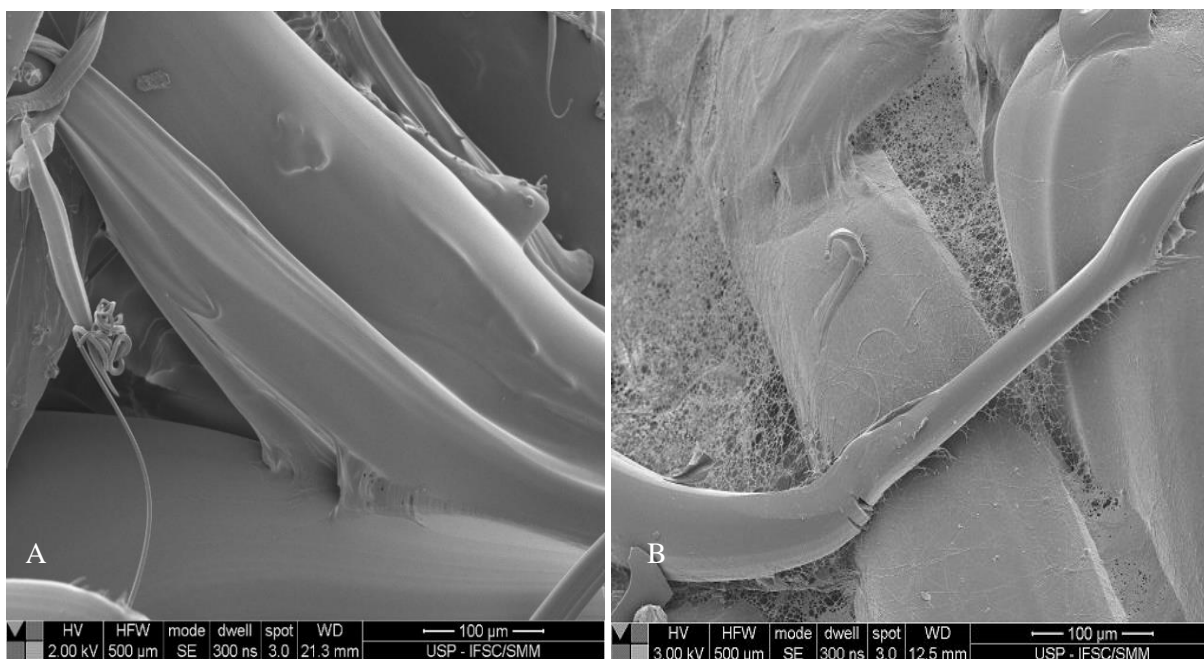
A caracterização estrutural por MEV demonstrou o preenchimento dos poros do suporte tridimensional de PLA pela matriz de fibrina, que exibiu uma organização reticulada. Foi possível observar ainda o revestimento e a ancoragem da matriz dessa na superfície das fibras de PLA extrudadas (Figura 13).

## 6.5 CELULARIZAÇÃO DOS SUPORTES TRIDIMENSIONAIS DE PLA E FIBRINA

Através das análises por MEV foi possível observar o contingente celular imerso e aleatoriamente distribuído pela matriz de fibrina do suporte. Foram identificadas células de diferentes tamanhos e morfologias oriundas do plasma que constituía o PRP-Ph. Foram identificadas células de formato arredondado, morfologia bicôncava e tamanho de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  compatíveis com as características de hemácias (seta vermelha);

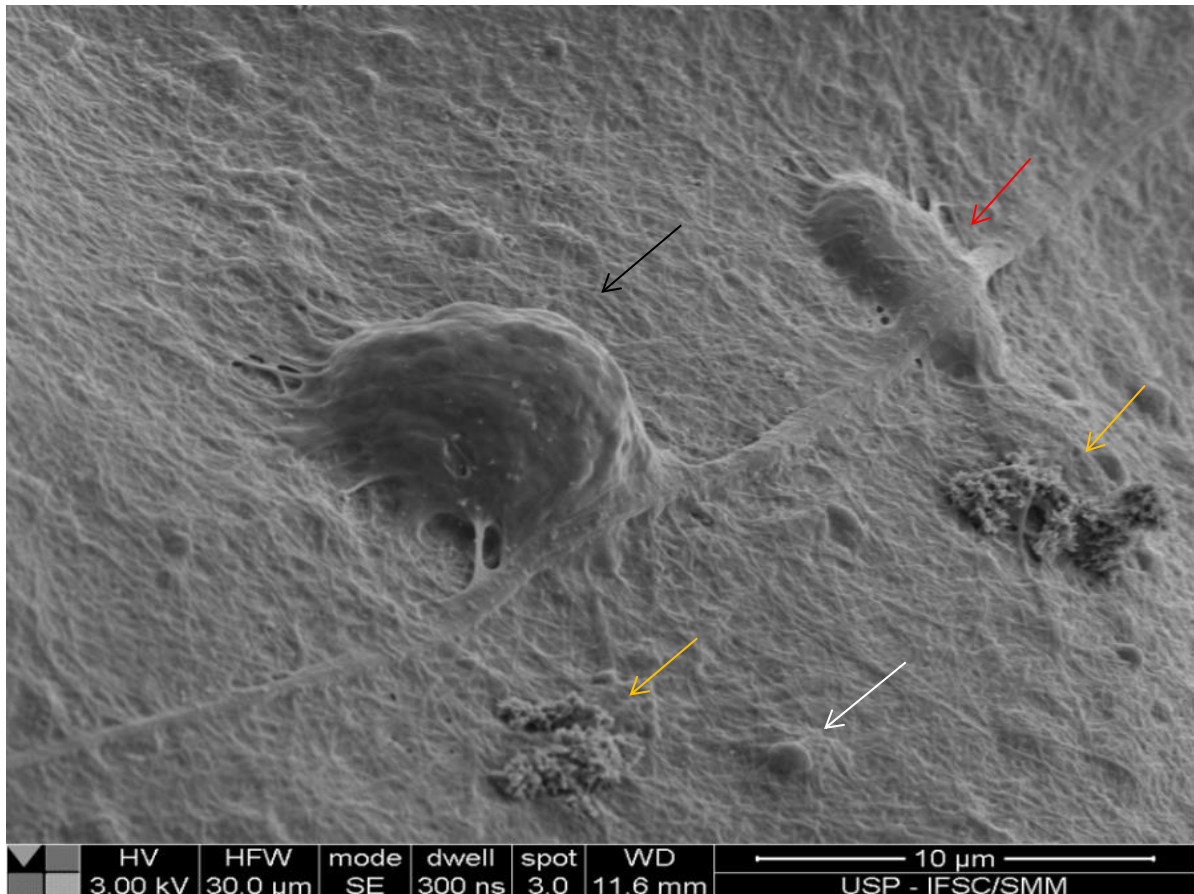
células arredondadas, com superfície irregular e dimensões entre 5 e 10  $\mu\text{m}$  que são compatíveis com leucócitos (seta preta); células arredondadas e com dimensões proporcionalmente reduzidas variando entre 1 e 1,5  $\mu\text{m}$  compatíveis com plaquetas inativas (seta branca); pequenos aglomerados multilobulados, com sugestivos pseudópodes, que correspondem à morfologia de plaquetas ativadas ( setas amarelas). A presença dessas células corrobora com o previsível processo de ativação plaquetária, incitada pela ativação da solução de cloreto de cálcio de trombina, que proporcionou tanto a conversão do fibrinogênio, e consequente polimerização da fibrina gerando a matriz, como a liberação de biomoléculas pelo fenômeno de degranulação plaquetária (Figura 14).

**Figura 14:** Fotomicrografias obtidas por MEV demonstrando a estrutura interna do suporte tridimensional de PLA (A) e o suporte tridimensional de PLA e fibrina (B).



Além da identificação do contingente celular hematogênico, foi possível identificar, tanto pelos métodos de MEV como microscopia por fluorescência, aglomerados multicelulares, em conformação tridimensional esferoidal dispersos e imersos na matriz de fibrina do suporte (figura 15).

**Figura 15:** Fotomicrografia obtida por MEV demonstra células com diferentes dimensões e morfologia circundadas pela matriz de fibrina. Células arredondadas e de superfície irregular sugerem a presença de leucócitos (seta preta). Células arredondadas com centro abaulado indicam a presença de hemácias (seta vermelha). Pequenos aglomerados multilobulados, com possíveis pseudópodes sugerem a presença de plaquetas ativadas (setas amarelas) e pequenas estruturas arredondadas, sugerem a presença de plaquetas (seta branca).



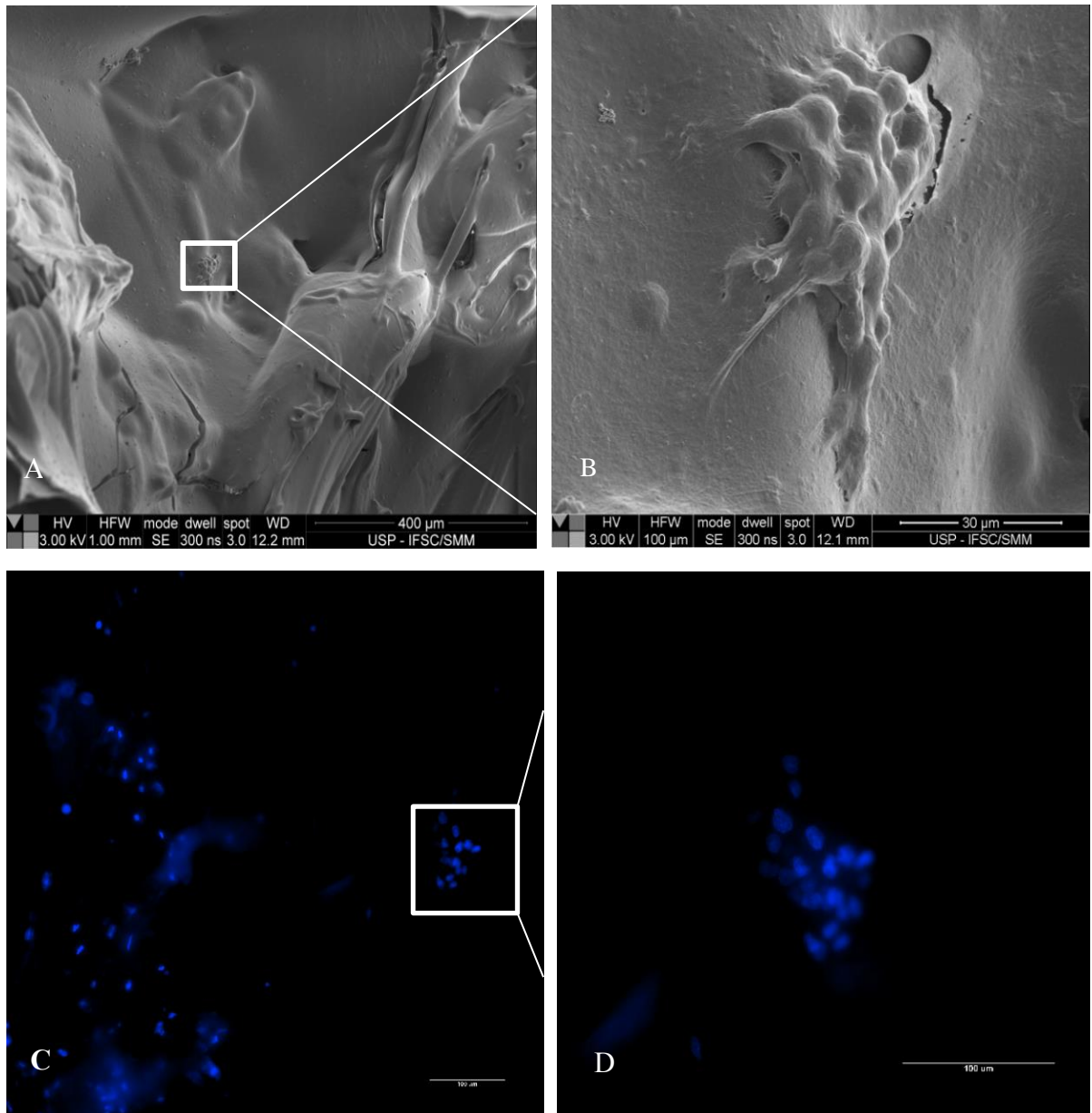
## 6.6 BIOATIVIDADE DO SUPORTE TRIDIMENSIONAL DE PLA E FIBRINA.

A bioatividade dos suportes, atribuída à disponibilidade de FC decorrente do evento de degranulação pós ativação plaquetária, foi demonstrada pela presença de células viáveis nos suportes nos períodos de 5 e 10 dias de cultivo.

As análises evidenciaram a presença de núcleos celulares com aspecto de integridade estrutural nos suportes onde os suportes de PLA e fibrina foram produzidos a partir do PRP-Ph, em ambos os períodos experimentais. Em contrapartida, as análises referentes aos suportes produzidos com PLA e fibrinogênio comercial demonstraram ausência das células nos diferentes tempos de experimento (Figura 16).

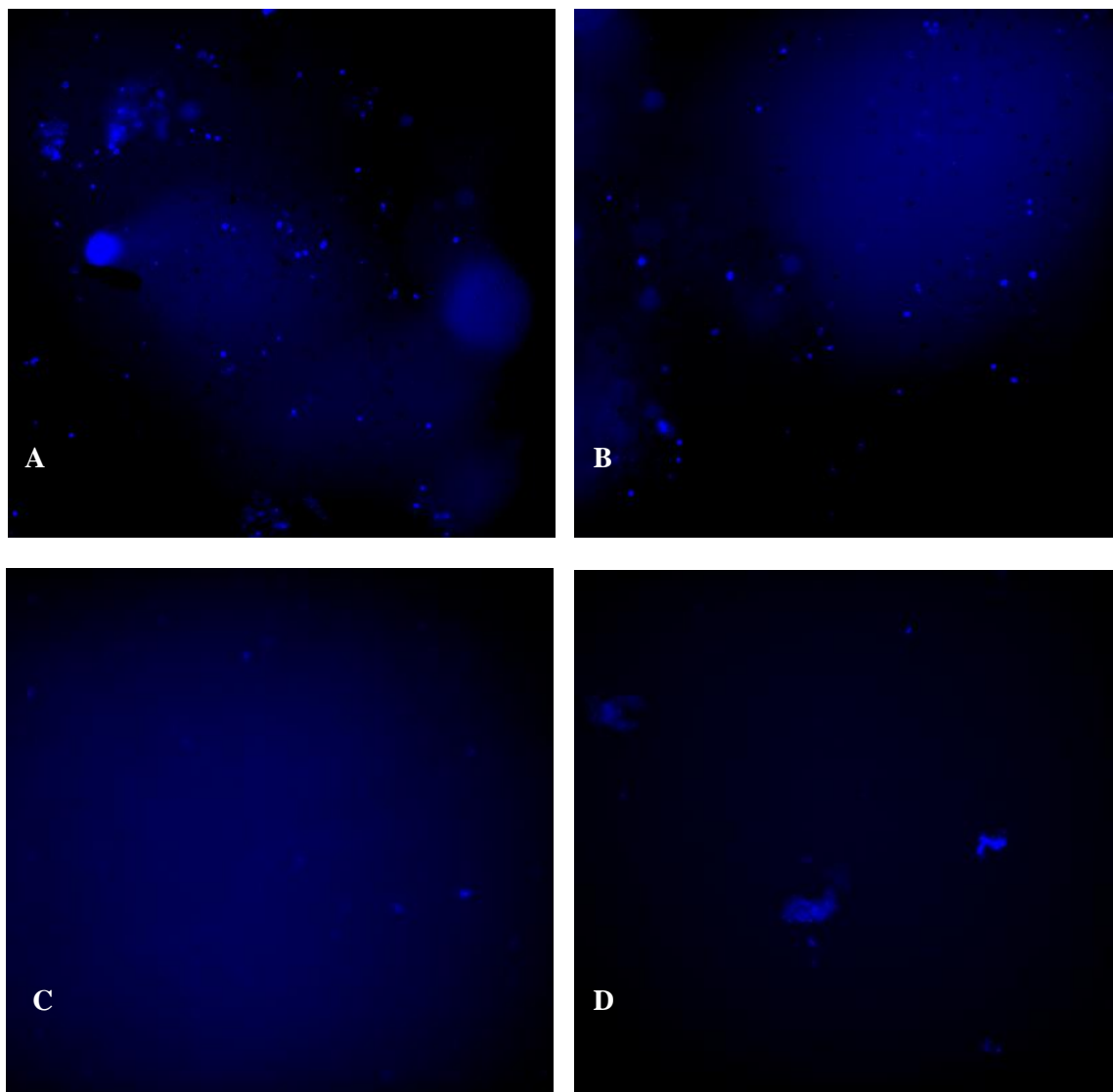
Sugerindo assim, que a manutenção da viabilidade celular se deu com os fatores de crescimento plaquetário nos suportes produzido com o PRPh.

**Figura 16:** Fotomicrografias obtidas por MEV demonstram aglomerados multicelulares (A). Essas estruturas, de morfologia ovalada sugerem a presença de CTMG1h aderidas à matriz de fibrina (B). As análises obtidas por microscopia de fluorescência confirmam a presença das células aglomeradas após utilização de marcadores de núcleo (DAPI), em 40x de aumento, com barra de escala de 45nm (C) e 100x de aumento e barra de escala de 100nm (D).





**Figura 17:**As análises obtidas por microscopia de fluorescência demonstraram que os suportes de PLA e fibrina produzidos a partir do PRP-Ph mantiveram a viabilidade celular nos períodos de 5 (A) e 10 (B) dias experimentais. Em contrapartida, não foram encontradas células nos suportes de PLA e fibrinogênio comercial nos mesmo período experimental 5(C) e 10 (D) dias.



## 7. DISCUSSÕES

A medicina regenerativa tem como proposta a utilização de um suporte, associado a moléculas bioativas e/ou células tronco mesenquimais, capaz de sediar, guiar, induzir e/ou potencializar processo de reparo do tecidual, almejando, assim, uma alternativa mais vantajosa em relação aos enxertos utilizados convencionalmente (ORYAN *et al.*, 2014).

O grande desafio científico na medicina regenerativa, destinada ao desenvolvimento de estratégias para o tratamento de defeitos ósseos, é a produção de um substituto tecidual (suporte), biocompatível, rígido e que apresente propriedades osteogênica, osteoindutora e osteocondutora similares às apresentadas pelos enxertos autólogos. Contudo, estudos pré-clínicos demonstram que grande parte das propostas dos suportes produzidos não apresenta todas as propriedades desejadas, acima citadas (SZPALSKI *et al.*, 2012).

O presente estudo desenvolveu uma “prova de conceito” para a produção de um suporte tridimensional rígido, customizável (com poros microscópicos e interconectados) celularizado e bioativo.

O PLA vem sendo muito utilizado nas aplicações biomédicas, e tem tido destaque na aplicação para a produção de suportes tridimensionais para o uso em medicina regenerativa óssea por ser biocompatível e possuir uma cinética de degradação controlada (PAWAR, 2014). Além disso, sua propriedade termoplástica, com elevado módulo de elasticidade e temperatura de transição vítrea relativamente baixa, possibilita o processamento pela MA pela utilização da técnica de FDM (SERRA *et al.*, 2013). Essa técnica permite a confecção de suportes tridimensionais porosos, interconectados entre si, que constituem uma característica essencial para os processos de neoangiogênese e osteointegração. Possibilita também, definir o tamanho e a forma da construção, podendo criar peças customizadas de acordo com a necessidade individual de cada caso ou aplicação (RODRIGUES *et al.*, 2016; WOODRUFF *et al.*, 2013).

A utilização do PLA, considerando suas favoráveis propriedades mecânicas e de processamento, proporcionou uma estrutura tridimensional de suporte rígida capaz de servir como ancoragem para a matriz de fibrina e, conseqüentemente, para abarcar o contingente celular. A técnica de manufatura aditiva proporcionou a obtenção de uma estrutura tridimensional, trabecular, com elevado grau de porosidade e conformação similar às características microestruturais do osso esponjoso. A flexibilidade desta técnica permitiu a obtenção de poros interconectados e de tamanhos variados dentro das dimensões para a

migração celular, possibilitando a transferência de oxigênio e nutrientes para as células do suporte, além de permitir a migração celular necessária para o processo de neovascularização e repovoamento de enxerto. Em contrapartida, as alterações nos parâmetros de impressão que proporcionaram a inteconectividade dos poros, comprometeram, nesta proposta a capacidade de customização das peças, uma vez que o formato final do suporte não correspondeu ao planejado. Sendo assim, ressalta-se a importância do planejamento computacional para a obtenção dos suportes tridimensionais utilizando a técnica de MA, que possibilite a preservação da microarquitetura interna mantendo a conformação macroscópica planejada.

A fibrina, um polímero naturalmente utilizado pelo corpo como suporte temporário para regeneração e cicatrização de tecidos (KAWASE, 2015), tem sido utilizada como um biomaterial eficaz na produção de suportes para o uso em medicina regenerativa de vários tecidos. Dentre suas vantagens destaca-se a capacidade de mimetizar a matriz extra celular, quando utilizada na conformação de malha. (BROWN, BARKER, 2014).

Uma das fontes de obtenção dessa matriz é o plasma rico em plaqueta que após ativação com trombina e cloreto de cálcio, além de resultar em uma malha tridimensional apresentam uma vantagem adicional, aprisionam nesta trama plaquetas e moléculas que disponibilizaram fatores de crescimento, enzimas e citocinas que podem beneficiar a proliferação, a migração diferenciação celular, acelerando e ou melhorando a qualidade do processo de reparo tecidual. (DE LA PUENTE, LUDEÑA, 2014; YIN *et al.*, 2016).

Segundo De Long e colaboradores (2012) o PRP pode ser classificado levando em consideração a concentração de plaquetas no plasma após centrifugação, a concentração de células branca e o método utilizado para a ativação plaquetária (endógena ou exógena),

O protocolo experimental de fracionamento de sangue para a obtenção do PRP desse estudo se mostrou eficiente, considerando a elevada taxa de concentração de plaquetas (7x a concentração plaquetária do sangue basal, atingindo aproximadamente  $1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) e a baixa concentração de leucócitos. De acordo com a classificação do PRP proposta por DeLong (2012), foi obtido um plasma rico em plaquetas puro (PRP-P).

A utilização da técnica do PRP-P, após ativação com trombina e cloreto de cálcio, resultou na formação de uma matriz tridimensional reticulada, com interação e conformação delimitada pelo suporte de PLA, capaz de aprisionar o contingente celular hematogênico e mesenquimal. Supõe-se que a estratégia de utilização da fibrina obtida por meio da ativação do PRP-P, além de mimetizar a matriz extracelular biológica natural capaz de favorecer os eventos celulares de reparo, disponibilizou diversas biomoléculas, entre elas os fatores de

crescimento VEGF, PDGF, TGF, EGF, IGF, entre outros. São fortes os indícios de que esses fatores, provenientes do evento de degranulação das plaquetas pós ativação, tenham sido capazes de manter a viabilidade das células durante os períodos experimentais estabelecidos. Cogita-se, ainda, a possibilidade desses FC poderem contribuir com o processo de reparo numa eventual condição *in vivo*.

Apesar das inúmeras vantagens de se utilizar a estratégia de obtenção de uma matriz de fibrina por uma via autóloga, vale a pena ressaltar a desvantagem desse material quando se consideram as propriedades mecânicas, em especial considerando o tecido ósseo. Por este motivo, foi proposta a associação com o suporte tridimensional de PLA. Sendo assim, o suporte de PLA ficou responsável pela constituição de uma estrutura tridimensional rígida de sustentação enquanto a matriz de fibrina responsável pela constituição de uma matriz de interação celular, com ações complementares de bioatividade, supostamente capaz de favorecer a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular.

Baseados nas vantagens e desvantagens do PLA e da fibrina, pesquisadores tem produzido suportes combinando estes materiais. Os resultados obtidos demonstram que a utilização do PLA aumentou as propriedades mecânicas e a matriz de fibrina possibilitou a adesão e proliferação celular (ZHAO *et al.*, 2009; RIGOGLIUSO *et al.*, 2014; GAMBOA MARTINEZ *et al.*, 2013). Em contrapartida, tais propostas não exploraram o potencial bioativo da fibrina quando se utiliza o PRP-P.

As CTM têm sido amplamente exploradas e são consideradas como oportunidade de abordagem terapêutica celular multifuncional. Devido ao seu potencial de diferenciação multilinhagem; de ação imunossupressora; baixo grau de imunogenicidade e relativa facilidade de extração, isolamento e crescimento em cultura, são potencialmente capazes de contribuir com o processo de reparo de tecidos como osso, cartilagem ligamento, tendão e gordura. Estas células podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária, entre outros (FERRERO, 2016).

As CTMG<sup>lh</sup> utilizadas nesse estudo, mantiveram a conformação tridimensional quando aderidas à matriz de fibrina. Essa característica determina às CTM um perfil fenotípico e genotípico similar às condições fisiológicas dos tecidos e pode influenciar nas ações celulares durante o processo de reparo tecidual (CESARZ, TAMAMA, 2016).

Considerados conjuntamente, os resultados permitem afirmar que a associação do suporte polimérico de PLA à matriz de fibrina autóloga, oriunda da ativação do PRP-Ph,

proporcionou às células um ambiente tridimensional bioativo para a manutenção da viabilidade das CTMGh, conferindo viabilidade à prova de conceito proposto nessa pesquisa.

Novas pesquisas precisam ser realizadas para complementar os resultados aqui alcançados a fim de contribuir com o desenvolvimento científico e tecnológico para utilização de suportes tridimensionais customizáveis bioativo em medicina regenerativa óssea.

## 8. CONCLUSÕES

- Os suportes tridimensionais de PLA, obtidos a partir da técnica de manufatura aditiva, por FDM, proporcionaram a obtenção de uma estrutura rígida e com organização microestrutural similar ao osso trabecular;
- A utilização da técnica de PRP-Ph viabilizou a obtenção de uma matriz reticulada de fibrina responsável pela manutenção da conformação tridimensional e da viabilidade do contingente celular no interior do suporte;
- O processo de extração e isolamento das células da gordura infrapatelar de joelho humano foi eficiente no estabelecimento de uma cultura de células tronco mesenquimais adultas humanas;
- O suporte tridimensional bioativo de PLA e fibrina, celularizado com CTMGih, constitui um conceito viável para futura utilização em medicina regenerativa óssea;
- Novas pesquisas precisam ser conduzidas para dar continuidade ao desenvolvimento científico e tecnológico do conceito apresentado nessa pesquisa. Isso será indispensável para que a utilização de suportes tridimensionais celularizados bioativos se tornem uma realidade eficiente e segura dentro da medicina regenerativa.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P.: Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, 40, 5, 2012.

ARNOCZKY, S. P.; DELOS, D.; RODEO, S. A.: What is platelet-rich plasma? **Operative Techniques in Sports Medicine**, 19(3), 142-148, 2011.

ATHANASIOU, V.T.; PAPACHRISTOU, D.J.; PANAGOPOULOS, A.; SARIDIS, A.; SCOPA, C.D.; MEGAS, P.: Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. **Med Sci Monit**, 2010.

AURAS, R.; LIM, L. T.; SELKE, S. E. M.; TSUJI, H.: Poly(lactic-acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing and Applications, **Wiley & Sons, Inc.**, 2010.

AVINE, O.; KHODDAMI A.: Overview of poly(lactic acid) (PLA) fibre. **Fibre Chemistry**, 41, 6, 391-401, 2010.

BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S.; DAS, S.: 3D printing of biomaterials. **MRS Bulletin**, 40, 2015.

BETTI, L. V.: **Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos**, 152f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2004.

BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A.: Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials Today**, 16, 12, 496-504, 2013.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO E. M.; MÉLO, T. J. A.: Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, 6, 2, 127-139. 2011.

BROWN, A. C.; BARKER, T. H.: Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. **Acta biomaterialia**, 10(4), 1502-1514. 2014.

BURTON, R.A.; TSURUPA, G.; MEDVED, L.; TJANDRA, N.: Identification of an ordered compact structure within the recombinant bovine fibrinogen C-domain fragment by NMR. **Biochemistry**, 2006.

CESARZ, Z.; KENICHI T.: Spheroid culture of mesenchymal stem cell. **Stem Cells international**, 2016.

CHENG, Y.; DENG, S.; CHEN, P. AND RUAN, R.: Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. **Frontiers of Chemistry in China**, 4(3), 259-264, 2009.

CHIA, H. N.; WU, B. M.: Recent advances in 3D printing of biomaterials. **Journal of biological engineering**, 9(1), 1, 2015.

CLARKE, B.: Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, 3, Supplement 3, S131-S139, 2008.

COX, S. C. et al.: 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, 47, 237–47, 2015.

CROCI, A. T.; CAMARGO, O. P.; BITAR, G.; PEREIRA, S. L. B.; MOREIRA, M.; FREITAS JR, S.: Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortop. Bras.**, 11, 4, 2003.

DE LA PUENTE, P.; LUDEÑA, D.; LÓPEZ, M.; RAMOS, J.; IGLESIAS, J.: Differentiation within autologous fibrin scaffolds of porcine dermal cells with the mesenchymal stem cell phenotype. **Experimental cell research**, 319(3), 144-152, 2013.

DELONG, J. M.; RUSSELL, R. P. & MAZZOCCA, A. D.: Platelet-rich plasma: the PAW classification system. Arthroscopy, **The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, 28(7), 998-1009. 2012.

DERNOWSEK, J. A: **Controle pós-transcricional envolvendo redes de interação miRNAs-mRNAs durante a diferenciação osteoblástica de células tronco da polpa dentária humana**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP- SP 2014.

DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y. ; MAEKAWA T.; KUMAR D. S.: Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, **International Journal of Polymer Science**, 2011.

DIMITRIOU, R. et al.: Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, 9, 1, 66, 2011.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 11-16, 2004.

EHRLER, D.M.; VACCARO, A.R.: The use of allograft bone in lumbar spine surgery. **Clin Orthop Relat Res**, 1:38–45, 2000.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R.: Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—a comprehensive review. **Advanced drug delivery reviews**, 2016.

GAMBOA-MARTÍNEZ, T. C.; GARCÍA CRUZ, D. M.; CARDA, C., RIBELLES, J. L.; FERRER, G. G.: Fibrin-chitosan composite substrate for in vitro culture of chondrocytes. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 101(2), 404-412. 2013.



GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E.: Bone substitutes: An update. **Injury**;36 (Suppl 3):S20–S27, 2005.

HENKEL, J.; WOODRUFF, M. A.; EPARI, D. R.; STECK, R.; GLATT, V.; DICKINSON, I. C; HUTMACHER, D. W.: Bone regeneration based on tissue engineering conceptions—a 21st century perspective. **Bone research**, 1(3), 216. 2013

HOQUE, M. E.; CHUAN, Y. L.; PASHBY, I.: Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. **Biopolymers**. 97(2):83-93, 2011.

HUTMACHER, D. W.: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, 21(24), 2529-2543, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.: **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.136-148, 2004.

JURGENS, W. J.; VAN DIJK, A.; DOULABI, B.Z.; NIESSEN, F.B.; RITT, M.J.; VAN MILLIGEN, F.J. & HELDER, M.N.: Freshly isolated stromal cells from the infrapatellar fat pad are suitable for a one-step surgical procedure to regenerate cartilage tissue, **Cytherapy**,11(8):1052-64, 2009.

KHADEMHOSEINI, A. et al.: Microscale technologies for tissue engineering and biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2480–2487, 2006.

LASPRILLA, A. J. R. et al.: Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotechnology Advances**, 30, 1, 321–328, 2012.

LEMISCHKA, I. R.: Stem cell biology: a view toward the future. **Ann N Y Acad Sci**. 1044:132-8,2005.

LI, Y. et al.: Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. **The Scientific World Journal**, 2015, 685690, 2015.

LICHTE, P.; PAPE, H. C.; PUFE, T.; KOBBE, P. AND FISCHER, H.: Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. **Injury**, 42(6), 569-573, 2011.

LIPSON, H.: New world of 3-D printing offers "completely new ways of thinking": Q&A with author, engineer, and 3-D printing expert Hod Lipson. **IEEE pulse**, v. 4, n. 6, p. 12-14, 2012.

LIU, M. et al.: Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. **Orthopedics**, 36, 11, 868–73, 2013.

LOPES, M. S.; JARDINI A. L.; FILHO R. M.: Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic-Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications. **Chemical engineering transactions**. 38, 2014

LUNELLI, B. H.; LASPRILLA, A. J. R.; MARTINEZ G. A. R.; JARDINI A. L. AND MACIEL FILHO, R.: Poly-lactic acid synthesis for application in medical devices- A review. **Biotechnology Advances**, 2012.

LV, F. J.; TUAN, R. S.; CHEUNG, K., & LEUNG, V. Y.: Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, 2014.

MITCHELL, A.C.; BRIQUEZ, P.S.; HUBBELL, J.A.; COCHRAN, J.R.: Engineering growth factors for regenerative medicine applications, **Acta Biomaterialia** , 2015.

MESHER AL: **Junqueira Histologia Básica: Texto e atlas**, 12 edição: <http://www.accessmedicine.com>, Editora McGraw-Hill

MOSESSON, M. W.: Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 3(8), 1894-1904, 2005.

MOSHIRI, A.; ORYAN, A.: Role of tissue engineering in tendon reconstructive surgery and regenerative medicine: current concepts, approaches and concerns. **Hard Tissue** 1:11, 2012.

MUENPRASAT, D.; SUTTIREUNGWONG, S.; TONGPIN, C.: Functionalization of Poly ( Lactic Acid ) with Maleic Anhydride for Biomedical Application. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, 20, 3, 189–192, 2010.

MUNIRAH, S. et al.: The use of fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis. **European cells & materials**, 15, 41–52, 2008.

MURPHY, S.V.; ATALA, A: 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 32(8):773-85. 2014.

NYANHONGO, G. S. et al.: Bioactive albumin functionalized polylactic acid membranes for improved biocompatibility. **Reactive and Functional Polymers**, 73, 10, 1399–1404, 2013.

O'KEEFE R. J.; MAO J.: Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview. **Tissue Eng Part B Rev.**,17(6):389–392, 2011.

OLIVEIRA, C. S.; NASCIMENTO, M.; JÚNIOR, E. A.; CRUSOÉ M. ; BAHIA, P.; ROSA,F. P.: Avanços e aplicações de bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 9 supl.1, 28-36, 2010.

OLIVEIRA, L.: Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciência**, 9, 37–44, 2010.

ORYAN, A.; ALIDADI, S.; MOSHIRI, A.: Current concerns regarding healing of bone defects. **Hard Tissue**, 2:13, 2013.

ORYAN, A.; ALIDADI, S.; MOSHIRI, A. & MAFFULLI, N.: Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of orthopaedic surgery and research**, 9(1), 1. 2014.

PARK, H.; HARRISON, P.; GUO, Z.; LEE, M. G. & YU, W. R.: Three-dimensional constitutive model for shape memory polymers using multiplicative decomposition of the deformation gradient and shape memory strains. **Mechanics of Materials**, 93, 43-62, 2016.

PAWAR, P. R; TEKALE, S. U; SHISODIA, S. ; TOTRE, J. T & DOMB, A J.: Biomedical applications of poly (lactic acid). **Recent Patents on Regenerative Medicine**, 4(1), 40-51. 2014.

PERSSON, M.; LORITE, G. S. ;KOKKONEN, H. E; CHO, S. W.: LEHENKARI, S. M.; TUUKKANEN J.: Effect of Bioactive Extruded PLA/HA Composite Films on Focal Adhesion Formation of Preosteoblastic Cell. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 121, 409-416. 2014

PETRY, J. F. T. C; PRANKE, P. H. L: **Modificação das propriedades do poli(ácido láctico) pela inserção de gelatina e sua utilização como biomaterial para aplicação em engenharia de tecidos**, XXVI Salão de Iniciação Científica, 2014.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C., JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.,MOORMAN M. A. ; SIMONETT, D. W. I; CRAIG, S. AND MARSHAK, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284, 143-147, 1999.

PLANELL, J. A.;BEST S. M.; LACROIX, D.; MEROLLI, A.: Bone Repair Biomaterials, **Elsevier**, 2009.

POLO-CORRALES, L; LATORRE-ESTEVEZ M. AND RAMIREZ-VICK J. E.: Scaffold Design for Bone Regeneration. **Journal of nanoscience and nanotechnology** 14.1, 2014.

RAJANGAM, T.; AN, S. S. A.: Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, 8, 3641–3662, 2013.

RIGOGLIUSO, S.; CARFÌ PAVIA, F.; LA CARRUBBA, V.; BRUCATO, V. & GHERSI, G.: PLLA/Fibrin Tubular Scaffold: A New Way for Reliable Endothelial Cell Seeding. **In Conference Papers in Science**. Hindawi Publishing Corporation, 2014.

RODRIGUES A. A.; PEREZ A. G.M.; SHIMOJO A.A.M.; LANA J. F.S.D.; DUARTE A. S.; LUZO A C.M.; SANTANA M. H.A.; BELANGERO W. D.: **Estudo *in vitro* da formação de scaffolds de fibrina e liberação de fatores de crescimento a partir de plasma rico em plaquetas**. Congresso Latino Americano de órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012.

RODRIGUES, N.; BENNING, M.; FERREIRA, A. M.; DIXON, L. & DALGARNO, K. Manufacture and characterisation of porous PLA scaffolds. **Procedia CIRP**, 49, 33-38. 2016.

ROSENTHAL, N.; BADYLAK S.: Regenerative medicine: today's discoveries informing the future of medical practice. **Regenerative Medicine** 1, 2016.

SACHLOS E.and CZERNUSZKA J. T.: Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **Eur Cell Mater** 5.29, 39-40, 2003.

SALGADO; A. J., COUTINHO, O. P.; REIS, R. L.: Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular bioscience**, 4(8), 743-765, 2004.

SERRA, T.; PLANELL, J. A.; NAVARRO, M.: High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 3, p. 5521-5530, 2013.

SCHROEDER, J. E.; MOSHEIFF, R.: Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 609–613, 2011.

SZPALSKI, C.; WETTERAU, M.; BARR, J; WARREN, S. M.: Bone tissue engineering: current strategies and techniques—part I: scaffolds. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 18(4), 246-257. 2012

SOMMERFELDT, D.; RUBIN, C.: Biology of Bone and How It Orchestrates the Form and Function of the Skeleton. **European Spine Journal** 10. Suppl 2 S86–S95. 2001.

SOUSA, V. L.: **Efeitos do ultrassom de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (Canis familiaris)**.127f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

THON, J.N.; ITALIANO, J. E.: Platelets: production, morphology and ultrastructure. **Handb Exp Pharmacol.**, 210: 3-22, 2012.

TSUJI H., IKADA Y.: Crystallization from the melt of PLA with different optical purities and their blends. **Macromol Chem Phys**. 197. 3483–3499, 1996.

TSURUPA, G.; HANTGAN, R.R.; BURTON, R.A; PECHIK, I.; TJANDRA, N.; MEDVED, L.: Structure, stability, and interaction of the fibrin(ogen)  $\alpha$ C-domains. **Biochemistry**. 48(51), 12191-12201, 2009.

VERT M, FEIJEN J., ALBERTSON A., SCOTT G., CHIELLINI E.: Biodegradable polymers and plastics, Cambridge, U.K.: **Royal Society of Chemistry. Redwood Press Ltd**, Melksham. 73–92, 1992.

VOGEL, W., GRUNEBACH, F., MESSAM, C. A., KANZ, L., BRUGGER, W., & BUHRING, H. J.: Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. **Haematologica**, 88(2), 126-133, 2003.

VOLPATO, N.: **Prototipagem rápida - tecnologias e aplicações**. 1ª ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2007.

WONG, J.Y.; PFAHNL, A.C.: 3D printing of surgical instruments for long-duration space missions, **Aviat Space Environ Med**. 2014.

Woodruff, M. A., Lange, C., Chen, F., Fratzl, P., & Hutmacher, D. W. (2013). Nano-to Macroscale Remodeling of Functional Tissue-Engineered Bone. *Advanced healthcare materials*, 2(4), 546-551.

YAZAR S.: Onlay bone grafts in head and neck reconstruction. **Semin Plast Surg**, 24: 255–261, 2010.

XIAO, L.; WANG, B.; YANG G. AND GAUTHIER, M.: Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications, **Biomedical Science, Engineering and Technology**, 2012.

YIN, W.; QI, X.; ZHANG, Y.; SHENG, J.; XU, Z.; TAO, S. & HANG, C.: Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte- and platelet-rich plasma in promoting repair of bone defects. **Journal of Translational Medicine**, 14, 73. 2016.

ZHAO, H.; MA, L.; GONG, Y.; GAO, C.; SHEN, J.: A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an in vitro evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 20(1), 135-143. 2009.

## **ANEXO**

