

## **Agradecimentos**

Em primeiro ao meu orientador, Prof. Doutor Ilídio Correia, por todo o apoio e saber científico que me transmitiu. Por toda compreensão, disponibilidade, sugestões e críticas necessárias ao longo de todo o mestrado.

Ao Prof. Doutor Ignácio Verde pela disponibilidade e esclarecimento de dúvidas que foram surgindo ao longo do trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Doutora Helena Gil e ao Dr<sup>o</sup> João Maia, da Universidade de Coimbra, pela colaboração neste trabalho, na síntese dos biomateriais utilizados neste estudo.

Aos hospitais Sousa Martins da Guarda e Amato Lusitano de Castelo Branco, meu agradecimento por facilitar a cedência das amostras.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que me proporcionaram sempre um bom ambiente de trabalho o que tornou mais fácil a realização deste trabalho. Em especial à Sílvia Coelho, por todo o apoio, amizade, companheirismo que me transmitiu ao longo de todo o trabalho.

Aos meus amigos que tornam tudo mais fácil, Sofia Henriques, Nuno Fernandes, Eduardo Dias, Sónia Serra, Eduardo Calçada, Patrícia Matos e Mónica Gonçalves por toda a sua amizade e ajuda durante estes anos.

Quero dedicar este trabalho à minha família, por todo esforço, apoio incondicional e confiança depositada, principalmente ao meu irmão com quem posso contar sempre, pois são as pessoas mais importantes da minha vida.

Por último, à Universidade da Beira Interior.

A todos um grande, obrigado!

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	1
<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Palavras-chave</b> .....	8
<b>Abreviaturas</b> .....	8
<b>I. Objectivo</b> .....	10
<b>II. Introdução</b> .....	11
1) Avanços na engenharia dos tecidos e na medicina regenerativa.....	11
2) Biomateriais e suas aplicações .....	15
2.1 Biomateriais naturais utilizados neste trabalho .....	19
2.2 Hidrogéis .....	23
3) Morfologia do cordão umbilical humano:.....	24
3.1 Morfologia dos vasos sanguíneos:.....	25
4) Músculo liso: .....	27
5) Cultura de células .....	29
5.1 Meios .....	31
5.2 Factores de crescimento .....	32
6) Determinação da viabilidade celular e citotoxicidade dos biomateriais .....	33
6.1 Teste do MTT .....	34
6.2 Teste do LDH .....	35
7) Técnica da imunofluorescência .....	36
8) Engenharia dos tecidos aplicada aos vasos sanguíneos .....	37
<b>III. Materiais e métodos</b> .....	42
1) Preparação dos frascos para transporte dos cordões umbilicais.....	42
2) Isolamento das artérias umbilicais .....	42
3) Preparação de placas de cultura com colagénio .....	43
4) Isolamento de células humanas do músculo liso.....	43
4.1 Método I (adaptado de De Llano <i>et al.</i> , 2007) .....	43
4.2 Método II (adaptado de Van Rigen <i>et al.</i> , 1997).....	45
5) Cultura de células .....	46
6) Tripsinização de células .....	47
7) Determinação da contagem das células e da taxa de viabilidade celular .....	47

8) Preparação de placas de 96 poços com biomateriais.....	48
9) Estudo da biocompatibilidade do dextrano oxidado – Teste do MTT .....	49
10) Ensaio de Imunofluorescência .....	49
<b>IV. Resultados e Discussão.....</b>	<b>52</b>
1) Isolamento do músculo liso a partir de cordões umbilicais .....	52
2) Resultados dos ensaios de Imunofluorescência .....	53
3) Estudos realizados aos biomateriais utilizados na síntese de hidrogéis .....	55
4) Crescimento de células da linha celular A7r5 na presença de diferentes biomateriais .....	59
5) Crescimento de células do músculo liso humanas na presença de diferentes biomateriais .....	68
<b>V- Conclusão .....</b>	<b>76</b>
<b>VI. Anexo I – Preparações de soluções .....</b>	<b>78</b>
<b>VI. Anexo II – Preparação das placas com biomateriais – hidrogéis baseados no dextrano oxidado. ....</b>	<b>84</b>
<b>VII – Bibliografia.....</b>	<b>86</b>

## Resumo

A engenharia dos tecidos utiliza diferentes métodos e materiais para tentar obter estruturas com propriedades semelhantes aos tecidos que existem no organismo. Para isso utiliza diferentes materiais que são designados por biomateriais, contribuindo significativamente para diversos avanços no campo da Medicina Regenerativa. Estes têm como função reparar, substituir, manter ou melhorar a função particular de um tecido ou órgão.

O presente projecto de investigação teve como objectivo avaliar a adesão celular e a viabilidade de hidrogéis tendo como base o dextrano oxidado, para posterior aplicação na medicina regenerativa, principalmente na produção de substitutos de vasos sanguíneos.

Para isso procedeu-se inicialmente ao isolamento de células de músculo liso humanas, para posterior realização de ensaios de biocompatibilidade de vários hidrogéis com diferentes formulações de dextrano oxidado ligado aos agentes reticulantes ácido adipídico dihidrazido (AAD) e/ou gelatina (Gel) dissolvidos em DMEM-F12 ou em PBS. Estes biomateriais foram fornecidos pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. A presença das células de músculo lisas humanas na cultura primária foi confirmada por imunofluorescência com sinal positivo para a proteína de alfa - actina.

Porém os primeiros ensaios de biocompatibilidade foram realizados com células de músculo liso de rato (A7r5) devido ao rápido crescimento destas células. E também de modo a proceder à optimização do método do MTT que foi realizado de modo a testar a citotoxicidade das várias formulações de dextrano.

Ao longo deste estudo adicionou-se as células A7r5 e as células de músculo liso humanas aos diferentes hidrogéis, observou-se para os dois tipos de células de músculo liso que existe uma maior adesão e crescimento celular para as formulações de grau de oxidação inferior de dextrano, sendo o dextrano oxidado 5% (DexOx 5%) onde se obtiveram os melhores resultados. Assim como se observou maior adesão quando os materiais foram dissolvidos em DMEM-F12 em comparação aos dissolvidos em PBS.

Os resultados obtidos fornecem novos dados importantes sobre a biocompatibilidade de hidrogéis tendo como base o dextrano oxidado para que, após

futuros ensaios *in vivo* possam, num futuro próximo, ser utilizados na medicina regenerativa, na formação de substitutos de vasos sanguíneos.

## Abstract

Tissue Engineering uses different methods and materials to try to obtain structures with properties similar to that in tissues of organism. For that, it uses different materials, designated by biomateriais, contributing significantly to several progresses in the field of the Regenerative Medicine. These have as function to repair, to substitute, to maintain or to improve the peculiar function of tissue or organ.

This thesis focuses the cell adhesion assessment on oxidized dextran-based hydrogels, for further application in regenerative medicine, mainly in the production of substitutes for blood vessels.

For that, we started by isolating smooth muscle cells, for subsequent accomplishment of biocompatibility assays of several oxidized-dextran (dexOx) based hydrogels, linked to the agents reticulates adipic acid dihydrazide (AAD) and/or gelatine (Gel) dissolved in DMEM-F12 or in PBS. These biomateriais were supplied by the Department of Chemical Engineering of the Coimbra University. By using indirect immunofluorescence the cells were identified as smooth muscle cells by the presence of alpha smooth muscle actin.

However the first biocompatibility assays were accomplished with smooth muscle cells from rat (A7r5) due to the fast growth of these cells. It is also in way to proceed to the optimization of the method of MTT that was accomplished to test the cytotoxicity of the several dextran formulations.

Along this study it was added the cells A7r5 and human smooth muscle cells to the hydrogels, it was observed for the two types of cells of smooth muscle that exist a larger adhesion and cellular growth for the formulations of smaller oxidation degree, being the oxidized-dextran 5% (dexOx 5%) where they were obtained the best results. As well as larger adhesion it was observed when the materials that were dissolved initially in the culture medium (DMEM-F12) in comparison with dissolved in PBS.

The subsequent evaluation of the cytotoxicity (through the assay of reduction of MTT) has concordant results with what was observed by optical microscopy. They are verified the largest absorvâncias for the materials than they were dissolved in DMEM-F12.

The results obtained gave new information about biocompatible of oxidized dextran-based hydrogels, after *in vivo* assays can, in a near future, be applied in regenerative medicine, in the production of substitutes for blood vessels.

## Palavras-chave

Artéria umbilical humana, Biomateriais, Células do músculo liso, Cultura de células *in vitro*, Engenharia de tecidos.

## Abreviaturas

AAD – ácido adipídico dihidrazido

A7r5 – células de músculo liso rato

AUH – artéria umbilical humana

BMP's – proteínas morfogenéticas ósseas

BSA – albumina sérica bovina

CD 144 – *anti-VE-Cadherin*

Dacron – polietileno-tereftalato

DexOx – dextrano oxidado

DexOx 5% – dextrano oxidado 5 %

DexOx 15% – dextrano oxidado 15 %

DexOx 10% – dextrano oxidado 10 %

DexOx 25% – dextrano oxidado 25 %

DexOx 40% – dextrano oxidado 40%

DMEM-F12 ou DMEM – dulbecco's modified eagle's medium – F 12

DMSO – dimetilsufóxido

ECGF – factor de crescimento endotelial

EGF – factor de crescimento epidermal

ECM – matriz extracelular

ePTFE ou Teflon – politetrafluoretileno

EGF – factor de crescimento epidermal

FGF – factor de crescimento de fibroblastos

FGF-1 – factor de crescimento de fibroblastos-1

FGF-2 – factor de crescimento de fibroblastos-2

FBS – soro fetal bovino

FGF – factor de crescimento de fibroblastos

FDA – food and drug administration

FITC – fluoresceína isocianetada

Gel – gelatina

Gelatina BS – gelatina de pele de bovino

Gelatina PS – gelatina de pele de porco

GSP – componentes de suplemento do crescimento

HBSS – solução salina Hank's Balanced

HSMC – células de musculo liso humano

HUASMC – células humanas de músculo liso das artérias do cordão umbilical humano

IGF-I – factor de crescimento “insulin-like I”

LDH – lactato desidrogenase

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MEM – meio essencial mínimo

NGF – factor de crescimento neural

PBS – solução tampão fosfato

PCL – policaprolactona

PEG – polietileno glicol

PGA – ácido poliglicólico

PLA – ácido poliláctico

PLGA – ácido poli (láctico-co-glicólico)

PMMA – poli (metilmetacrilato)

PSS – solução salina fosfato

PVC – cloreto de polivinil

PDGF – factor de crescimento derivado de plaquetas

RGD – sequência de arginina-glicina-ácido aspártico

SEM – microscopia electrónica de varrimento

TGF-beta – factor de crescimento transformador de beta

VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular

VEGF – factor de crescimento endoteliais vasculares

VSMC – células do músculo liso vascular

VEGF – factor de crescimento endotélio-vascular

*vW factor* – factor *von Willebrand*

## **I. Objectivo**

O presente trabalho teve como objectivo avaliar a adesão celular e a biocompatibilidade de hidrogéis tendo como base o dextrano oxidado, para futuras aplicações em medicina regenerativa, principalmente na produção de substitutos de vasos sanguíneos.

Isolar e crescer *in vitro* células de músculo liso humanas isoladas a partir das artérias do cordão umbilical.

## **II. Introdução**

### **1) Avanços na engenharia dos tecidos e na medicina regenerativa**

A construção de tecidos, para substituição de tecidos lesados ou não funcionais no corpo humano tem tido um grande progresso e contribuíram significativamente para a medicina no século XX (Such, 2000).

A engenharia dos tecidos tem como objectivo reparar, substituir, manter ou melhorar a função particular de um órgão ou tecido. A perda total ou parcial de um órgão é um dos mais graves e dispendiosos problemas da saúde do ser humano (Atala, 2000). Milhões de pacientes em todo o mundo beneficiaram da inovação da tecnologia de produtos feitos com biomateriais onde se incluem dispositivos de entrega direccionada de fármacos, implantes dentários, “pace-makers”, corações artificiais, lentes de contacto, adesivos cirúrgicos e enxertos vasculares (Atala, 2000).

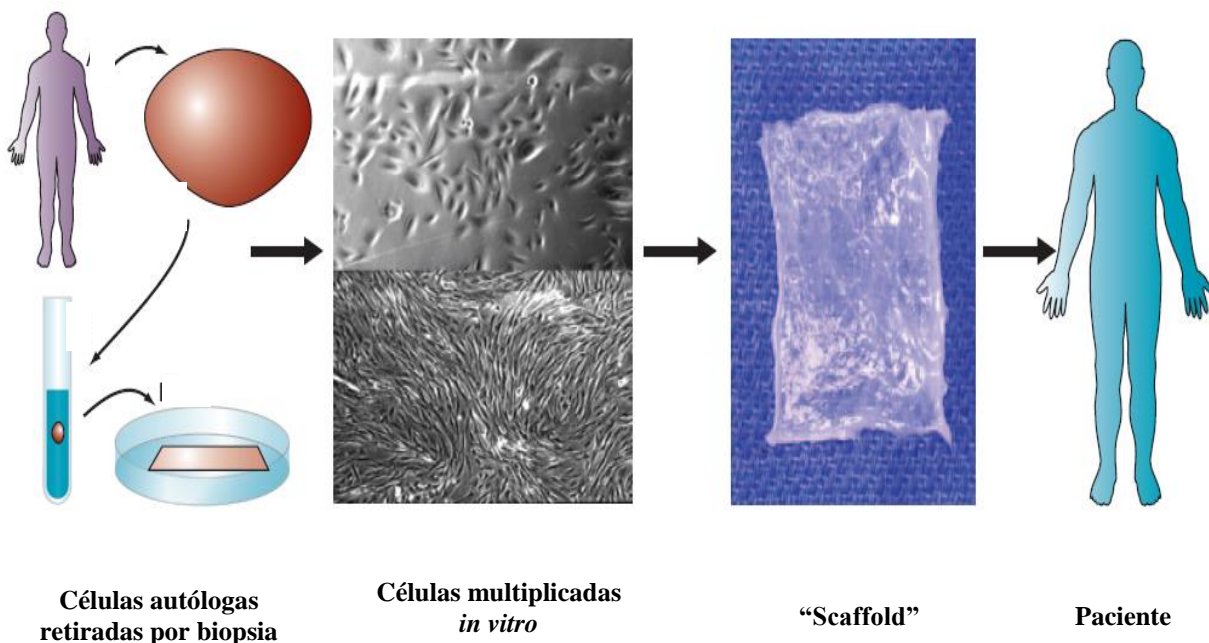
O desenvolvimento de novos biomateriais resultou da interdisciplinaridade entre varias áreas entre as quais se destacam: Química Industrial, Ciências de materiais, Biologia Celular e Molecular, Engenharia Mecânica, Medicina e Engenharia Biomédica (Karp e Langer, 2007).

As células são a chave para a regeneração dos tecidos e a sua reparação, devido à sua proliferação e diferenciação, sinalização célula-célula, produção e deposição de componentes da matriz extracelular (ECM) (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2006). A ECM é uma rede complexa de macromoléculas secretadas, localizadas no espaço extracelular. A ECM tem um papel central no controle dos processos celulares básicos, como proliferação, diferenciação, migração e interacções celulares. A rede macromolecular da ECM é constituída por colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos que são secretados por células do tecido conjuntivo, fibroblastos e células epiteliais. Os componentes da ECM estão em íntimo contacto com as células e formam um leito gelatinoso tridimensional no qual as células se diferenciam. As proteínas que constituem ECM também estão ligadas às superfícies da célula de modo a transmitirem os sinais resultantes de alongamento e compreensão dos tecidos. A abundância relativa, a distribuição das proteínas e a organização molecular dos componentes da ECM variam

enormemente entre os tecidos, conforme sua estrutura e função (Baynes e Dominiczak, 2000).

A regeneração de órgãos e tecidos vivos na engenharia dos tecidos pode ser feita através de um pedaço de tecido retirado do próprio paciente, que é dissociado em células individuais. Estas células ou são implantadas directamente no hospedeiro ou são cultivadas *in vitro* sobre suportes naturais ou sintéticos, conhecidos como “scaffolds” (suportes poliméricos tridimensionais, matrizes tridimensionais, estruturas, etc.), que após proliferação são reinseridos no paciente (Atala, 2000).

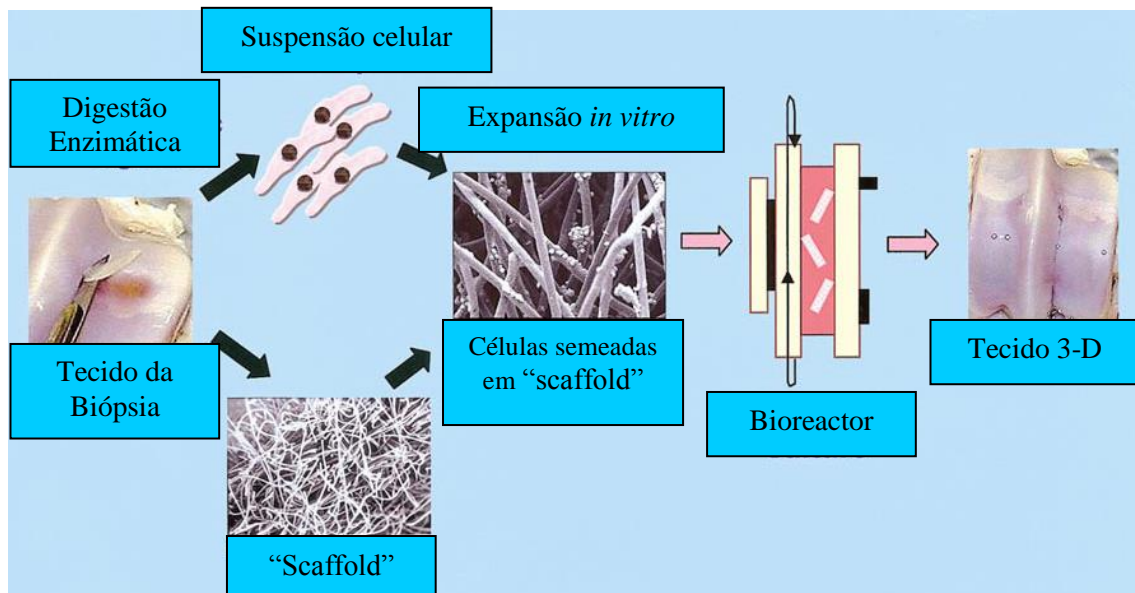
A fonte de tecido doador pode ser heteróloga (como bovino), alogénica (mesma espécie, mas de um indivíduo diferente) ou autóloga (do próprio hospedeiro). Idealmente, a substituição de tecido estrutural e funcional acontecerá com o mínimo de complicações, sendo as células autólogas onde se verificam melhores resultados, estas são retiradas por biópsia, multiplicadas *in vitro*, semeadas e cultivadas num suporte poroso biodegradável, tipicamente polimérico, auxiliadas por um conjunto de factores de crescimento; esta estrutura híbrida é posteriormente implantada na zona afectada, esperando-se que a regeneração do novo tecido acompanhe o desaparecimento do suporte polimérico tridimensional ou “scaffold” (ver figura nº 1) (Atala, 2007).



**Figura nº 1** - Estratégia de engenharia de tecidos para obtenção de um tecido através de células autólogas (Andersson e Christ, 2007).

O implante autólogo apresenta algumas vantagens sobre o transplante de órgãos. Pelo facto da população de células isoladas serem expandidas *in vitro* por meio de cultura celular, logo somente um pequeno número de células do doador são necessárias para se preparar o implante. O uso de células autólogas permite ainda evitar problemas imunológicos como rejeições ou processos alérgicos (Atala e Lanza, 2002).

Outra das estratégias usadas na engenharia dos tecidos é a utilização de bioreactores para oferecer condições semelhantes às do corpo humano, sendo um meio propício para a criação de produtos biológicos (Bronzino, 2006). O suporte polimérico utilizado é dimensionado com propriedades mecânicas e o tempo de degradação adequados para a inoculação das células até a sua inserção num bioreactor, onde ocorrerá a formação do tecido maduro. Nesta etapa as células semeadas proliferam e secretam a matriz extracelular durante a cultura *in vitro*. Enquanto o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente dá-se a proliferação celular e formação do tecido no reactor biológico. Somente após a formação do tecido o implante é inserido no organismo (Barbanti *et al*, 2005). Podemos ver esta estratégia da engenharia dos tecidos na figura 2, onde se pode observar as várias etapas de produção de novo tecido, neste caso da cartilagem, envolve expansão *in vitro* de células isoladas de uma biopsia, usando a tecnologia de um bioreactor.



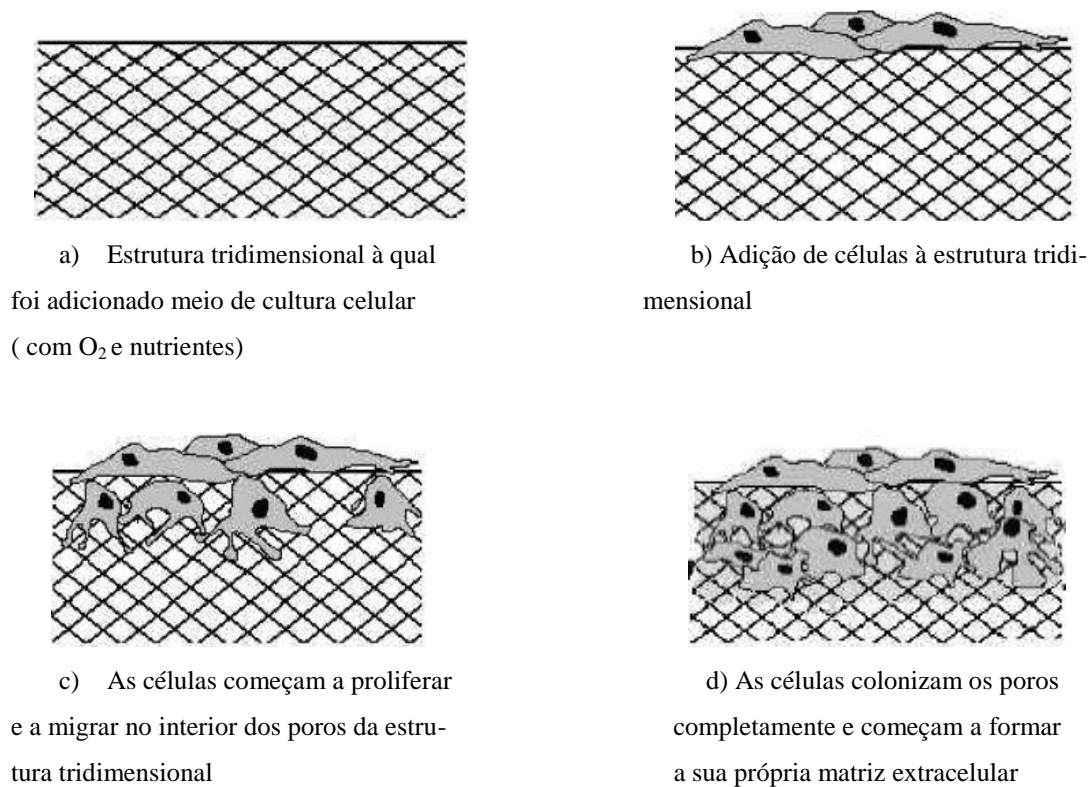
**Figura nº 2** - Estratégia de engenharia de tecidos para obtenção de um tecido cartilágneo utilizando um bioreactor (adaptado de Felicity e Oreffo, 2002).

Para além das estratégias mencionadas acima pode-se ainda recorrer à utilização de substâncias que induzem a regeneração do tecido danificado. Para a proliferação de muito tipos celulares (o que pode induzir à formação de um novo tecido), existe a dependência de uma combinação de vários factores de crescimento que são proteínas altamente específicas. Alguns factores de crescimento podem ser libertados lentamente através de cápsulas poliméricas e podem estimular o crescimento do tecido danificado (Lieberman *et al.*, 2002). Também se podem adicionar factores de adesão que são componentes proteicos de fluidos biológicos e/ou da matriz extracelular adsorvidos na superfície do material, como a fibronectina, vitronectina e a laminina as quais são reconhecidas por integrinas (receptores na membrana celular associados ao citoesqueleto). As integrinas ligam-se a pequenos domínios nos factores de adesão. Por exemplo a sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) encontrada na estrutura da fibronectina e vitronectina (Alberts *et al.*, 2002).

Uma das propriedades dos biomateriais é a porosidade, esta é definida como a percentagem de espaço oco nos sólidos (Karageorgiou e Kaplan, 2005). A influência da porosidade e da geometria do suporte polimérico é descrita como um dos factores determinantes na velocidade de degradação e proliferação do crescimento celular (Wu e Ding, 2004). A figura nº 3 mostra as etapas da adesão e proliferação celular na superfície de um material poroso (Sachlos e Czernuszka, 2003). Muitas aplicações em engenharia de tecido frequentemente requerem um “scaffold” com porosidade alta e alta área de superfície (Atala, 2007).

Numa experiência, osteoblastos de ratos foram colocados a crescer, *in vitro*, em estruturas de TiO<sub>2</sub> com diferentes tamanhos de poros. Concluiu-se que uma elevada porosidade não afecta a adesão das células mas facilita a proliferação, uma vez que o aumento da quantidade de poros facilita o transporte de nutrientes e oxigénio. Os poros largos favorecem a osteogénese, uma vez que permitem a vascularização e uma maior oxigenação (Karageorgiou e Kaplan, 2005). O processo de evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal mostra-se útil na confecção de suportes com alta porosidade.

A porosidade pode ser controlada pela quantidade de cloreto de sódio adicionado e o tamanho dos poros pelo tamanho dos cristais de sal. A técnica permite uma boa reprodutibilidade, com interconexão dos poros (McGlohorn *et al.*, 2004).



**Figura nº 3** - Diagrama que mostra as etapas da adesão e proliferação celular na superfície de um material poroso (adaptada de Sachlos e Czernuszka, 2003).

## 2) Biomateriais e suas aplicações

Na conferência de Chester, em 1991, definiu-se como biomaterial um “material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo” (citado em Gutierres *et al.*, 2006). Ao ser aplicado, deve manter as suas propriedades e características estruturais, mas simultaneamente substituir a função para a qual foi criado. É também importante que permita uma boa adesão celular à sua superfície, tenha uma resistência mecânica adequada, não tenha características oncogénicas, seja hemostático, esterilizável, e ainda que não provoque uma reacção adversa do hospedeiro, após a sua implantação no interior do organismo (Gutierres *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2004; Huhtala 2007). Por fim, que a sua produção em grandes quantidades seja fácil e com custos aceitáveis (Gutierres *et al.*, 2006).

O êxito da aplicação de um biomaterial no organismo, depende essencialmente de dois factores:

- da sua biofuncionalidade a qual está directamente relacionada com a capacidade do biomaterial desempenhar uma determinada função (ou parte desta) no organismo.
- da sua biocompatibilidade que se baseia na análise das reacções ocorridas na superfície do implante, não só aquando da sua implantação, mas também ao longo do tempo, quando este sofre um processo de degradação e desgaste. Deve-se certificar que não existem efeitos tóxicos, nem activação do sistema imune do organismo. E no caso do material ser biodegradável os produtos resultantes de degradação não podem ser tóxicos (Proubasta *et al.*, 1997).

Desde muito cedo sabe-se que os materiais polímeros sintéticos são extensamente usados como materiais na medicina são exemplos: implantes, pensos, dispositivos médicos, sistemas de libertação de agentes activos, próteses, entre outros (Lee, 1989). Existem três grupos principais de biomateriais que podem ser utilizados nesta área: polímeros (naturais ou sintéticos), cerâmicos e metais (Gutierrez *et al.*, 2006).

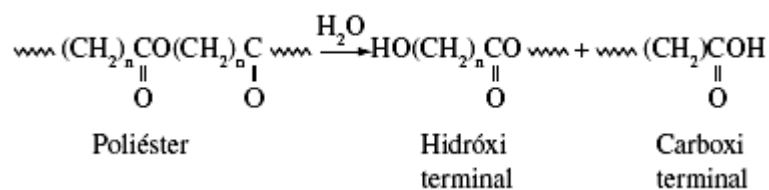
As vantagens principais dos polímeros comparadas com os metais ou materiais cerâmicos são a facilidade de serem produzidos com diferentes formas (látex, filme, folha, fibras, etc.), facilidade de processamento secundário e custo razoável (Park e Bronzino, 2003). Por outro lado uma das grande desvantagens dos polímeros, é o controlo das propriedades mecânicas ao longo do tempo, no entanto, estruturas não degradáveis, como os metais e cerâmicas, simplificam este problema e desempenham uma função duradoura, mas comprometem a função e reparação dos tecidos, uma permanência do biomaterial no local impede a formação de novo tecido no espaço que este ocupa (Muschler *et al.*, 2004). Outra limitação está relacionada com o facto de que nem todas as células implantadas sobreviverem, devido à competição entre células pelo oxigénio disponível. A morte celular resulta na libertação de produtos da lise celular e pode aumentar a resposta inflamatória no local de implante (Muschler *et al.*, 2004). A degradação de alguns polímeros tanto *in vivo* como *in vitro*, liberta compostos que levam a alterações de pH, o que provoca uma diminuição da taxa de crescimento celular (Sachlos e Czernuszka, 2003).

As características básicas para um polímero ser utilizado são: grande porosidade, grande superfície de contacto celular, estrutura constante, forma tridimensional e biocompatibilidade. A função de um polímero é proporcionar um crescimento celular, seja dos tecidos adjacentes a este ou das células semeadas nele. Há muitos materiais

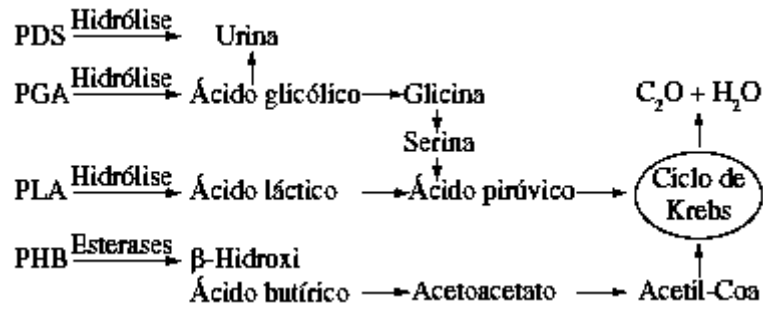
biocompatíveis que se podem utilizar como polímeros, dando-se preferência aos biodegradáveis um vez que não necessitam de remoção cirúrgica após terem finalizado a sua função (Atala, 2007).

Segundo Vert e seus colaboradores biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser metabolizados por elementos biológicos, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de acção, e em muitos casos do organismo (Vert *et al.*, 1992). A bioreabsorção ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com características dos metabolitos orgânicos, especificamente os ácidos do ciclo de krebs e que são eliminados totalmente do corpo (Ali *et al.*, 1993).

O processo de biodegradação e bioreabsorção dos poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos) é descrito na literatura através de uma sucessão de eventos. Exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente os materiais sofrem hidrólise simples, como se pode observar na figura 4. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligómeros solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente activo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva (Elke *et al.* 2005). As formas de eliminação dos produtos de degradação de alguns poliésteres podem ser vistas na figura 5.



**Figura nº 4** - Degradação dos poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos) pelo processo de hidrólise ( Adaptado de Barbanti *et al.*, 2005).



**Figura nº 5** - Via de degradação e excreção de alguns poliésteres: poli(*p*- dioxano) [PDS], poli(ácido glicólico) [PGA], poli(ácido láctico) [PLA] e poli(hidroxibutirato) [PHB] (Adaptado e modificado de AN *et al.*, 2000).

Na engenharia dos tecidos, os polímeros sintéticos poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA) e ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), são amplamente usados uma vez que são biocompatíveis e biodegradáveis. Estes polímeros ganharam aprovação de FDA (Food and Drug Administration) para uso humano em diferentes aplicações, inclusive suturas cirúrgicas (Atala, 2007).

Os produtos de degradação de PGA, PLA e PLGA são metabolitos não tóxicos e são eventualmente eliminados do corpo por simples hidrólise na forma de dióxido de carbono e água. Uma forma injectável de PLA foi aprovada pela FDA para comercialização indicadas para pacientes com lipodistrofia causada pelas drogas antiretrovirais na terapia contra o HIV (Moyle *et al.*, 2004).

Os biomateriais sintéticos não cumprem completamente as necessidades actuais em termos de aplicações desejadas e assim, recentemente, muitos investigadores têm concentrado os seus estudos em materiais de origem natural (Silva *et al.*, 2007).

Existem numerosos biomateriais naturais entre os quais se encontram o colágeno, gelatina, alginato, quitosano e o dextrano, entre outros. Estes materiais apresentam como principal vantagem moléculas que facilitam a adesão, proliferação e diferenciação celular. No entanto, apresentam também desvantagens, nomeadamente a dificuldade em controlar a sua degradação pelas diferentes enzimas existentes no organismo (Bronzino, 2006).

O quitosano, é um dos polímeros pseudo-natural mais utilizados na preparação de hidrogéis, nomeadamente para substituinte da pele humana em pacientes queimados (Santos *et al.*, 2006). O quitosano, ou *N*-carboxibutilquitosano, é um derivado da desacetilação da quitina. É um composto não imunogénico e que apresenta uma

degradação em meio aquoso lenta, mesmo com a presença de lisozimas. O seu produto de degradação, a glicosamina, não é tóxico. Foi observado em membranas porosas de quitosano que estas são apropriadas para o crescimento celular (Ma *et al.*, 2001).

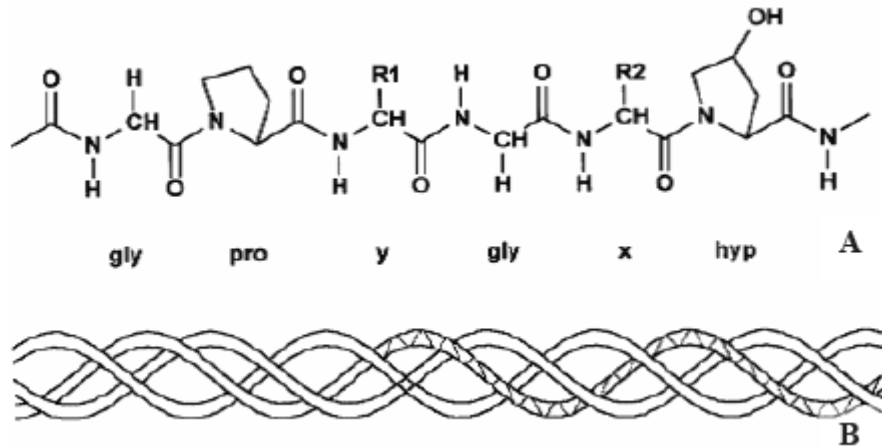
Alginato, é um polissacarídeo isolado a partir de uma alga e é usado como transporte de células (Atala, 2007).

## **2.1 Biomateriais naturais utilizados neste trabalho**

O colagénio é a proteína mais abundante no corpo humano (componente principal da ECM), e pode ser purificada dos tecidos através de processos enzimáticos ou químicos (extração sal/ ácido) (Li, 1995). Colagénio tipo I, é o polímero natural mais usado e é derivado tipicamente de bovino ou osso de porco, pele ou tendão (Winn *et al.*, 1998). A molécula de colagénio consiste em três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, formando uma estrutura chamada tripla hélice (figuras nº 6 B). Cada cadeia polipeptídica possui aproximadamente 1038 resíduos de aminoácidos (figura nº 6 A) (Friess *et al.*, 1998). A estrutura da hélice tripla é permitida devido a uma sequência de aminoácidos repetitiva chamada (Gly-X-Y)<sub>n</sub>, onde Gly é glicina, X frequentemente prolina (Pro) e Y normalmente hidroxiprolina (Hyp) (Bronzino, 2006).

O colagénio possui um baixo risco inflamatório, não é tóxico e é biodegradável (Boccafoschi *et al.* 2005) é ainda resistente a forças de distensão e as suas propriedades podem ser alteradas por modificação de seus grupos funcionais (Boccafoschi *et al.* 2005). É também considerado um meio adequado para a regeneração óssea. Um compósito deste tipo, de origem bovina, aprovado pela FDA sob a denominação de “Collagraft”, revelou ótimos resultados quando associado a células de medula, por exemplo no tratamento de artroses vertebrais ou para o preenchimento de cavidades quísticas (Gutierrez *et al.*, 2006).

Porém o colagénio também apresenta desvantagens como degradação rápida, grande hidrofobicidade que pode causar um inchaço significativo após a sua implantação, uma baixa resistência a forças mecânicas de compressão e um alto custo de purificação (Ma, 2003). Implantes feitos de colagénio são degradados por um ataque sequencial através de enzimas do lisossoma (Silver e Pins, 1992).

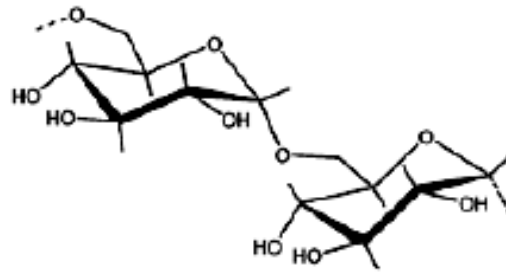


**Figura nº 6** - Estrutura do colagénio tipo I. A) Sequência de aminoácidos. B) Tripla hélice de colagénio (adaptada de Friess *et al.*, 1998).

A gelatina é derivada do colagénio, obtida por desnaturação da tripla hélice. É uma proteína animal constituída por 19 aminoácidos unidos por ligações peptídicas que podem ser hidrolisadas por uma variedade de enzimas proteolíticas, para libertar os aminoácidos constituintes ou os péptidos. É solúvel em água, biodegradável e é utilizada na indústria alimentar, em aplicações farmacêuticas e biomédicas. Tem sido utilizada como cobertura de vários fármacos e na preparação de hidrogéis biodegradáveis (Chandra e Rustgi, 1998).

A estabilização dos biomateriais baseados em colagénio é necessária para diminuir a susceptibilidade à degradação enzimática. Somente materiais suficientemente estáveis manterão as propriedades mecânicas requeridas durante o período de implantação desejado. O ácido adipídico dihidrazido (AAD) é um agente reticulante comum na estabilização de colagénio e gelatina (Silva *et al.*, 2007).

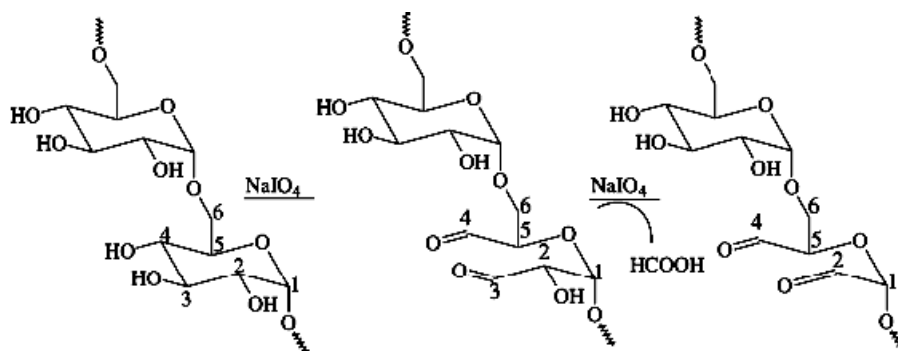
Dextranos são polissacarídeos de elevado peso molecular, que consistem em unidades de  $\alpha$ -D-glucose ligadas predominantemente por ligações glicosídicas 1-6 (ver figura nº 7). A metabolização do dextrano é realizada pela acção da enzima dextranase que se encontra em vários órgãos (como o fígado, baço, rins e cólon) que o degrada a glicose e que é depois totalmente hidrolisada para formar dióxido de carbono e água (Mehvar, 2000).



**Figura nº 7** - Estrutura do dextrano (adaptado de Coviello et al., 2007).

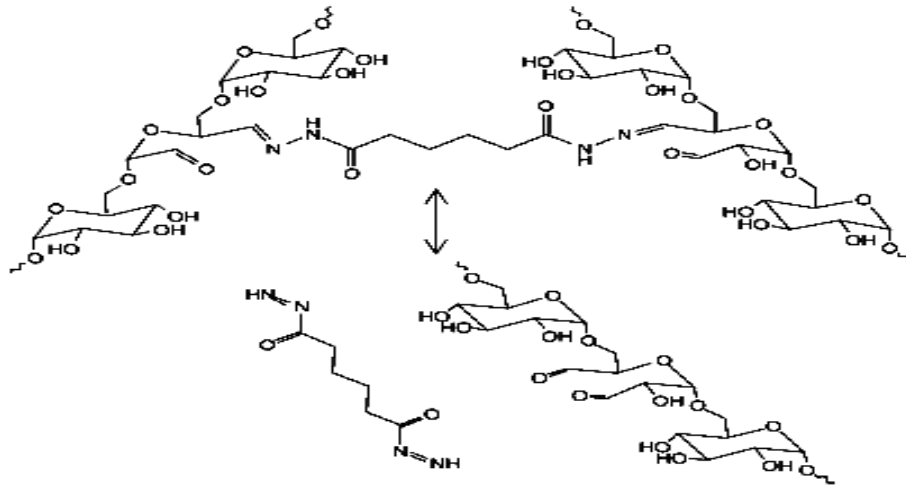
Os dextrans são vastamente utilizados para aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade e baixo custo. Dentro destas aplicações destacam-se o desenvolvimento de agentes de contraste para imagiologia médica, sobretudo com o objectivo de aumentar o tempo de retenção destes compostos na circulação e síntese de hidrogéis, nomeadamente recorrendo à tecnologia enzimática, ou à oxidação do dextrano (Maia *et al.*, 2005). Também tem sido usado na separação e purificação de materiais biológicos (Ferdous et al., 2004). Recentemente foi descrito um hidrogel composto por N-carboxietilquitosano e dextrano oxidado capaz de aumentar a capacidade de cura de feridas em ratos (Weng *et al.*, 2008).

Dextrano possui grupos de hidroxilo que são oxidados por periodato, produzindo múltiplos grupos de aldeído funcionais (figura nº 8) servindo como pontos de ligações macromoleculares para polímeros com grupos aminas livres de modo a formar hidrogéis (Weng et al. 2008).



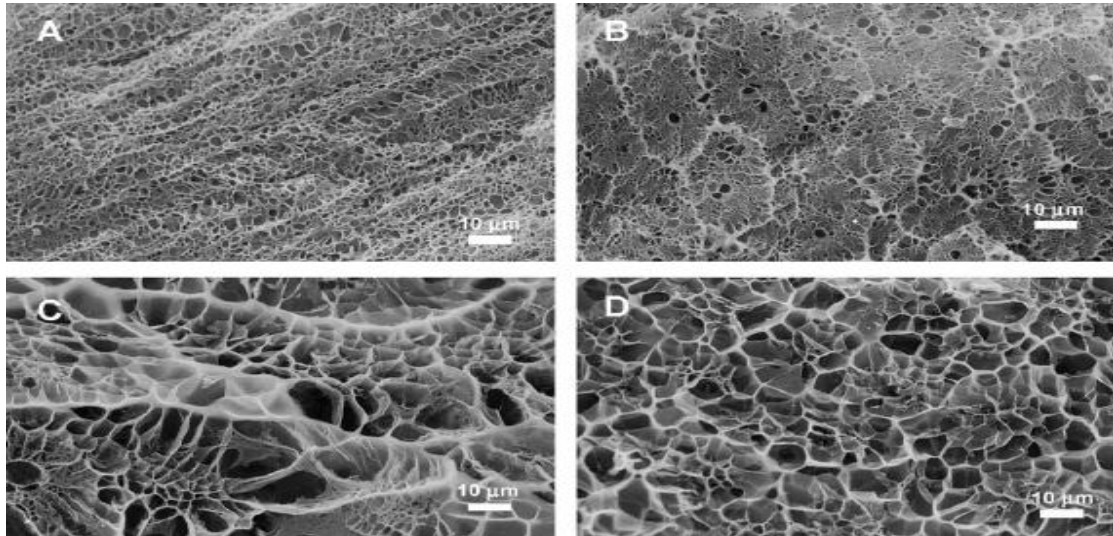
**Figura nº 8** – Estrutura do dextrano e representação esquemática da sua oxidação por periodato de sódio (adaptado de Maia *et al.*, 2005).

Foi descrito uma formulação injectável composta por dextrano oxidado (DexOx) ligado ao AAD. Dextrano oxidado 15% (DexOx 15%) quando misturado com AAD forma um gel ao fim de 2-4 minutos conforme a concentração de agente reticulante (AAD). Os grupos aldeído presentes no dextrano oxidado reagem com o grupo hidrazida do AAD (figura nº 9) (Maia *et al.*, 2005).



**Figura nº 9** – Reacção entre o dextrano oxidado e o ácido adipídico dihidrazido (adaptado de Maia *et al.*, 2005).

Durante a degradação, existe um aumento dos poros do dextrano oxidado que pode contribuir para o crescimento das células no interior deste, contribuindo para uma melhor integração junto das células vizinhas ao local de implante (como se pode ver na figura nº 10) (Maia *et al.*, 2005).



**Figura nº 10** - Imagens de microscopia electrónica de varrimento (SEM) de dexOx 15 % e AAD 10 % antes de ser imerso (A) depois de imerso em PBS após 3 dias (B) após 6 dias (C) e 11 dias (D). É notório o aumento da porosidade (adaptado de Maia *et al.*, 2005).

## 2.2 Hidrogéis

Hidrogéis são materiais fortemente hidratados que são usados na regeneração dos tecidos como substitutos da matriz extracelular (Haines- Butterick *et al.*, 2007). Os hidrogéis são materiais que quando colocados em excesso de água incham rapidamente e conservam um grande volume de água na sua estrutura tridimensional (Chandra e Rustgi, 1998). O conteúdo polimérico dentro dos hidrogéis é normalmente abaixo dos 10% em peso, sendo atribuído o restante peso à água (aproximadamente 90%) quando se encontra no estado inchado (Tessmar e Göpferich, 2007).

Isto deve-se ao facto dos hidrogéis serem compostos por cadeias poliméricas tridimensionais hidrofílicas que podem ser sintéticas ou naturais. A integridade estrutural dos hidrogéis depende das ligações formadas entre as cadeias poliméricas que são normalmente reticuladas física ou quimicamente. Na reticulação “química” ou “permanentes” as cadeias são unidas por ligações covalentes, enquanto que na reticulação “física” ou “reversíveis” as cadeias estão conectadas por ligações tipo ponte de hidrogénio, interacções de *Van der Waals*, iónicas e hidrofóbicas (Hoffman *et al.*, 2002; Lin e Metters, 2006).

A importância dos hidrogéis como biomateriais deve-se à semelhança das suas propriedades físicas com os tecidos vivos, tais como o elevado conteúdo em água, consistência macia e elástica e baixa tensão superficial. Em função destas propriedades, os hidrogéis têm contribuído para o desenvolvimento de uma variedade de aplicações médicas (Peppas *et al.*, 1996). Por exemplo em sistemas de entrega direccionada de fármacos (McCulloch e Shalaby, 1998), em materiais para suportes tridimensionais poliméricos para organizar células (Kane *et al.*, 1996), membranas de hemodiálise, lentes de contacto flexíveis, enxertos vasculares, penso de ferida e imobilização de proteínas, células, entre outros (Ishihara *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003).

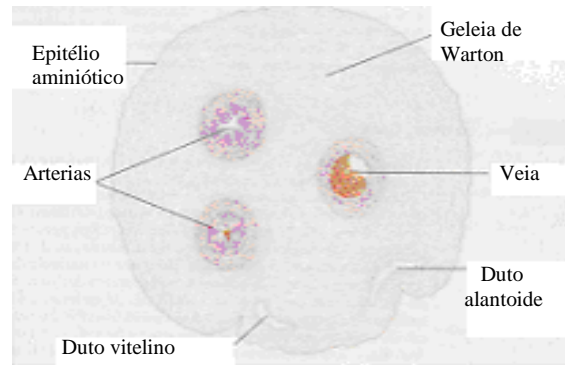
Recentemente, Van Tomme e colaboradores descreveram diferentes estratégias na produção de hidrogéis baseados no dextrano, demonstrando-o como um polímero muito versátil para síntese de hidrogéis (Van Tomme *et al.*, 2007). Por exemplo, estudos demonstram que o dextrano e seus derivados estão entre os candidatos mais promissores na preparação de hidrogéis capazes da entrega controlada de droga (Coviello *et al.*, 2007).

### **3) Morfologia do cordão umbilical humano:**

O cordão umbilical liga o *umbilicus* do feto à placenta, é uma estrutura com cerca de 50-60 cm de comprimento e 1 a 2,5 cm de diâmetro, contém três vasos sanguíneos (duas artérias enroladas em torno de uma veia), envolvidos helicoidalmente pela geleia de Wharton's, não apresenta fibras nervosas nem vasos linfáticos (ver figura nº 11) (Di Naro *et al.*, 2001; Zang, 1999).

A geleia de Wharton é composta por elevadas quantidades de fibras de colagénio, substância fundamental, ácido hialorónico, sulfatos de glicosaminoglicanos e alguns fibroblastos (Zhang, 1999; Todros *et al.*, 2002). Esta geleia é envolvida por uma fina camada de epitélio amniótico queratinizado (Todros *et al.*, 2002).

Os vasos são usualmente tortuosos e dispõem-se em espiral tendo, portanto, um comprimento maior que o próprio cordão (Graça *et al.*, 2000).



**Figura nº 11** - Corte transversal do cordão umbilical (adaptada de Zhang, 1999).

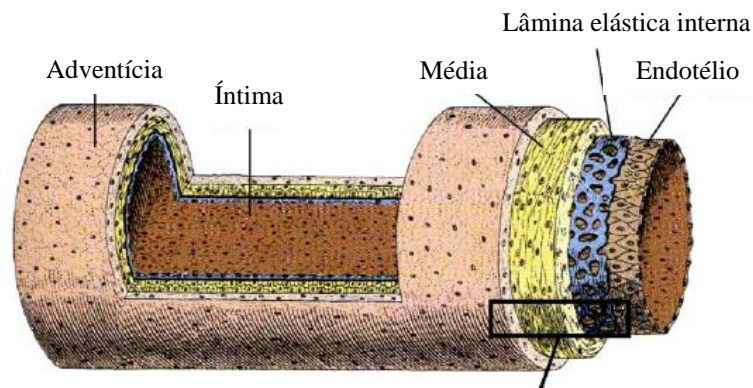
Por vezes surgem anomalias na constituição do cordão umbilical que se caracterizam pela presença de uma veia e uma única artéria umbilical. Esta situação pode causar morte intra-uterina ou pós-parto do embrião. A única artéria presente pode, por vezes, apresentar um diâmetro superior ao normal, chegando até a ter um diâmetro semelhante ao da veia umbilical (Di Naro *et al.*, 2001).

A geleia de Wharton pode participar na regulação do fluxo do sangue umbilical e pelo menos em alguns casos, a redução do crescimento fetal pode ser consequência de uma diminuição da geleia de Wharton, levando a hipoplasia dos vasos umbilicais (Di Naro *et al.*, 2001). Existem também casos raros e incomuns onde existe ausência de geleia de Wharton à volta das artérias umbilicais causando morte perinatal (Kulkarni *et al.*, 2007). O risco de pré-eclampsia em mulheres após o parto está frequentemente associado à reduzida quantidade de geleia de Wharton à volta da veia umbilical humana (Raio *et al.*, 2002).

### **3.1 Morfologia dos vasos sanguíneos:**

Normalmente as artérias do corpo humano são compostas por três camadas (Saladin, 2001; Zhang, 1999) (ver figura nº 12): a túnica externa (adventícia) é constituída por tecido conjuntivo frouxo (composto por “vasa vasorum”), fibras nervosas, células adiposas, fibras elásticas e fibroblastos; a túnica média é constituída por músculo liso, colagénio e por tecido elástico. O músculo liso é responsável pela vasoconstrição e vasodilatação dos vasos sanguíneos; a túnica interna (íntima) é a

camada mais interna em contacto com o sangue, é constituída por uma camada de células endoteliais (endotélio), camada sub-endotelial e lâmina elástica interna. O endotélio actua como barreira permeável selectiva de solutos sanguíneos e segrega agentes vasoconstritores/vasodilatadores (Saladin, 2001; Zhang, 1999).



**Figura nº 12** - Representação da estrutura dos vasos sanguíneos mostrando as três túnicas (adaptado de Patel *et al.*, 2006).

No entanto, a artéria umbilical humana (AUH) é mais simples que as restantes artérias do organismo. Não existe nenhuma camada sub-endotelial ou lâmina elástica interna adjacentes estando assim o endotélio em contacto directo com a camada muscular. Esta é composta por apenas uma camada longitudinal interna (de lúmen irregular, sem nervos nem vasa vasorum) e tem uma camada circular externa contínua com geleia de Wharton (Zhang, 1999). A veia umbilical exhibe uma invulgar camada muscular espessa, intercalada com fibras musculares lisas, dispostas circular, longitudinal e obliquamente. Além disso, apresenta uma lâmina elástica interna, a qual permite distinguir a veia das referidas artérias (Zhang, 1999).

As duas artérias umbilicais levam o sangue não oxigenado do embrião para a placenta, enquanto a única veia transporta o sangue oxigenado (rico em nutrientes) da placenta para o embrião (Moore e Persaud, 2000). É, portanto, importante que as artérias possuam paredes adequadas para assegurar um rápido e eficiente fluxo de sangue para os tecidos, de forma a fornecer-lhes os nutrientes necessários e remover os produtos de degradação. O colagénio promove a tensão, a elastina é responsável pelas

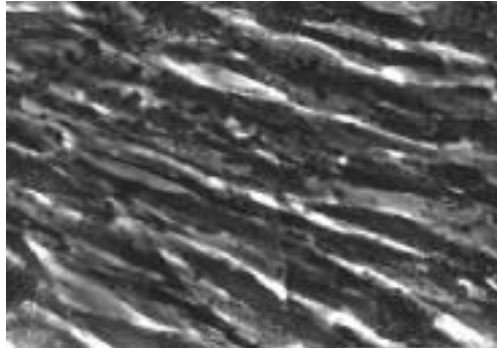
propriedades elásticas e os proteoglicanos contribuem para a compressibilidade (Racliffe, 2000).

A comunicação entre células é um processo essencial e importante para a manutenção da normal fisiologia dos tecidos. No tecido vascular ocorrem interações estruturais e metabólicas entre o endotélio e as células do músculo liso. A manutenção da estrutura normal de uma artéria depende dessas interações. As células endoteliais e do músculo liso actuam como um sistema de transmissão de sinais, dos receptores localizados na superfície do endotélio para a parede das artérias e vice-versa, das células do músculo liso para as endoteliais. Esta interação entre as células nas paredes dos vasos é considerada como sendo um importante factor no controlo do crescimento e função dos vasos sanguíneos. Durante a formação dos vasos sanguíneos, factores de crescimento libertados pelas células endoteliais induzem a migração das células mesenquimais indiferenciadas em direcção às endoteliais, e após o contacto entre estes dois tipos de células ocorre a diferenciação das células mesenquimais em células do músculo liso (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2003).

#### **4) Músculo liso:**

O músculo liso encontra-se presente em diferentes locais do organismo, entre eles temos: vasos sanguíneos, tubo digestivo, aparelho respiratório, urinário e reprodutor, derme, íris e corpo ciliar do olho, onde é sujeito a vários estímulos de natureza mecânica, hormonal e neuronal. O nome do músculo liso advém do facto da organização das proteínas contrácteis não apresentarem uma aparência estriada (Burkitt *et al.*, 2000; Zhang, 1999; Solomon e Phillips, 1987).

As fibras do músculo liso são células alongadas, envolvidas por tecido fibroelástico que forma uma porção contráctil em alguns órgãos. Uma célula muscular apresenta aproximadamente 20 a 50  $\mu\text{m}$  de comprimento e cerca de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de largura, na zona central (mais larga) encontra-se apenas um núcleo ovóide como se pode observar na figura nº 13 (Burkitt *et al.*, 2000).

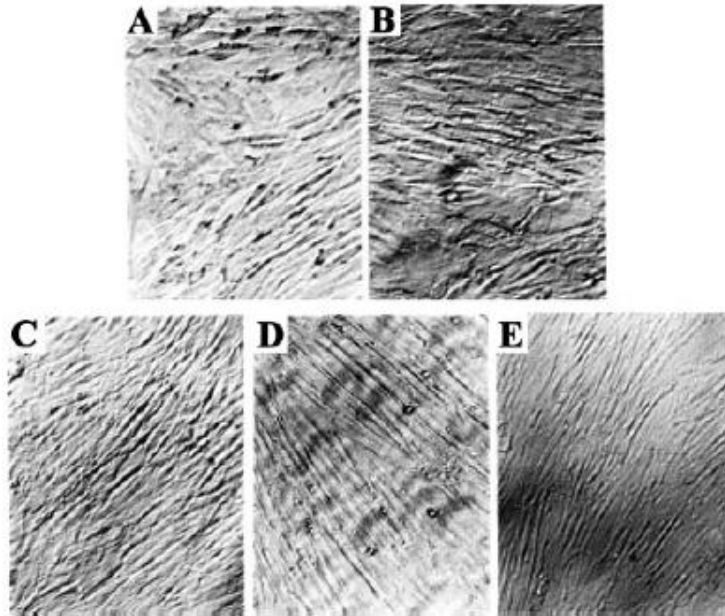


**Figura nº 13** - Células do músculo liso isoladas a partir da artéria umbilical humana (adaptada de De Llano *et al.*, 2007).

As células são alinhadas paralelamente com as células adjacentes e ligam-se pelas suas terminações cónicas formando fascículos ramificados irregulares (Zhang, 1999). Nas paredes dos vasos sanguíneos, as fibras musculares lisas estão dispostas de modo circular e servem para modificar o calibre do vaso (Snell, 1999). As células do músculo liso vascular (VSMC) são responsáveis não só por manter a tensão da parede das artérias mas também pelo crescimento vascular, remodelação e reparação (Pauly, 1998).

Observam-se três tipos de filamentos no músculo liso vascular: os filamentos finos compostos principalmente por actina; os filamentos densos compostos principalmente por miosina; e os filamentos intermédios constituídos essencialmente por desminina (Murphy *et al.*, 1999).

A presença de células do músculo liso (SMC) em cultura apresenta uma aparência “hill and valley” e a sua presença é confirmada pelo sinal positivo da  $\alpha$ -actina do músculo liso através da técnica de imunofluorescência (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2006).



**Figura nº 14** - Fotografia de fase-contraste das VSMC da artéria umbilical humana. As imagens mostram a evolução das células após serem cultivadas no meio M199 com 10% FBS nas placas (A) e após 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 (E) horas. Após 72 horas verifica-se a confluência total das CMVL (adaptado de Han *et al.*, 2006).

## 5) Cultura de células

A cultura de células define-se como o conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias. A cultura de células para expansão celular pode contribuir para a formação de um novo tecido. Estudos efectuados sugerem que a cultura de células do músculo, medula óssea e células de tecido adiposo podiam ser úteis para a regeneração do osso, cartilagem, músculo e tendões. Contudo, a expansão de células por cultura *in vitro* envolve também alguns riscos, nomeadamente contaminações por bactérias, fungos, vírus ou por depleção da capacidade proliferativa do tecido após implantação e um elevado custo (Muschler *et al.*, 2004).

As culturas celulares são divididas em “culturas primárias” e “cultura de linhas celulares”. As culturas primárias consistem em culturas de células, tecidos ou órgãos isolados directamente do organismo e são assim consideradas até serem subcultivadas com sucesso pela primeira vez. Tornam-se depois linhas celulares (Mather e Roberts, 1998).

A câmara de fluxo laminar é a forma mais segura de criar um ambiente estéril para efectuar a cultura de células. Todo o material utilizado para cultura de células deve ser estéril. A esterilização pode ser feita através da autoclave sendo a técnica mais utilizada para esterilizar o equipamento da sala de cultura. É também utilizada a esterilização por ultra-violeta, para a esterilização do material, das câmaras de fluxo laminar e das incubadoras. Em alguns casos o material que não pode ser autoclavado, nem posto em ultra-violeta, sendo esterilizado com etanol 70 %. As características que nos podem indicar infecções microbianas são: variação súbita no pH do meio (mudança da cor do meio); turbidez do meio e espaços livres no meio do crescimento celular.

A maioria das culturas celulares é mantida em crescimento em incubadoras a 37° C com uma atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. As incubadoras humidificadas são uma comum fonte de contaminações pois estas requerem água para promover os níveis de humidade adequados que podem levar ao crescimento de vários fungos, na água colocada no interior ou até nas paredes e tubagem da incubadora. Estas incubadoras devem ser limpas periodicamente. As células em cultura devem ser observadas ao microscópio periodicamente para determinar a sua taxa de proliferação e ausência de contaminações. As culturas contaminadas devem ser imediatamente retiradas da incubadora e eliminadas (Spector *et al.*, 1998).

As células necessitam de oxigénio para o seu metabolismo. Este é fornecido pelo meio de cultura. O oxigénio é normalmente difundido apenas nos primeiros milímetros a partir da superfície. Assim sendo um excesso de meio de cultura provoca uma inibição na difusão do oxigénio e um lento crescimento das células. Por outro lado, baixas quantidades de meio podem provocar a morte celular por falta de nutrientes (Mather e Roberts, 1998).

Uma diferença clara entre o ambiente *in vitro* e *in vivo* está na superfície à qual as células aderem e a forma que elas adquirem. Vários estudos têm sido realizados para demonstrar os efeitos, que a superfície onde as células aderem, pode ter na forma e na função das células em estudo. As placas e frascos de cultura podem ser revestidos por proteínas de ligação como laminina, colagénio ou fibronectina. As células podem ser submetidas a stress devido a alterações do ambiente de cultura, por exemplo, alterações de pH ou temperatura, o que pode levar à sua morte (Mather e Roberts, 1998).

A subcultura de células envolve a remoção do meio de cultura, a lavagem das células, a dissociação das células aderidas, normalmente com tripsina (uma enzima proteolítica que destrói a matriz e as proteínas de ligação entre as células) e a

distribuição da suspensão celular num novo frasco de cultura contendo meio de cultura adequado (Mather e Roberts, 1998).

A criopreservação das células é um passo importante, pois serve como fonte de células, no caso de perda da cultura celular por exemplo, por contaminação das células em cultura (Spector *et al.*, 1998). Os danos ocorridos durante a criopreservação são atribuídos a vários factores directos ou indirectamente relacionados com a formação de gelo intra ou extracelularmente. No entanto, o mecanismo exacto de dano durante a criopreservação é ainda desconhecido. A formação de gelo intracelular quebra o citoesqueleto (Bronzino, 2006). Dois reagentes, glicerol e dimetilsufóxido (DMSO), são normalmente usados como agentes criopreservantes no meio de congelação para prevenir a formação de cristais intracelulares (Spector *et al.*, 1998). O DMSO é tóxico a altas temperaturas e tem um poder mutagénico e tóxico em altas concentrações (Bronzino, 2006). O soro bovino fetal (FBS) é adicionado em maior concentração no meio utilizado para congelar as células (Spector *et al.*, 1998).

## 5.1 Meios

Os meios de cultura são compostos por aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, glucose e soro (Spector *et al.*, 1998). O Meio Essencial Mínimo (MEM) desenvolvido por Harry Eagle, é um dos meios de cultura usados para o crescimento de *células in vitro*. O Meio MEM é considerado uma solução nutritiva padrão em cultura de células por possuir os nutrientes básicos para a manutenção celular. O meio Dulbecco's MEM inclui concentrações de aminoácidos maiores que o MEM assemelhando-se às concentrações proteicas das células de mamíferos (Mather e Roberts, 1998).

Como suplemento à maioria dos meios de cultura temos o soro (fonte de factores de crescimento, hormonas e factores de ligação), este tem de ser testado para cada tipo de células pois pode conter componentes tóxicos para alguns tipos de células (Spector *et al.*, 1998). Podem ser usados soros de diferentes espécies animais para suplementar uma cultura celular, sendo os mais usados os de origem bovina, equino ou soro humano (Mather e Roberts, 1998).

Para minimizar contaminações adiciona-se à maioria das culturas antibióticos, antimicóticos e vermelho de fenol como indicador de pH. O pH da maioria das culturas

varia entre 7,2 e 7,4 (Spector *et al.*, 1998). O pH do meio é importante para manter um correcto funcionamento das enzimas celulares, para uma óptima ligação das hormonas e factores de crescimento aos receptores da superfície celular e ainda para manter o equilíbrio iónico apropriado. O sistema bicarbonato de sódio – dióxido de carbono é o sistema tampão na maioria dos meios de cultura. Ocorre uma descida do pH devido à interacção do CO<sub>2</sub> libertado pelas células ou pelo ambiente segundo esta equação:  $H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ . Quando aumentamos a concentração de bicarbonato no meio neutraliza o efeito de CO<sub>2</sub> da seguinte forma:  $NaHCO_3 \leftrightarrow Na^+ + HCO_3^-$ . Elevada concentração de bicarbonato no meio requer uma maior percentagem de CO<sub>2</sub> para promover o pH apropriado e também para uma melhor capacidade de tamponização (Mathre e Roberts, 1998).

Os meios de cultura devem ser filtrados e os frascos onde estes são armazenados apenas abertos na câmara de fluxo laminar. Os meios são conservados a 4°C e devem ser aquecidos a 37°C antes de se adicionarem às células (Spector *et al.*, 1998).

## 5.2 Factores de crescimento

Os factores de crescimento são proteínas utilizadas em cultura de células *in vitro* ou *in vivo*, para promover a proliferação celular (Suh, 2000).

O factor de crescimento epidermal (EGF) tem cerca de 6 kDa e provem da glândula submaxilar ou pode ser isolado da urina humana. Os seus alvos são as células epidermais, fibroblastos, células da glia e células endoteliais. O factor de crescimento de fibroblastos-1 (FGF-1), também conhecido como factor de crescimento de células endoteliais, tem cerca de 16 kDa, e é isolado do olho, cérebro e é também produzido pelo embrião. É indicado para vários tipos de células derivadas da mesoderme e da ectoderme, incluindo fibroblastos, células músculo liso, células endoteliais vasculares e células da glia. O factor de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) tem cerca de 18 kDa e é produzido pela maioria dos tecidos adultos e também pelos embriões. Tem igualmente acção em vários tipos de células derivadas da mesoderme e da ectoderme, incluindo fibroblastos, células do músculo liso, células endoteliais vasculares e células da glia (Spector *et al.*, 1998).

VEGF (factor de crescimento endotélio-vascular) foi caracterizado como um potente factor de crescimento endotelial e estimulador de permeabilidade endotelial (Infanger *et al.*, 2007). VEGF tem um papel central na formação e função de novos vasos sanguíneos (no caso de ocorrer angiogénese por exemplo) serve também para auxiliar no crescimento dos tecidos e órgãos do organismo (Denizot *et al.* 2007; Aird, 2007).

A geleia de Wharton é considerada um reservatório de factores de crescimento de péptidos como: factor de crescimento “insulin-like I” (IGF-I), factor de crescimento de fibroblastos (FGF), Factor de crescimento transformador de beta (TGF-beta), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e factor de crescimento epidermal (EGF) (Malkowski *et al.* 2007). O facto da geleia de Wharton possuir um número de células muito baixo e uma quantidade de componentes de matriz extracelular muita elevada, indica que estas células são estimuladas pelos factores crescimento e produzem grandes quantidades de colagénio e glicosaminoglicanos (Sobolewski *et al.*, 2005).

## **6) Determinação da viabilidade celular e citotoxicidade dos biomateriais**

De entre os estudos bioquímicos necessários ao desenvolvimento de novos biomateriais, os testes de citotoxicidade são de importância primordial. Hoje em dia, a utilização de culturas celulares em placas multipoços é uma prática corrente para a avaliação de novos compostos com potencialidade farmacológica, uma vez que permite a manipulação de várias amostras simultaneamente, além de ser um procedimento económico e que permite uma certa automatização (Freshney, 1994). Recentemente, os ensaios de citotoxicidade têm sido dominados pelo uso de técnicas colorimétricas (Freshney, 1994).

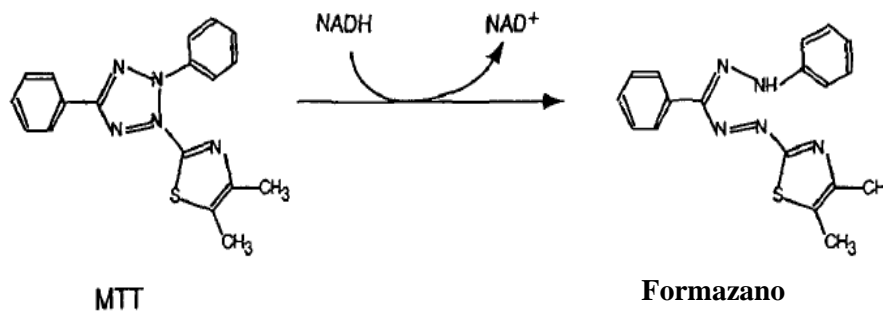
Para determinar os efeitos dos diferentes materiais, quando são colocados em contacto directo com as células, têm sido usados diversos métodos como, por exemplo, contagem das células viáveis, determinação de taxas de proliferação celular e determinação de actividade de enzimática (Ames, 1973). Normalmente para estes testes

são usadas células cultivadas sob condições padrões e submetidas à acção do material (Bhatia e Yetter, 2007).

Os ensaios de biocompatibilidade *in vitro* no presente trabalho foram analisados por viabilidade celular (azul de triptano e MTT).

### 6.1 Teste do MTT

Um dos métodos mais utilizados na avaliação da viabilidade celular de diferentes compostos é o teste da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), devido à sua rapidez, versatilidade e alta reprodutibilidade (Supino, 1995). Este teste colorimétrico baseia-se na capacidade das células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazano insolúvel, de acordo com a reacção indicada na figura nº 15 (Vande *et al.*, 2006).



**Figura nº 15** - Estruturas químicas do MTT e do formazano (adaptado de Liu, 1999).

Os sais de tetrazólio atravessam a membrana celular e entram para a célula onde aceitam electrões a partir de substratos oxidados, ou de determinadas enzimas, sendo particularmente reduzidos como resultado da actividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Serrano *et al.*, 2004). Esta reacção converte os sais de MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em endossomas e

são posteriormente transportados para a superfície celular através de um processo de exocitose (Supino, 1995; Liu, 1999). Os referidos cristais de formazano podem ser posteriormente dissolvidos num solvente orgânico (por ex. isopropanol), que permita a sua quantificação por espectrofotometria (Supino, 1995; Freshney, 1994). O ensaio de MTT permite a sua utilização na quantificação espectral não radioactiva da proliferação de celular e viabilidade em populações de células que usam placas de 96 poços (Sjogren *et al.*, 2000).

Estudos mais recentes demonstraram que a mitocôndria não tem um papel exclusivo na redução do MTT, uma vez que outras fracções subcelulares importantes (incluindo a nuclear, a microssomal e a citosólica) podem igualmente reduzir o MTT, funcionando o NADH ou o NADPH citoplasmáticos eventualmente como melhores substratos para a redução do MTT do que o próprio succinato (Liu, 1999).

Sendo assim, deve ter-se em consideração que a redução do MTT poderá não exprimir necessariamente actividade metabólica a nível mitocondrial. Para além disso a toxicidade intrínseca do MTT pode de algum modo contribuir para a morte celular eventualmente verificada (Liu, 1999; Freshney, 1994). Não obstante, a redução do MTT continua a ser um método expedito de determinação da viabilidade celular, tendo em consideração as limitações mencionadas.

## 6.2 Teste do LDH

A viabilidade celular foi igualmente determinada através do teste da libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta enzima faz a conversão de lactato a piruvato, o que leva à produção de NADH (figura nº 16). Uma vez que LDH é uma enzima de origem citoplasmática, a sua presença no meio extracelular fornece indicações sobre danos ao nível da membrana celular (Stryer, 1998).

Posteriormente, o NADH é usado na conversão de um substrato (*tetrazolium salt* (INT)) num produto corado (*formazano*), analisado por espectrofotometria UV/visível (figura nº 17). Assim, quanto maior a perda de integridade membranar, maior a absorvância determinada pelo método colorimétrico. Se não ocorrer dano membranar, a LDH permanece intracelularmente, não ocorrendo reacção (Stryer, 1998).

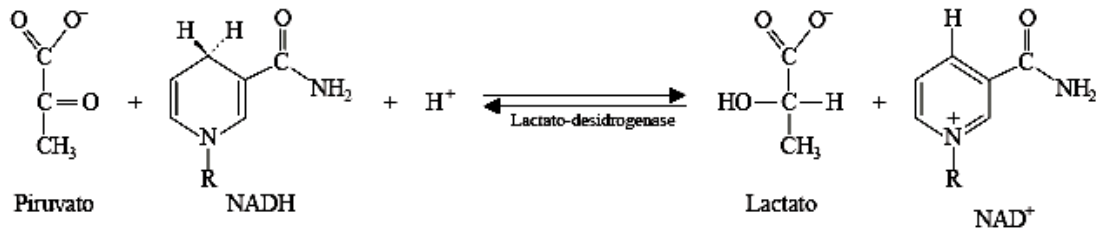


Figura nº 16 - Redução do piruvato a lactato (adaptado de Stryer, 1998).

## Diaphorase



Figura nº 17 - Formação do formazano (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay).

A quantificação da actividade da LDH, que catalisa a reacção reversível:

$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactato} + \text{NAD}^+$ , pode ser medida a 340 nm pela velocidade de consumo de NADH, que é proporcional à sua actividade.

Neste trabalho, usou-se apenas o método *in vitro* MTT de modo a proceder ao estudo da biocompatibilidade dos hidrogéis baseados em DexOx. As culturas celulares utilizadas para isso foram as células do músculo liso de rato (A7r5) e células humanas de músculo liso das artérias do cordão umbilical humano (HUASMC).

## 7) Técnica da imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de proteínas ou antígenos em células ou secções de tecido por ligação de anticorpos específicos. Isto porque é um fenómeno óptico no qual a luz é absorvida por uma substância chamada fluoróforo e quase instantaneamente reemitida com um comprimento de onda ( $\lambda$ ) maior.

Os fluoróforos mais utilizados em técnicas de imunofluorescência são o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e rodamina (Kuby *et al.*, 2002).

Existem dois tipos de imunofluorescência: indirecta e directa. Imunofluorescência directa, na qual o anticorpo primário é marcado com uma sonda fluorescente. Imunofluorescência indirecta na qual o anticorpo primário é reconhecido por um anticorpo secundário marcado com um fluoróforo. A imunofluorescência indirecta é um método de detecção muito sensível porque o anticorpo primário é ele próprio reconhecido por várias moléculas do anticorpo secundário, permitindo uma grande amplificação do sinal (Kuby *et al.*, 2002).

A detecção da fluorescência emitida, pode ser medida através do microscópio de fluorescência, este permite visualizar a distribuição espacial dos fluoróforos num sistema biológico, por exemplo uma célula, assim como observar alterações na intensidade da fluorescência (Kuby *et al.*, 2002).

Neste trabalho após isolamento das HUASMC, foi aplicada a técnica de imunofluorescência indirecta de modo a tentar identificar a existência apenas deste tipo de células.

## **8) Engenharia dos tecidos aplicada aos vasos sanguíneos**

O coração é o principal responsável pela circulação do sangue, mas são os vasos sanguíneos que o transportam por todos os tecidos do corpo e o trazem de volta ao coração. Por outro lado, os vasos sanguíneos interferem na regulação da pressão arterial e ajudam a dirigir o sangue para os tecidos onde a actividade é maior.

Tanto os vasos sanguíneos como o coração são controlados para manter uma pressão arterial suficientemente elevada, que produza um fluxo sanguíneo suficiente para satisfazer as necessidades metabólicas dos tecidos (Mori e Matsuda, 2005).

Doenças cardiovasculares são causadas frequentemente por aterosclerose que pode conduzir a evolução de doenças arteriais como trombose e aneurismas (Boccafoschi *et al.*, 2005). A aterosclerose é uma doença inflamatória que se desenvolve nas paredes dos vasos sanguíneos. As lesões provocadas pela aterosclerose consistem na formação de uma placa lipídica na camada interna das artérias, rodeada por matriz extracelular e células do músculo liso, coberta por uma camada de fibras.

Assim sendo o fluxo sanguíneo diminui e pode mesmo provocar o bloqueio dos vasos (Racliffe, 2000).

Actualmente, o tratamento desta doença consiste na realização de um enxerto da artéria lesada usando uma outra artéria ou veia do paciente. Os vasos autólogos, especialmente artérias, são os enxertos escolhidos, no entanto, nem todos os pacientes têm veias disponíveis para enxerto, quer por doenças dos vasos sanguíneos quer por os vasos sanguíneos já foram removidos em cirurgias anteriores (Heydarkhan-Hagvall, *et al*, 2006).

Nos pacientes que não possuem veias disponíveis para enxerto, quando a substituição de vasos sanguíneos doentes é necessária são requeridas próteses artificiais, feitas de material natural ou sintético (Boccafoschi *et al.*, 2005). Com o objectivo de desenvolver suportes tridimensionais biocompatíveis, reproduzíveis e que possuam a vasculatura nativa (Andersson e Christ, 2007). Vários suportes tridimensionais constituídos por polímeros biodegradáveis foram investigados para produzir vasos funcionais. Polietileno-tereftalato (Dacron) e politetrafluoretileno (ePTFE ou Teflon) são utilizados mas amplamente nas próteses vasculares. Está comprovado que tanto o Dacron como o ePTFE produz uma reacção com o soro e os glóbulos vermelhos, aumentando os níveis de tromboxano e como consequência diminuição de plaquetas (Falke e Atala, 2000). Estes materiais são frequentemente usados no tratamento de doenças vasculares mas têm a sua aplicação limitada quanto às condições de fluxo sanguíneo e resistência, devido à sua pobre elasticidade (Hoenig *et al*, 2005).

Em animais (ovelhas) foram feitos estudos experimentais com PGA onde se semearam células endoteliais e miofibroblastos autólogos formando uma prótese cardíaca. Esta foi utilizada para substituição da válvula pulmonar com bons resultados num período de 8 semanas. Este método ainda está longe de se poder utilizar em seres humanos (Falke e Atala, 2000). A eficácia de um polímero está baseada no balanço entre a sua rápida absorção, promovendo uma infiltração celular e desenvolvendo um tecido. Para conseguir uma boa indução do crescimento tecidual antes da reabsorção do polímero são utilizadas várias combinações de biomateriais biodegradáveis de modo a conseguir estabilidade do enxerto, enquanto se forma o novo tecido (Falke e Atala, 2000).

Existem vantagens e desvantagens tanto para polímeros naturais como sintéticos na engenharia dos tecidos vasculares na tabela 1 vêem-se algumas das propriedades dos biomateriais (Patel *et al.*, 2006).

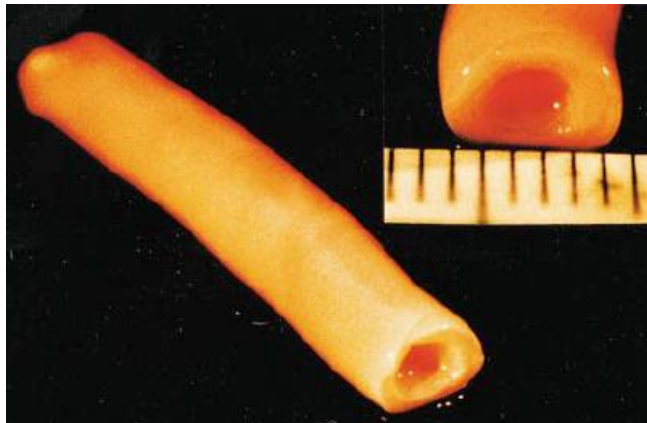
**Tabela 1.** Propriedades dos suportes poliméricos tridimensionais naturais e sintéticos (adaptado de Patel *et al.*, 2006).

	<b>Suporte Polimérico Tridimensional Biológico</b>	<b>Suporte Polimérico Tridimensional Sintético</b>
<b>Vantagens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Não tóxico</li> <li>▪ Favorável para ligação das células</li> <li>▪ Geralmente biocompatível</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Facilmente disponível e barato</li> <li>▪ Fácil de processar</li> <li>▪ Pequena ou nenhuma variação de grupo para grupo</li> </ul>
<b>Desvantagens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pode degradar-se rapidamente</li> <li>▪ Possibilidade de transmissão de doença</li> <li>▪ Inconsistência entre grupos diferentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Monómeros residuais tóxicos ou catalisadores e degradação de produtos podem provocar inflamação</li> <li>▪ Interação celular pobre</li> </ul>

Também foi utilizado um suporte tridimensional polimérico onde se combinava o PGA e o PLLA, onde foram semeadas células musculares lisas da aorta de ratos adultos, observou-se o crescimento de células e secreção de proteínas de matriz extracelular. Contudo foi mais tarde demonstrado que o suporte de PGA possui uma alta degradabilidade o que provoca uma disfunção a nível celular devido à variação do pH (Patel *et al.*, 2006).

Em 1986, Weinberg e Bell, produziram o primeiro vaso sanguíneo constituído por Dacron, com células endoteliais, de músculo liso e fibroblastos de bovino, colocados num suporte polimérico tridimensional com colagénio (Weinberg e Bell, 1986). No entanto, este modelo não dispunha dos requisitos mecânicos, nomeadamente da força de tensão. Mais tarde L'heureux e seus colaboradores, melhoraram estes vasos sanguíneos na força mecânica destes enxertos criados cultivando células de mesenquima (células de músculo lisas e fibroblastos) na presença de vitamina C, de modo a criar uma matriz de extracelular tridimensional com características semelhante as que se observam em vivo destes vasos, a figura nº 18 evidencia estes vasos (citado em Edelman, 2008). Foram os primeiros a desenvolver um tecido próximo aos vasos

sanguíneos naturais através de cultura de células humanas. Estes vasos sanguíneos artificiais foram projectados de maneira a que os enxertos vasculares tivessem os três tipos de células que se encontram nos vasos sanguíneos naturais: células endoteliais, células de músculo vasculares lisas e fibroblastos (Andersson e Christ, 2007).



**Figura 18** - Vasos sanguíneos obtidos por engenharia dos tecidos exclusivamente de materiais biológicos e células vasculares autólogas (adaptado por L'Heureux *et al.*, 1998).

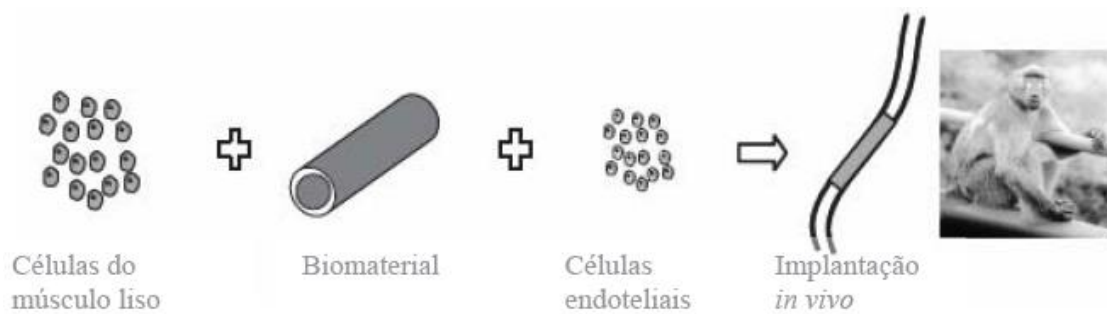
Além disso ainda nenhum biomaterial apropriado foi desenvolvido para substituição arterial de diâmetro pequeno (Boccafroschi *et al.*, 2005).

Muitos critérios foram propostos para o desenvolvimento de um enxerto de pequeno tamanho funcional para substituição arterial

Vários factores podem afectar a biocompatibilidade dos enxertos vasculares. Um desses factores envolve a resposta inflamatória provocada pelo material implantado. Os materiais poliméricos usados em enxertos vasculares agravam a resposta inflamatória, onde o grau de inflamação depende do tipo de tecido que rodeia o implante, e das propriedades inerentes ao material que constitui o enxerto (Seal *et al.*, 2001).

Investigadores estudaram o uso de células musculares e endoteliais de tecido arterial combinadas com vários tipos de suportes tridimensionais de biomateriais naturais e sintéticos para fazer construções tubulares e sujeitou-os à estimulação mecânica e/ou química numa tentativa para desenvolver um enxerto de substituição arterial de pequeno diâmetro com vários graus de sucesso (Isenberg *et al.*, 2006).

Para criar um vaso sanguíneo substituto, pela engenharia de tecidos, é necessária a incorporação de células do músculo liso e células endoteliais numa estrutura tridimensional de modo a estabelecer a arquitectura de um vaso sanguíneo nativo (figura nº 19). Uma vez implantado no animal existe ainda uma variedade de desafios (Nerem e Ensley, 2004).



**Figura nº 19** - Criação de um enxerto vascular de pequeno diâmetro. Este esquema demonstra como a combinação de várias estratégias podem ser necessárias para atingir o sucesso (adaptada de Nerem e Ensley, 2004).

Células do músculo liso foram postas em crescimento em contacto com PGA com o intuito de estudar e comparar a matriz extracelular de vasos sanguíneos produzidos artificialmente com a matriz extracelular com vasos sanguíneos nativos. Após seis semanas de cultura num bio-reactor, foram adicionadas células endoteliais e ao fim de mais três dias o vaso sanguíneo obtido por engenharia dos tecidos foi analisado (Heydarkhan-Hagvall *et al*, 2006).

Um dos objectivos deste trabalho era produzir em laboratório substitutos de vasos sanguíneos. Comprovar se os hidrogéis tendo como base o dextrano oxidado, eram compatíveis. De modo a obtermos um biomaterial compatível que no seu interior permitisse a adesão de células endoteliais e no seu exterior células de músculo liso. Desta forma ir-se-ia reproduzir a estrutura de um vaso sanguíneo.

### **III. Materiais e métodos**

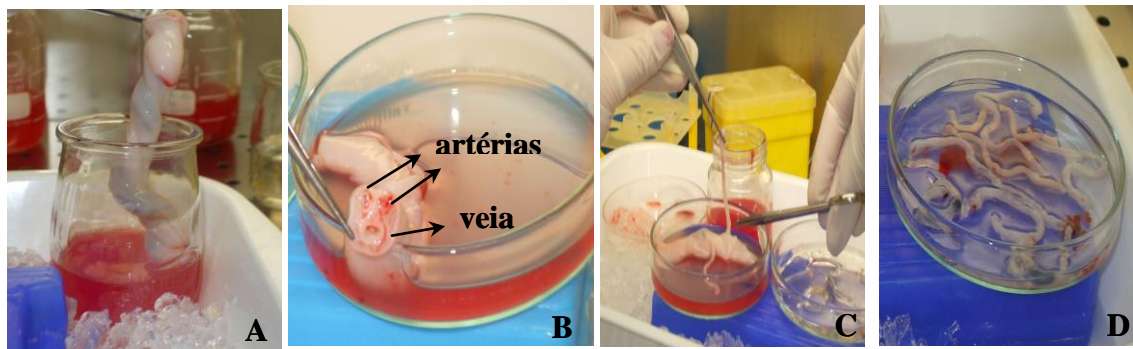
#### **1) Preparação dos frascos para transporte dos cordões umbilicais**

Os frascos para recolha dos cordões umbilicais foram preparados com PSS (solução salina fosfato) diluído (ver anexo I tabela nº 1), antiproteases (ver anexo I tabela nº 5) e antibiótico/antimicótico (ver anexo I tabela nº 6). Os cordões umbilicais foram recolhidos no Hospital Sousa Martins da Guarda e no Hospital Amato Lusitano de Castelo Branco, com o devido consentimento das grávidas e do Comité de ética dos hospitais. Os frascos contendo os cordões umbilicais foram posteriormente armazenados no frigorífico a 4° C até se realizar o isolamento das artérias do cordão umbilical (ver anexo I tabela nº 14).

O sangue do cordão umbilical e o cordão umbilical em si são amostras biológicas que se podem obter logo após o parto. Estes materiais biológicos podem ser recolhidos sem qualquer risco para a saúde da mãe e do bebé (Llano *et al*, 2007).

#### **2) Isolamento das artérias umbilicais**

As artérias umbilicais foram isoladas a partir dos cordões umbilicais imersos numa solução de PSS diluído e antibiótico/antimicótico, a 4° C (figura nº 20 A). A geleia de Wharton foi removida com a ajuda de uma pinça e uma tesoura (figura nº 20 C). Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar (aura 2000).



**Figura nº 20** - Método de isolamento das artérias umbilicais. A) Cordão umbilical em solução de PSS diluído com antibiótico/antimicótico. B) Identificação das artérias umbilicais e da veia umbilical. C) Remoção da geleia de Wharton. D) Artérias umbilicais.

### 3) Preparação de placas de cultura com colagénio

Para facilitar a adesão celular os poços das placas de cultura (com 12 poços) foram revestidos com colagénio (Sigma), colocaram-se 20  $\mu$ L de solução de colagénio em cada poço da placa de cultura e espalhou-se cuidadosamente por toda a sua superfície com a ajuda de um “*cell scraper*”. A placa foi posteriormente incubada a 37° C durante cerca de 3 horas. A placa revestida com colagénio seca foi posteriormente armazenada no frigorífico para evitar a degradação do colagénio.

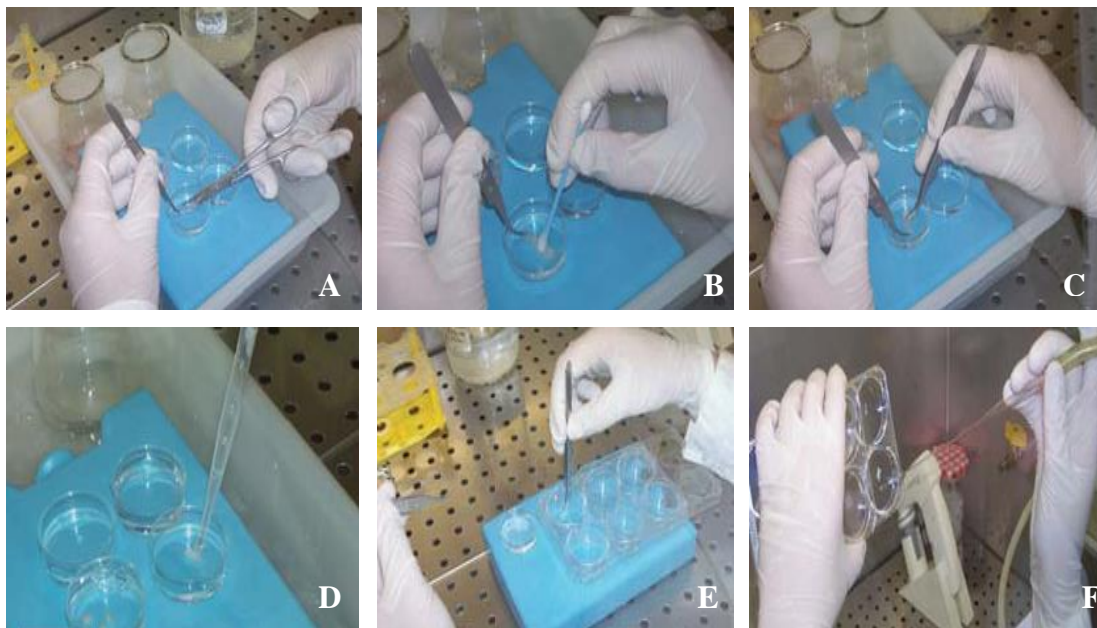
### 4) Isolamento de células humanas do músculo liso

#### 4.1) Método I (adaptado de De Llano *et al.*, 2007)

Após isolamento das artérias, estas foram colocadas numa placa de petri pequena com 3 mL de PSS diluído e 30  $\mu$ L de antibiótico/antimicótico onde foram cortadas longitudinalmente (figura nº 21 A) e procedeu-se à remoção do endotélio e do sangue da parte interna das artérias com a ajuda de um cotonete (figura nº 21 B). As artérias foram colocadas numa nova placa de petri, nas mesmas condições que a anterior e procedeu-se à colheita de camadas musculares (figura nº 21 C). Posteriormente, as camadas

musculares foram lavadas três vezes, em placas de petri com 3 mL de PBS (solução tampão fosfato) (ver anexo I tabela nº 3) e 30 µL de antibiótico/antimicótico (figura nº 21 D). As camadas de músculo liso obtidas foram colocadas em placas de cultura revestidas com colagénio (Sigma) (figura nº 21 E) após ter sido removido o máximo de líquido possível (figura nº 21 F). A placa foi colocada a 37° C cerca de 5 minutos no interior de uma incubadora. Após esta incubação adicionou-se 500 µL de meio de cultura DMEM – F12 com 5 % de FBS (suplementado com insulina e GSP) e 10 µL de antibiótico/antimicótico a cada poço contendo as camadas de músculo liso.

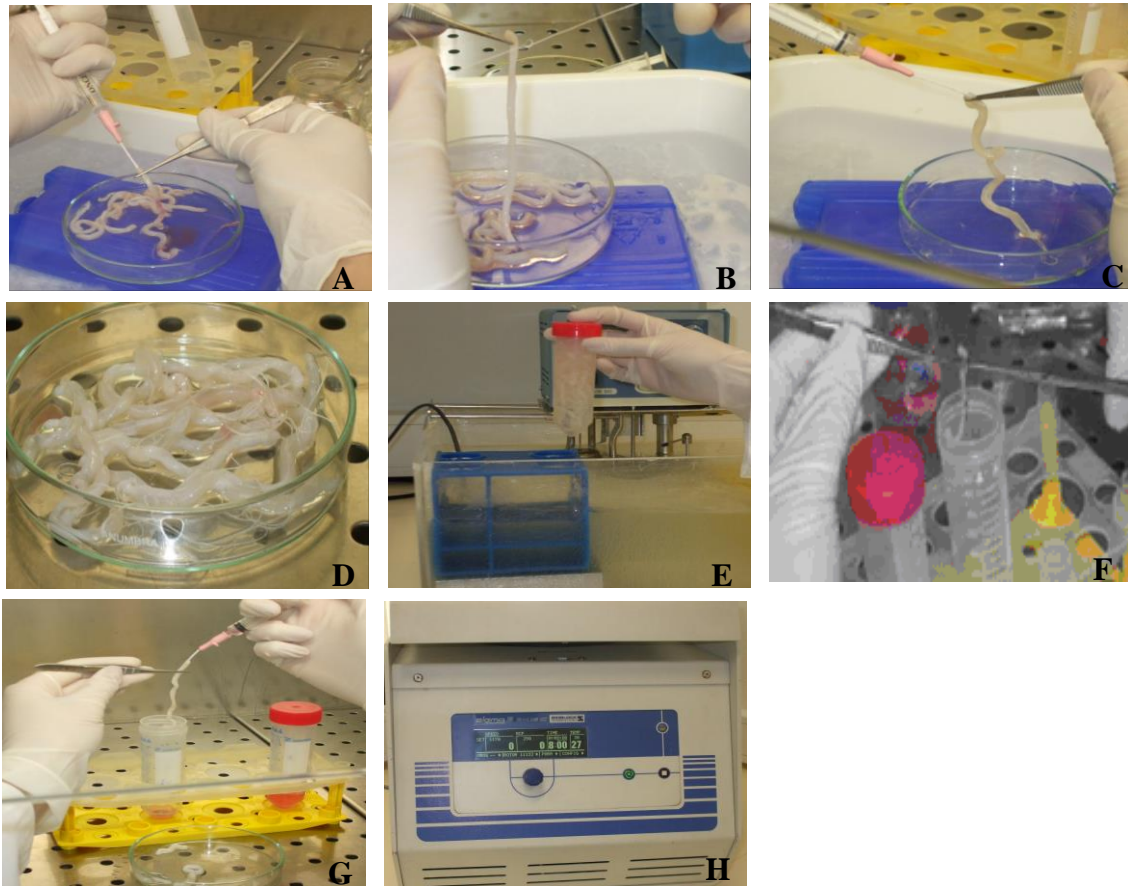
Após 24 horas foram adicionados mais 500 µL de meio de cultura DMEM – F12 com 5 % de FBS (suplementado com insulina e GSP) e 5 µL de antibiótico/antimicótico. O meio foi mudado após 48 horas e posteriormente de 3 em 3 dias. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar (aura 2000).



**Figura nº 21** - Método I, usado para o isolamento de células de músculo liso (adaptado de **De Llano et al., 2007**). **A)** Corte longitudinal da artéria. **B)** Remoção do sangue e do endotélio. **C)** Isolamento das camadas musculares. **D)** Lavagem das camadas. **E)** Colocação das camadas na placa de cultura. **F)** Remoção do líquido.

#### **4.2) Método II (adaptado de Van Rigen *et al.*, 1997)**

As artérias umbilicais isoladas foram intubadas com uma cânula e de seguida fez-se a perfusão com solução de PSS diluído para lavar o sangue e coágulos (figura nº 22 A). Após esta primeira lavagem, fez-se passar meio RPMI 1640 com 10 % de FBS (ver anexo I tabela nº 12) nas artérias para as lavar e promover a sua dilatação. Posteriormente, as artérias foram fechadas numa das extremidade com uma linha (figura nº 22 B) e foram introduzidos aproximadamente 0,2 a 0,5 mL, dependendo do tamanho da artéria, de uma solução de 0,1 % colagenase tipo I (Sigma) em HBSS (Solução salina Hank's Balanced) (ver anexo I tabela nº 4) (figura nº 22 C). Após a adição da enzima fechou-se a outra extremidade da artéria (figura nº 22 D). De seguida as artérias foram colocadas num tubo de falcon contendo PBS (30mL aproximadamente) e foram incubadas num banho de 37°C durante 25 minutos com agitação (figura nº 22 E). Após ter decorrido este tempo os nós das artérias são cortados (figura nº 22 F) e fez-se passar pelas artérias aproximadamente 0,2 a 0,5 mL (dependendo do tamanho da artéria) de meio DMEMF-12 com 5% de FBS (figura nº 22 G), para inibir a actividade enzimática e recolher as células que se dissociaram das artérias para um tubo de falcon. Após este passo realizou-se uma centrifugação a 1200 rpm, durante 8 minutos (figura nº 22 H). Após centrifugação as células ficaram no pellet e o sobrenadante foi aspirado. O pellet, foi ressuspenso, e colocado numa placa de cultura revestida com colagénio, com meio DMEM – F12 com 5 % de FBS (suplementado com insulina e GSP (componentes de suplemento do crescimento)) (ver anexo I tabela nº9 e nº10) e antibiótico/antimicótico. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar (aura 2000).



**Figura nº 22** - Método II, usado para o isolamento de células de músculo liso (adaptado de **Van Rigen et al., 1997**). A) Lavagem das artérias com PSS. B) Primeiro nó numa extremidade da artéria. C) Introdução da colagenase. D) Artérias com nós em ambas as extremidades. E) As artérias são colocadas num tubo de falcon com PBS e são incubadas no banho a 37°C durante 25 minutos. F) Corte dos nós. G) Passagem de meio de cultura RPMI 1640 com 5% de FBS com soro pela artéria. H) Centrifugação das células com o meio a 1200 rpm durante 8 minutos.

## 5) Cultura de células

As células, isoladas pelos dois métodos descritos anteriormente, foram colocadas em crescimento em placas de cultura e posteriormente em frascos de cultura. As placas e os frascos de cultura foram colocados em incubadoras (Nuair DH Autoflow CO<sub>2</sub> air-jacketed incubator) a 37° C, numa atmosfera húmida com 95 % ar e 5 % CO<sub>2</sub>. Os respectivos meios de cultura foram mudados de 3 em 3 dias. Ao meio de cultura foi adicionado antibiótico/antimicótico na proporção de 10 µL de antibiótico/antimicótico (ver anexo I tabela nº 6) para 1 mL de meio. A mudança de meio de cultura foi feita por

aspiração do meio e adição de novo meio e antibiótico/antimicótico. O crescimento das células nos biomateriais foi acompanhado por observação ao microscópio (Olympus CX41) e por captura de fotografias com uma máquina digital (Olympus SP-500 UZ).

## **6) Tripsinização de células**

A tripsinização foi realizada apenas quando as células ocupavam 90 ou 95 % da superfície do frasco/placa de cultura. O meio de cultura foi aspirado e de seguida lavou-se, com o mesmo volume de meio de cultura correspondente, de PBS/EDTA 0,025 %. Aspirou-se o PBS/EDTA e adicionou-se cerca de metade do volume de meio de cultura correspondente, de tripsina para o frasco/placa de cultura. Posteriormente, o frasco/placa de cultura foi incubado a 37 ° C durante 5 minutos. Após terminar o tempo de incubação observaram-se os frascos/placas de cultura ao microscópio e determinou-se se as células se soltaram. Nos casos em que as células não estavam soltas davam-se toques suaves no frasco/placa de cultura. Este procedimento foi efectuado no menor tempo possível, pois um tempo excessivo de exposição à tripsina pode causar morte celular. De seguida adicionou-se meio de cultura para parar a reacção. Depois procedeu-se à transferência de todo o conteúdo dos frascos de cultura para um tubo de falcon. Realizou-se uma centrifugação a 150 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente e aspirou-se o sobrenadante. O pellet foi homogeneizado com uma pipeta de pasteur. As células obtidas foram subcultivadas e procedeu-se à sua adição em frascos de cultura que continham meio de cultura e antibiótico/antimicótico (ver anexo I tabela nº 6).

## **7) Determinação da contagem das células e da taxa de viabilidade celular**

O número de células de uma cultura pode ser contado. É necessário obter primeiro uma suspensão celular devidamente homogeneizada, da qual se retira uma alíquota. Esta é diluída numa solução de azul de tripano em PBS. O azul de tripano é um corante de exclusão que apenas entra em células permeabilizadas (inviáveis). Após a entrada na célula atravessa o invólucro nuclear e acaba por se localizar nos núcleos, que ficam

corados de azul. A amostra corada foi colocada numa câmara de Neubauer, após se ter montado devidamente a lamela. Depois com a ajuda do microscópio é possível contar as células viáveis presentes nos campos da câmara de contagem e determina-se a percentagem de células viáveis.

## **8) Preparação de placas de 96 poços com biomateriais**

As placas de 96 poços com os biomateriais foram cedidas por João Maia do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. Foram preparadas segundo o seguinte método: o dextrano (Mw 60'000 Da, Fluka's) (1 g; 0.125%, w/v) foi oxidado com 2 mL de uma solução de periodato de sódio com diferentes concentrações, para obter oxidações de 5% a 40%, à temperatura ambiente. Parou-se a reacção após 20 horas. DexOx com diferentes concentrações (dependendo do grau oxidação) foi dissolvido em PBS até se obter uma solução líquida. De seguida, de modo a preparar diferentes formulações de DexOx, adicionou-se uma determinada solução de AAD e/ou gelatina em que as concentrações usadas são calculadas baseadas numa determinada percentagem molar de resíduos de dextrano.

A preparação dos hidrogéis teve em conta três factores: a concentração e o grau de oxidação do DexOx, e a concentração de AAD e /ou gelatina. As formulações que apresentavam melhores resultados (grau de oxidação, ligação com AAD e/ou gelatina, tempo de dissociação, solubilidade, viscosidade e tamanho aparente dos poros) escolhidos pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. Foram colocados 60 µL de cada biomaterial em cada um dos 96 poços das placas de cultura de células.

Resumidamente, o DexOx 5, 10, 25 e 40%, o AAD 5, 10 e 20% e/ou gelatina 2% (gel 2%) foram dissolvidos em PBS ou em meio de cultura apropriado DMEM-F12 5% para as células A7r5 e células humanas de musculo liso (HSMC). As quatro placas foram colocadas a UV durante 30 minutos, antes de serem cultivadas as células (ver anexo II, figura nº1 e nº 2).

## **9) Estudo da biocompatibilidade do dextrano oxidado – Teste do MTT**

As células A<sub>7</sub>R<sub>5</sub> foram semeadas com uma densidade de 65000 células por poço numa placa de 96 poços que já continha as várias formulações de dextrano oxidado. Esta placa foi incubada durante 24 horas, a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período de incubação foi avaliada a actividade mitocondrial pela redução do reagente de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) como foi descrito anteriormente. Aspirou-se o meio e adicionou-se de seguida 50 µL de MTT (5mg de MTT em 1 ml de Krebs diluído) em cada poço, a placa foi então incubada na incubadora numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante 4 horas. O meio foi posteriormente aspirado e foi adicionado a cada poço 50µL de isopropanol/HCl (0,04N) e a placa foi protegida da luz com papel de alumínio durante 90 minutos à temperatura ambiente.

Finalizado esse período de tempo, com a ajuda de uma micropipeta homogeneizou-se a solução de cada poço e transferiu-se 100µl de cada poço, para uma nova placa de 96 poços.

Num leitor de microplacas efectuou-se a leitura de absorvâncias a 570nm usando Biorad Microplate. Os poços que contêm células, mas que não possuem biomaterial foram usados como controlo negativo. Para controlo positivo foram usados poços contendo células, aos quais foi adicionado etanol 96%. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

## **10) Ensaios de Imunofluorescência**

Em cada poço das placas de cultura (com 12 poços) são colocadas cuidadosamente lamelas com ajuda de uma pinça. Posteriormente foram colocadas em UV durante 30 minutos. As lamelas foram revestidas com 20 µL de solução de colagénio (sigma). A placa foi posteriormente incubada a 37° C até a solução de colagénio estar seca (cerca de 3 horas). A placa foi guardada no frigorífico para evitar a degradação do colagénio. As células de músculo liso isoladas anteriormente foram tripsinizadas e colocadas em crescimento nas placas de cultura com as lamelas cobertas de colagénio. O crescimento foi feito em incubadoras (Nuair DH Autoflow CO<sub>2</sub> air-jacketed incubator) a 37° C com 95 % ar/5 % CO<sub>2</sub>. Os respectivos meios de cultura foram mudados de 3 em 3 dias. Ao

meio de cultura foi adicionado antibiótico/antimicótico na proporção de 10 µL de antibiótico/antimicótico para 1 mL de meio. O crescimento das células nos biomateriais foi acompanhado por observação ao microscópio (Olympus CX41), até se observar confluência.

Após a confluência das células procedeu-se à fixação destas. Primeiro aspirou-se o meio dos poços da placa de cultura (com 12 poços) que contêm as lamelas, e de seguida lavaram-se duas vezes com PBS (ver anexo). Após a lavagem com PBS, este foi aspirado e foi adicionado 500 µL de paraformaldeído (PFA) 4% (diluído em PBS). A placa é incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois deste tempo de espera o paraformaldeído com PFA 4% é aspirado e fizeram-se três lavagens com PBS. Na última lavagem com PBS, este não é aspirado e placa é guardada a 4° C após ter sido isolado com parafilme.

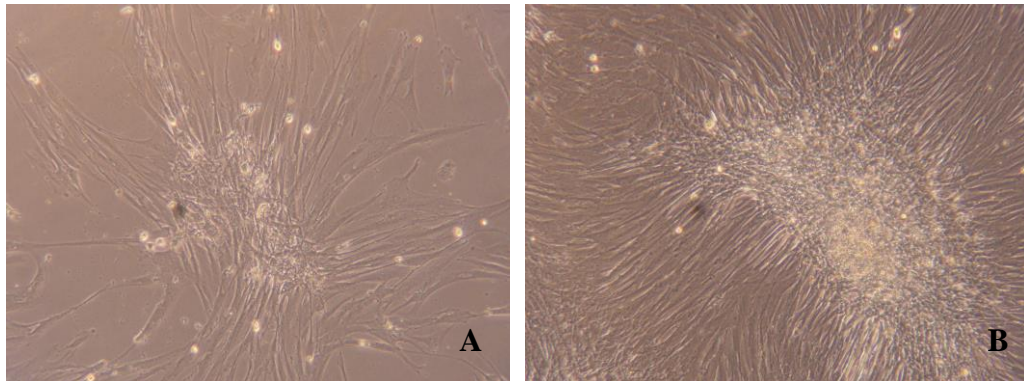
Após a fixação das células nas lamelas que se encontram na placa de 12 poços procedeu-se a permeabilização das células com Triton X-100 (1%) em PBS durante 5 minutos. As células são lavadas três vezes com PBS, no fim das lavagens é adicionado 500µL de 3%BSA com 0,2% de Tween 20 em PBS em cada poço da placa, incubando-se esta durante 1hora à temperatura ambiente. Procedeu-se à diluição dos anticorpos primários na solução padrão 0,2% de Tween 20 em PBS e depois de aspirar 3%BSA com 0,2% de Tween 20 dos poços foram adicionados a cada poço 150 ou 200 µL de anticorpo primário (*rabbit anti- human von Willibrand factor polyclonal* (E1), *anti-VE-Cadherin* (E2), *monoclonal anti-human fibroblast* (F), *anti calcium channel ( $\alpha_{1c}$  subunit)* (A), e *monoclonal anti-actin,  $\alpha$  smooth muscle* (S)) (ver anexo I tabela nº 16). A placa foi incubada durante 1h30m à temperatura ambiente. Após a incubação lavaram-se as lamelas três vezes com PBS, entre cada lavagem espera-se 5 minutos no fim destas lavagens as lamelas são colocadas com ajuda de uma pinça numa tampa de uma placa de cultura de 24 poços na respectiva ordem e de forma que as fiquem células voltadas para cima. Os anticorpos secundários foram diluídos 1:1000 na mesma solução padrão que foram diluídos os anticorpos primários. Após diluição 50 µL do anticorpo secundário (*A<sub>488</sub> goat anti-rabbit* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC - fluorescein isothiocyanate) para a imunodeteção do E1, E2 e A utiliza-se *A<sub>546</sub> goat anti-mouse* conjugado com rodamina para a imunodeteção do F e S) foram adicionados a cada lamela de células e a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 1h no escuro. Após este período lavaram-se as lamelas com 100 µL de PBS e aguardou-se 5 minutos entre cada lavagem, esta lavagem e os passos subsequentes foram realizados na

ausência de luz. Nas lâminas, deitou-se uma pequena gota de meio de montagem e colocou-se a lamela garantindo que as células entram em contacto directo com este meio de montagem. O excesso de PBS da lâmina foi retirado com ajuda de um pedaço de papel que foi colocado suavemente em cima das lamelas. As lâminas com as lamelas são deixadas a secar durante uma hora no escuro. Depois é adicionado verniz em volta de cada lamela, e colocadas a secar no escuro durante 1 hora. Finalmente as lamelas são visualizadas no microscópio de imunofluorescência ou guardadas a -20 °C para posterior observação.

## IV. Resultados e Discussão

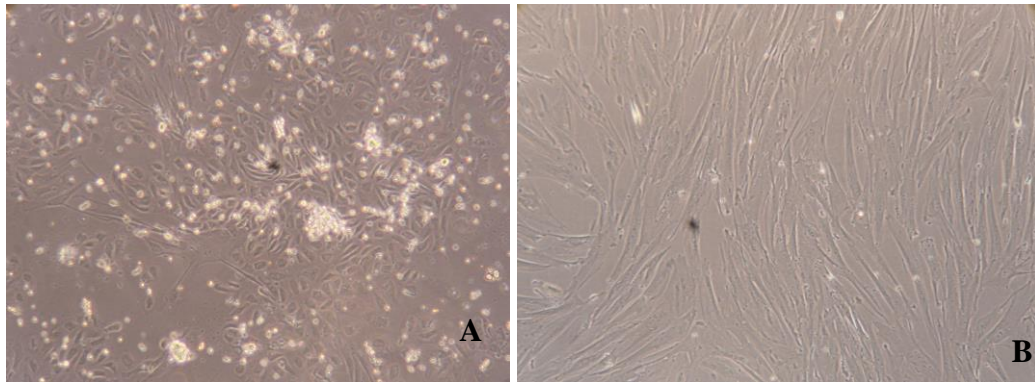
### 1) Isolamento do músculo liso a partir de cordões umbilicais

Para o isolamento de células de músculo liso humanas, a partir de cordões umbilicais, foram testados vários métodos (descritos na secção Materiais e métodos). Para o isolamento de células do músculo liso, utilizando o método I, houve inicialmente algumas dificuldades em se obterem as células, uma vez que estas não se soltavam das camadas de músculo liso. Contudo, após várias tentativas, foram obtidas células do músculo liso através deste método. Após cerca de duas semanas observou-se a saída das células das camadas e a sua aderência às placas de cultura (figura nº 23).



**Figura nº 23** – Células do músculo liso, obtidas pelo método I em DMEM- F12 5%. A) Após cerca de três semanas do isolamento, pode observar-se a libertação de células a partir de uma pequena camada muscular, pois estas libertam mais facilmente as células. B) Após cerca de cinco semanas as células encontram-se em confluência.

Também foram obtidas células de músculo liso pelo método II, contudo as placas apresentavam para além deste tipo de células, células endoteliais. As células cresceram em conjunto em meio de cultura DMEM-F12 com 5 % de FBS, mas após algum tempo (3 a 4 dias) as células endoteliais soltaram-se ficando apenas as do músculo liso. A confluência das células do músculo liso foi obtida após 3 a 4 semanas de crescimento (figura nº 24).

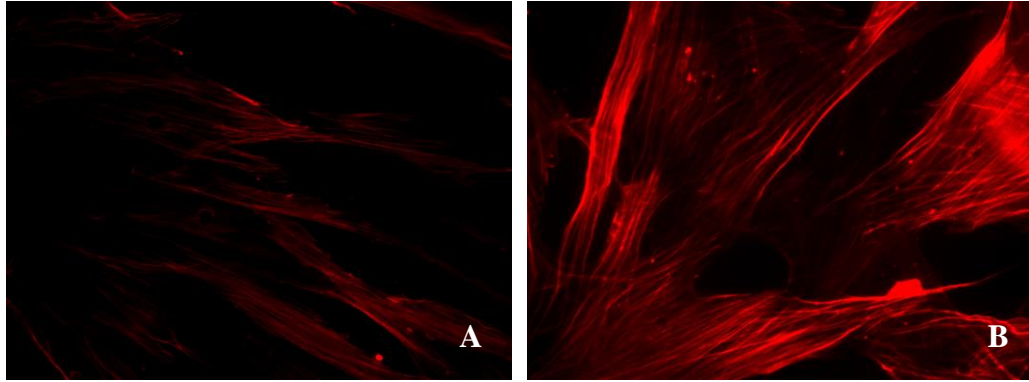


**Figura nº 24** – Fotografias de células de músculo liso isoladas pelo método II. A) Células de músculo liso e células endoteliais (em maior quantidade) em conjunto a crescerem após 4 dias do isolamento B) Células de músculo liso em confluência, após duas semanas do isolamento.

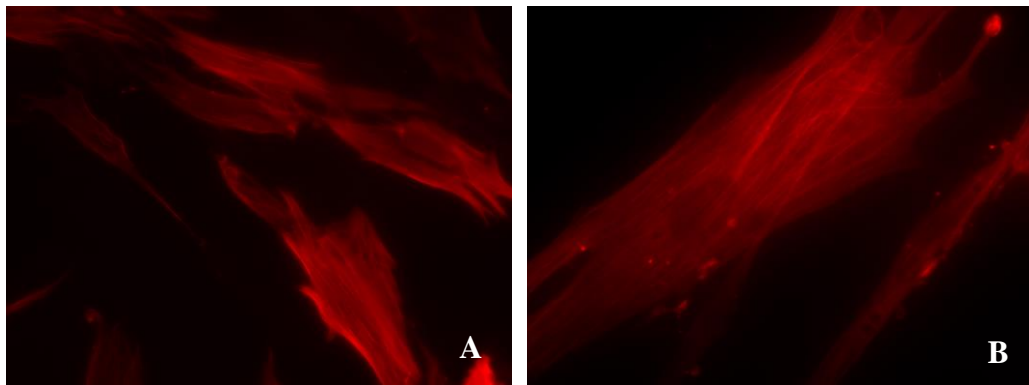
## 2) Resultados dos ensaios de Imunofluorescência

Além da morfologia característica do tipo de SMC estudadas e descritas anteriormente por microscopia óptica. Também foi determinada, através da imunofluorescência, a expressão de uma proteína existente no músculo liso a actina, que é um marcador específico para SMC (a actina e a miosina são duas das principais proteínas do citoesqueleto (Murphy *et al.*, 1999)). Verificou-se que a cultura de células expressa o anticorpo monoclonal *anti-actin, a smooth muscle* que é específico para marcar a isoforma  $\alpha$ -actina, uma vez que as células emitem sinal positivo (fluorescência) após se ter adicionado o anticorpo secundário *goat anti-mouse* conjugado com rodamina o que nos indica a presença de células de músculo liso, tanto pelo método I (figura 25) como também pelo método II (figura 26).

De modo a provar que a cultura de HSMC não estava contaminada por nenhum outro tipo de células, determinou-se a presença de células endoteliais (EC) e fibroblastos pela expressão dos anticorpos primários correspondentes. Nenhuma contaminação nas culturas de HSMC por EC ou fibroblastos foi observada de acordo com o que foi observado anteriormente por microscopia óptica e devido à ausência de imunodeteção dos anticorpos policlonais *rabbit anti-human von Willibrand (vW)* e *anti-VE-Cadherin (CD144)* (característicos das EC) e do anticorpo monoclonal *anti-human fibroblast* (característico dos fibroblastos) (De Llano *et al.*, 2007).



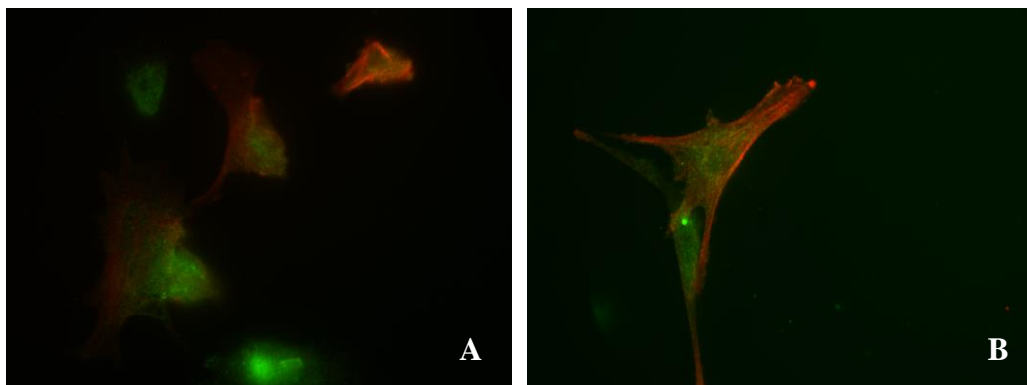
**Figura nº 25** - Imagem de SMC (células provenientes do método I) através do método da imunofluorescência indirecta. Marcação das células com o anticorpo primário monoclonal *anti-actin,  $\alpha$  smooth muscle* conjugado com o anticorpo secundário *A<sub>546</sub> goat anti-mouse* conjugado com rodamina. **A)** Foto tirada com ampliação de 400 vezes superior ao tamanho real. **B)** Foto tirada com ampliação de 630 vezes superior ao tamanho real.



**Figura nº 26** - Imagem de SMC (células provenientes do método II) através do método da imunofluorescência indirecta. Marcação das células com o anticorpo primário monoclonal *anti-actin,  $\alpha$  smooth muscle* conjugado com o anticorpo secundário *A<sub>546</sub> goat anti-mouse* conjugado com rodamina. **A)** Foto tirada com ampliação de 400 vezes superior ao tamanho real. **B)** Foto tirada com ampliação de 630 vezes superior ao tamanho real.

Outro marcador específico para SMC é o *anti- calcium channel ( $\alpha_{1C}$  subunit)* este reconhece uma subunidade dos canais de cálcio dependente de voltagem tipo L (a membrana plasmática das SMC possui diferentes canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sendo os CCDV tipo L a via predominante para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  . Quando estes canais são activados permitem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e induzindo vasoconstrição das células (Jackson, 2000; Raingo *et al.*,

2004)). Na figura nº 27 para além de marcar as células com o anticorpo primário *monoclonal anti-actin,  $\alpha$  smooth muscle*, também adicionamos o anticorpo *anti- calcium channel ( $\alpha_{1C}$  subunit)*, posteriormente foram adicionados os anticorpos secundários *goat anti-mouse* conjugado com rodamina e *goat anti-mouse* conjugado com FITC respectivamente para imunodeteção. Podemos observar imunolocalização através do método da imunofluorescência, pois as células emitem sinal positivo para ambos anticorpos primários. Na cultura das SMC expressam isoforma  $\alpha$ -actina (a vermelho) e expressam a subunidade  $\alpha_{1C}$  dos canais de cálcio tipo L dependentes de voltagem (a verde).



**Figura nº 27** - Imagem de imunolocalização através do método da imunofluorescência indirecta da cultura de SMC. A vermelho está representado os filamentos de  $\alpha$ - actina do citoesqueleto e a verde esta representada a subunidade  $\alpha_{1c}$  dos canais de cálcio tipo L. *anti calcium channel ( $\alpha_{1c}$  subunit)* **A)** Foto (células provenientes do método II – “chouriças”) tiradas com uma ampliação de 630 vezes superior ao tamanho real. **B)** Foto (células provenientes do método I – “camadas”) tiradas com uma ampliação de 630 vezes superior ao tamanho real.

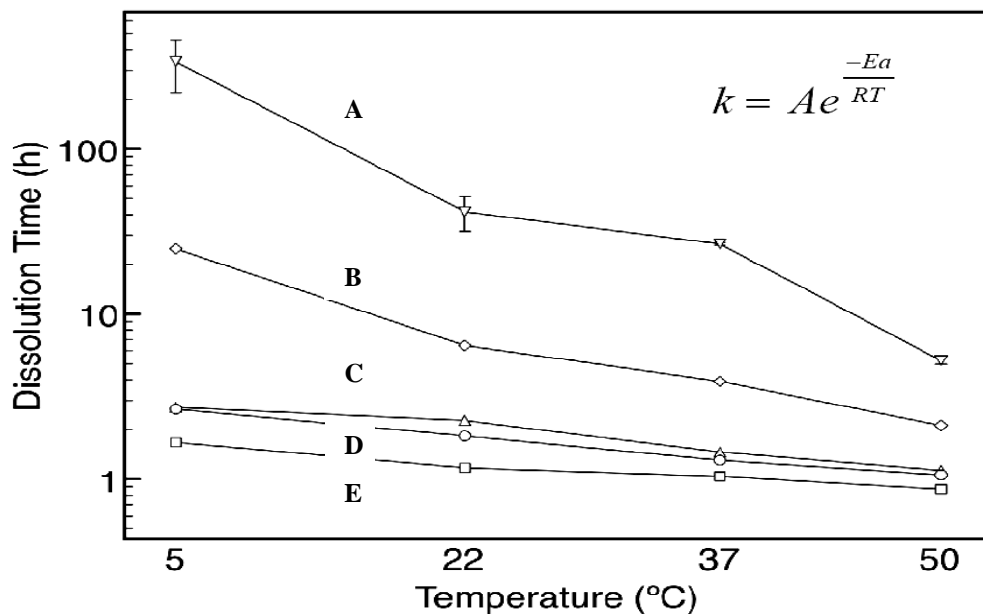
### **3) Estudos realizados aos biomateriais utilizados na síntese de hidrogéis**

Vários estudos foram realizados pelo Departamento de Engenharia da Universidade de Coimbra para se obterem as formulações de dextrano que melhores resultados teriam na síntese de hidrogéis.

Entre eles o tempo de dissolução do dextrano e das diferentes amostras de dextrano oxidado (dextrano oxidado 5 % (DexOx 5%), dextrano oxidado 10 % (DexOx

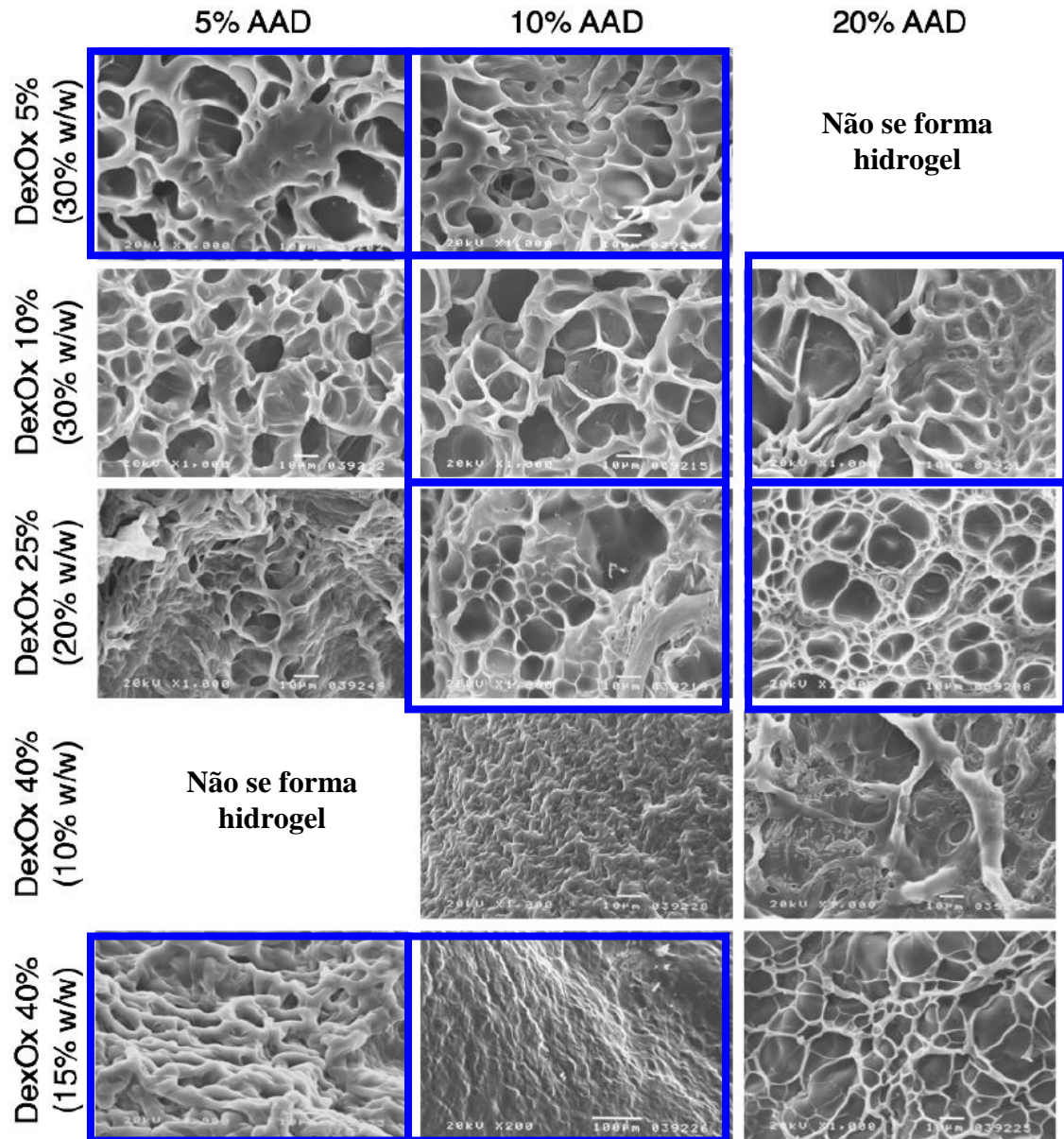
10%), dextrano oxidado 25 % (DexOx 25%) e dextrano oxidado 40% (DexOx 40%)) em diferentes temperaturas (ver figura nº 28). As amostras de DexOx 5% e 10% têm uma dissolução não muito diferente do dextrano.

Verificando-se que o aumento do grau de oxidação, aumenta o tempo de dissolução dos hidrogéis. Já se tinha referido em estudos anteriores realizados pelo mesmo departamento que o tamanho do poro aumenta durante a degradação do hidrogel e que a dissolução das formulações de dextranos podia ser controlada pela quantidade de AAD adicionada (Maia *et al.*, 2005). O presente estudo demonstrou que para além da quantidade de AAD, o grau de oxidação também é relevante no controlo da dissolução das várias formulações de dextrano. O aumento do grau de oxidação permite que se possa adicionar mais AAD como agente reticulante, obtendo um hidrogel mais duradouro.



**Figura nº 28** – Tempo de dissolução do dextrano e das diferentes amostras de dextrano oxidado em diferentes temperaturas. A- DexOx 40% , B- DexOx 25%, C- DexOx 10%, D- DexOx 5% e E- Dextrano.

No presente estudo foi também estudada a morfologia interior do hidrogel e a estrutura porosa deste por microscopia electrónica de varrimento. Este estudo demonstrou que o tamanho do poro em hidrogéis com DexOx 40% é muito compacto e também que a formulação DexOx 5%/ 20% AAD não forma hidrogel. É também possível se observar uma tendência decrescente no tamanho do poro com o aumento da concentração de AAD, ver a figura nº 29.



**Figura nº 29** – Imagens de SEM na superfície dos hidrogéis preparados com dextrano oxidado dissolvidos com PBS (as formulações estudadas no presente trabalho estão marcadas a azul).

Nestes hidrogéis constituídos por dextrano oxidado, os grupos aldeídos presentes no dextrano oxidado reagem com o grupo hidrazida do AAD, aumentando os grupos hidroxilo que vão facilitar a adesão celular ao dextrano (Maia *et al.*, 2005). O grau de oxidação permite dar uma percentagem de resíduos que servem como pontos reactivos para moléculas como o AAD.

Num recente estudo realizado com hidrogéis constituídos por N-carboxietil-quitosano e DexOx, verificou-se um aumento dos poros durante a reticulação do DexOx,

com N-Carboxietil-quitosano o que contribui para um maior crescimento das células no interior deste biomaterial. Os hidrogéis formados eram não citotóxicos, porosos, estáveis e com maior durabilidade (Weng *et al.*, 2008).

A tabela 2 mostra-nos como o período de gelificação dos hidrogéis utilizados é afectado tanto pelo grau de oxidação de dextrano como pela concentração de AAD. Podemos observar que para dextranos com graus de oxidação elevados (25% e 40%) os períodos de gelificação diminuem com o aumento de AAD. Ao contrário dos dextranos com baixo grau de oxidação (5% e 10%) que os períodos de gelificação aumentam directamente com a concentração de AAD. A relação de inchamento também pode ser controlada pela quantidade de AAD, bem como pelo grau de oxidação do dextrano.

**Table 2** – Período de gelificação estimado para cada formulação de dextrano com as diferentes concentrações de AAD, e a correspondente relação de inchamento após um dia de imersão em PBS em condições fisiológicas.

dexOx	Gelation period (min) <sup>a</sup>			Swelling Ratio <sup>b</sup>		
	5% AAD	10% AAD	20% AAD	5% AAD	10% AAD	20% AAD
D5	66.7 ± 1.4	77.8 ± 5.2	- <sup>c</sup>	14.3 ± 0.17	19.5 ± 0.24	- <sup>c</sup>
D10	14.9 ± 1.7	16.8 ± 0.5	18.8 ± 1.3	11.8 ± 0.03	13.6 ± 0.02	17.4 ± 0.09
D25	2.8 ± 0.3	1.6 ± 0.9	1.3 ± 0.2	13.0 ± 0.01	6.2 ± 0.01	4.4 ± 0.00
D40	3.7 ± 0.4	2.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	- <sup>d</sup>	10.7 ± 0.00	6.7 ± 0.00

**Legenda:**

<sup>a</sup> – Período de gelificação considerado quando  $G=G''$  valores são representados pela média ± SD (n=4). G- variação elástica e  $G''$  – módulo viscoso.

<sup>b</sup> – Relação de inchamento medida após 1 dia imerso em PBS em 37°C, valores são representados pela média ± SD (n=3).

<sup>c</sup> – Hidrogéis não formados.

<sup>d</sup> – Hidrogéis dissolvidos.

A quantidade de AAD adicionada (é muito importante no período de dissolução do hidrogel, na gelificação e na relação de inchamento) deve estar dentro da mesma gama da quantidade de resíduos oxidados presente no dextrano ou relativamente inferior. Senão pode não se formar o hidrogel como é o caso de DexOx 5%/ 20%.

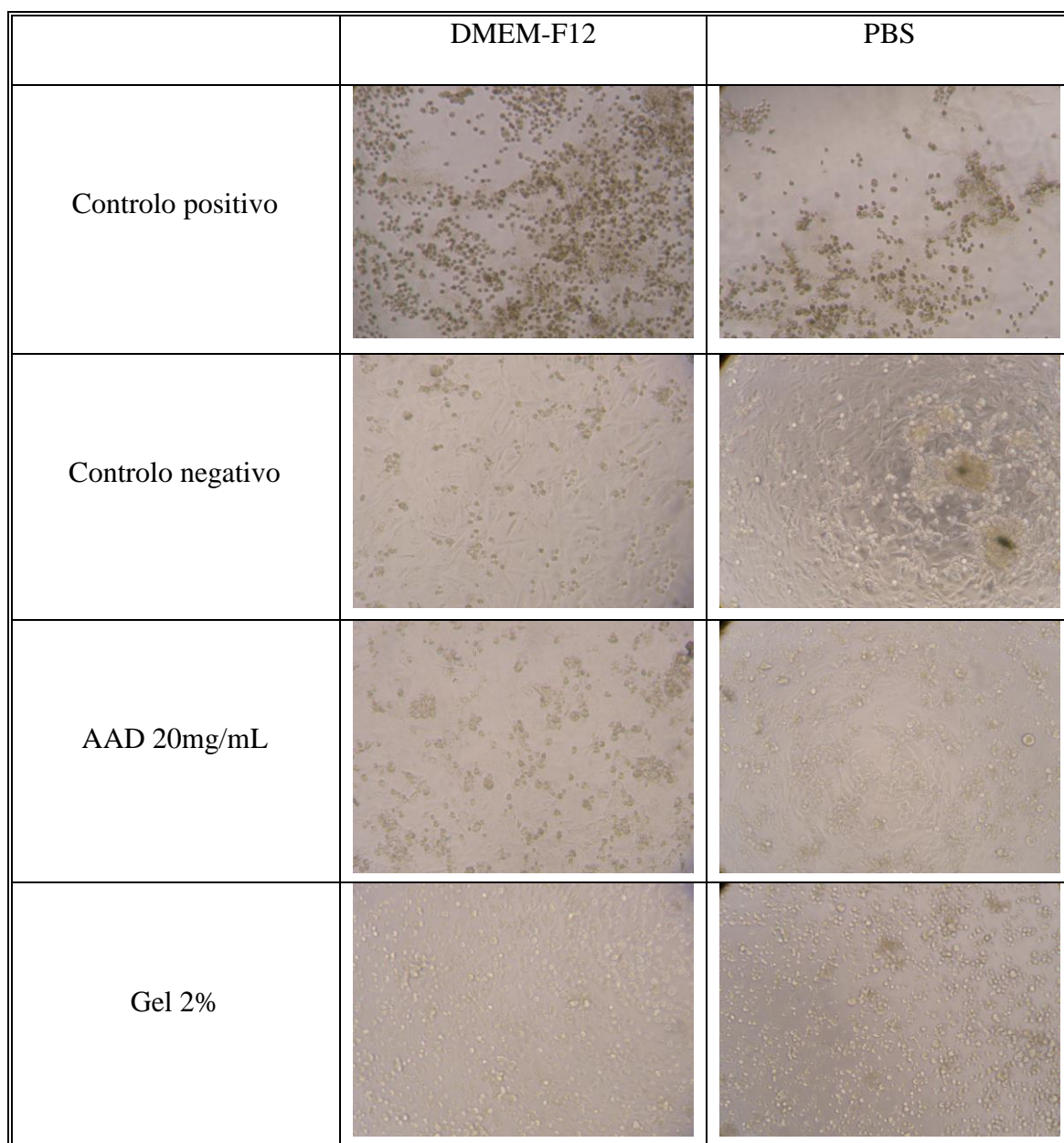
#### **4) Crescimento de células da linha celular A7r5 na presença de diferentes biomateriais**

As células da linha celular A7r5 quando se encontram em confluência são tripsinizadas e colocadas em placas de cultura de 96 poços revestidas com os diferentes biomateriais, fornecidos pelo Departamento de Engenharia da Universidade de Coimbra (ver anexo II, figura nº1). O crescimento celular foi acompanhado ao longo de 24 horas.

Foi então estudado o crescimento das células nestes hidrogéis baseados em dextrano com diferentes níveis de oxidação que foram reticulados com AAD, Gel ou mesmo ambos. Os materiais foram preparados quer em PBS quer no meio de cultura (DMEM- F12).

As primeiras imagens (figura nº 30, 31 e 32) mostram os resultados observados ao microscópio óptico ao fim de 24 horas de incubação das células A7r5 em materiais dissolvidos quer em DMEM- F12, quer em PBS.

Podemos observar que as células aderiram e cresceram tanto em DMEM-F12 como em PBS para o controlo negativo e em AAD (20mg/ mL). O mesmo não acontece para a Gel 2% e para o controlo positivo (figura nº 30). Nota-se uma maior aderência e crescimento para as células em contacto com materiais dissolvidos em DMEM-F12. Chegando mesmo à confluência celular no controlo negativo em DMEM-F12, este meio é rico em nutrientes básicos e concentrações de aminoácidos semelhantes às concentrações proteicas das células de mamíferos, isto explica possivelmente o maior crescimento das células em DMEM-F12 em relação ao PBS.



**Figura nº 30** – Crescimento de células A7r5 para o controlo positivo, controlo negativo, 20mg/mL AAD e Gel 2% inicialmente dissolvido em DMEM- -F12 ou em PBS após 24 horas de incubação.

Podemos observar através da figura nº 31 as várias formulações de DexOx e concentrações de AAD e/ou Gel dissolvidas em DMEM-F12. Pode-se observar que quando as células são colocadas em DexOx 5% com qualquer agente reticulante (AAD

e/ou Gel 2%) ocorre adesão celular à superfície desta formulação de dextrano. Havendo um crescimento superior para a formulação DexOx 5%/ 5% AAD.

Para a formulação DexOx 10% as células aderiram e cresceram apenas para as formulações de DexOx 10%/ 20% AAD e DexOx 10%/ 2%Gel. Enquanto que para DexOx 10%/ 10% AAD e DexOx 10%/ 10% AAD/ 2% Gel houve apenas aglomeração das células. Os resultados obtidos para a formulação DexOx 10% são contraditórios com o que foi dito anteriormente, uma vez que existe crescimento em DexOx 10%/ 20% AAD e em DexOx 10%/ 10% AAD não existe, foi colocada a hipótese de um mau revestimento das placas de cultura, que pode estar na origem desta contradição.

Na presença de DexOx 25% e DexOx 40% as células não cresceram independentemente de qualquer que fosse o agente reticulante presente, apenas ocorre aglomeração celular para as formulações de 25% como se pode observar na figura nº 28.

Foi possível observar que o aumento do grau de oxidação do dextrano levou a uma diminuição da adesão e crescimento das células A7r5. A percentagem de oxidação do dextrano está relacionada com o número de grupos aldeído existentes no dextrano oxidado, logo como foi referido anteriormente um excesso de grupos hidroxilos resulta na ausência de adesão celular. Esta poderá ser uma possível justificação para não ter ocorrido adesão nos hidrogéis que continham as formulações de DexOx 25% e DexOx 40%.



As células A7r5 foram semeadas nos poços das placas de 96 poços revestidas com hidrogéis (ver anexo II, figura nº1) cujos materiais iniciais (diferentes formulações de DexOx, AAD e Gel) foram dissolvidos em PBS. Os resultados obtidos não foram tão satisfatórios como os descritos na figura nº 31 para materiais preparados no meio de cultura (figura nº 32).

Quando as células foram colocadas em DexOx 5% só se observa a adesão e crescimento para DexOx 5%/ 10% AAD/ 2% Gel havendo aglomeração celular nas restantes formulações de dextrano.

Para o DexOx 10 % as células aderiram na presença da Gel 2%. Não houve adesão para nenhuma das restantes formulações (DexOx 10% /10% AAD, DexOx 10%/ 20% AAD e DexOx 10%/ 10% AAD/ 2% Gel).

Em contacto com DexOx 25% verificou-se uma pequena adesão celular e pequeno crescimento para DexOx 25%/ 2%Gel. Para DexOx 25% / 10% AAD e para DexOx 25%/ 20% AAD verifica-se aglomeração celular. E a imagem de DexOx 25% /10% AAD/ 2% Gel não nos mostra nada uma vez que é impossível a sua visualização.

Para o DexOx 40% não se observou adesão celular, nem crescimento celular e também não se observa aglomeração para as formulações preparadas com este grau de oxidação, à excepção de DexOx 40%/ 10% AAD/ 2% Gel, que não se pode comentar, uma vez que não é possível a visualização desta (figura nº 32).

Todos estes resultados são contraditórios com o que foi observado na placa anterior com hidrogéis preparados com materiais dissolvidos em DMEM-F12. À excepção da adesão e crescimento celular verificada em DexOx 5%/ 10% AAD/ 2% Gel e DexOx 10%/ 2%Gel que também se constatou anteriormente (figura nº 31). Para tantos resultados contraditórios, foi colocada a hipótese de um mau revestimento da placa de cultura cujos materiais foram dissolvidos em PBS.

Estudos recentes demonstram a capacidade de adesão de células de rato em hidrogéis constituídos com DexOx. Num estudo comparativo ao presente, realizado por Weng e colaboradores também se verificou adesão de células de rato (fibroblastos) semeadas num biomaterial constituído por DexOx e N-carboxietil-quitosano (onde estes materiais também foram inicialmente dissolvidos em PBS), após o estudo da cultura de células *in vitro* conclui-se que este biomaterial era degradável e não era tóxico (Weng *et al.*, 2008).



**Tabela 3** – Adesão e crescimento celular das células de músculo liso A7r5 nas várias formulações de dextrano oxidado.

DexOx		AAD 5%	AAD 10%	AAD 20%	AAD10%/ 2% Gel	Gel 2%	AAD 20mg	Controlo negativo	Controlo positivo
5%	PBS	X	X	-----	*	X			
	DMEM	* +	*	-----	*	*			
10%	PBS	-----	X	X	X	*			
	DMEM	-----	X	*	*	X			
25%	PBS	-----	X	X	X	X			
	DMEM	-----	X	X	X	X			
40%	PBS	X	X	-----	X	X			
	DMEM	X	X	-----	X	X			
Sem	PBS					X	* +	* +	X
	DMEM					X	* +	* +	X

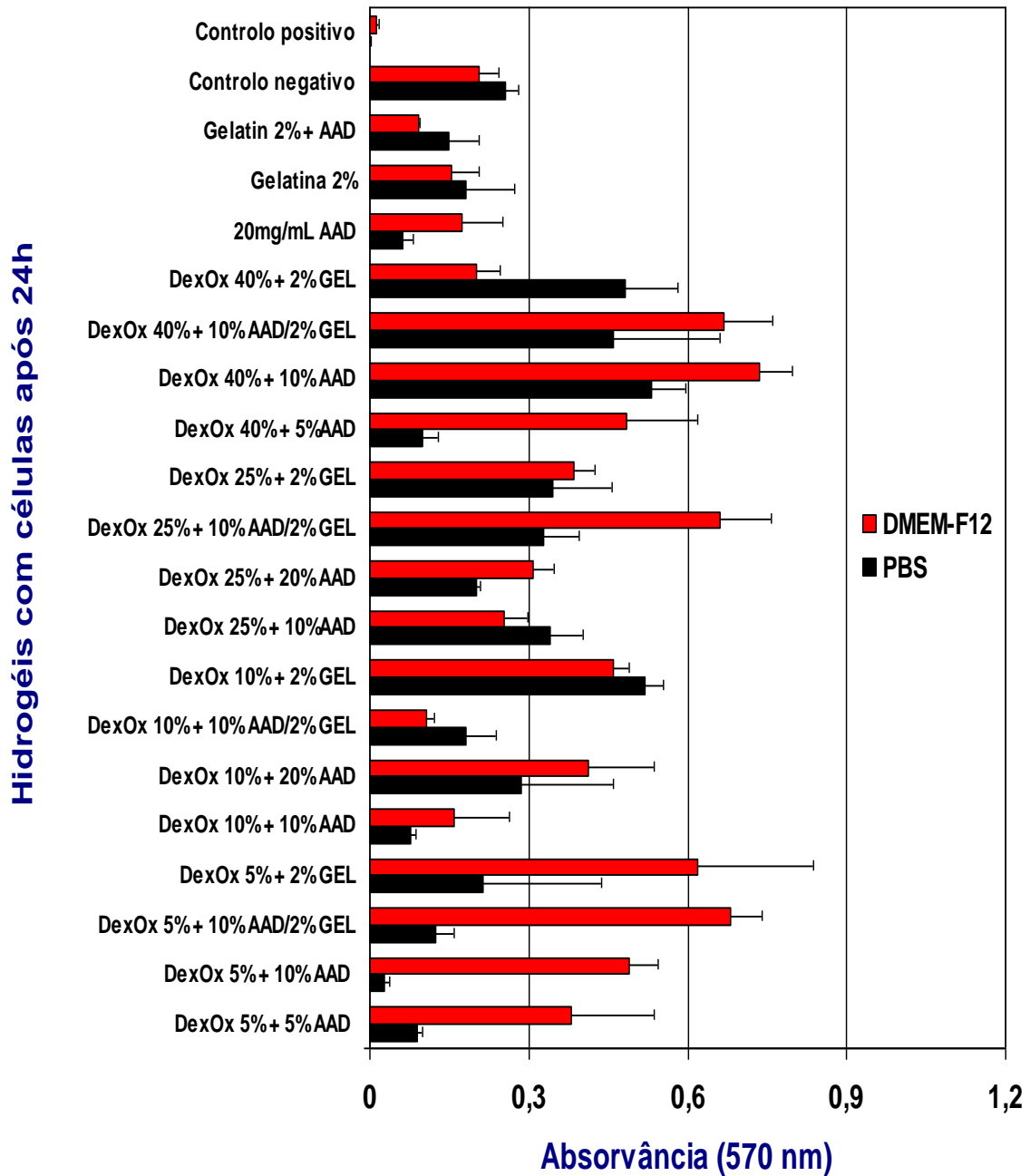
**Legenda:**

\* - adesão e crescimento, \*+ - adesão e grande crescimento e X- não aderem

Após análise microscópica onde se observou se existe adesão e crescimento celular (tabela 3) nas placas preparadas com os diferentes hidrogéis foi avaliada a biocompatibilidade dos hidrogéis através do ensaio do MTT.

O ensaio do MTT é um método rápido e efectivo para testar a integridade mitocondrial, citotoxicidade e biocompatibilidade do material. O gráfico do ensaio do MTT apresenta as absorvâncias para as células musculares lisas A7r5 em contacto com materiais preparados quer no meio DMEM-F12 assim como com PBS após 24 h de incubação (figura nº 33).

## Ensaio do MTT



**Figura nº 33** – Viabilidade celular das células musculares lisas A7r5 determinada pelo teste de redução do MTT. A percentagem de viabilidade celular foi calculada relacionando os valores de absorvância obtidos a 570nm para cada amostra, com o controlo positivo (um controlo contendo apenas as células expostas a 96% de etanol) e com o controlo negativo (um controlo contendo apenas as células). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão, considerando os resultados obtidos para 3 experiências independentes.

Neste ensaio de viabilidade celular (MTT) confirmou-se o que foi observado por microscopia óptica, ou seja, a existência de maior actividade da enzima mitocondrial em hidrogéis preparados com DMEM-F12, uma vez que estes possuem maiores absorvâncias em comparação aos preparados com PBS. É possível observar-se para o DMEM uma maior absorvância para dextrano com grau de oxidação 5% com qualquer agente reticulante, confirmando-se portanto uma maior actividade mitocondrial à superfície do biomaterial.

Podemos observar no gráfico que todas as formulações feitas em DMEM-F12 promovem actividade mitocondrial superior ao controlo negativo com excepção do hidrogel DexOx 10% / 10% AAD e DexOx 10% / 10% AAD/ 2% Gel, uma vez que possuem maior absorvância. Quando os biomateriais foram dissolvidos em PBS verificou-se que algumas das formulações possuíam absorvâncias abaixo do controlo negativo (DexOx 40%/ 5% AAD, DexOx 25%/ 20% AAD, DexOx 10%/ 10% AAD, DexOx 5%/ 10% AAD e DexOx 5%/ AAD 5%). Verifica-se que o AAD não tem grande interferência nos resultados do MTT uma vez que o controlo de AAD (20mg/mL) tem resultados inferiores à maioria das formulações.

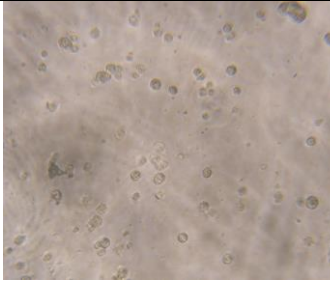
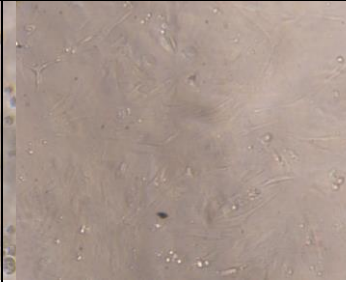
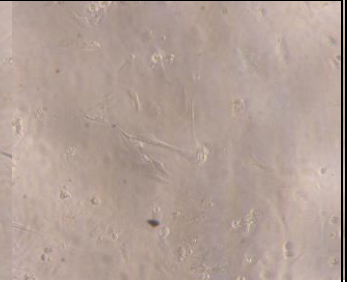
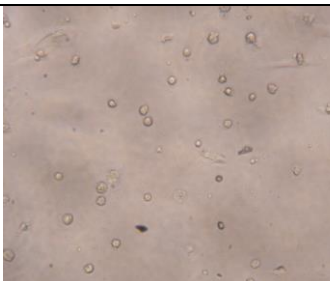
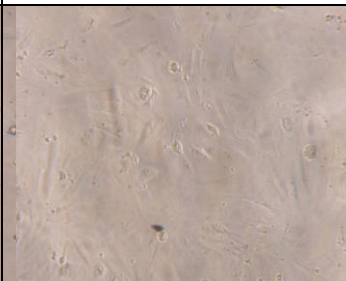
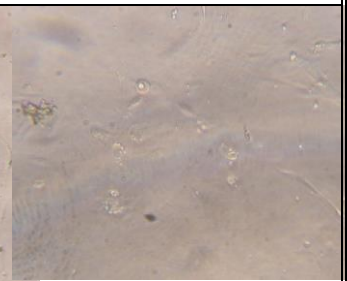
Constata-se que os hidrogéis produzidos com DexOx 5% preparados em DMEM-F12 foram onde se obtiveram os melhores resultados verificando-se adesão e crescimento celular. Os hidrogéis que foram dissolvidos em PBS são substratos pobres para adesão e crescimento celular. Os altos valores de absorvância observados em DexOx 40% devem-se a interferência do biomaterial e não a valores de actividade mitocondrial das células existentes nesta formulação.

## 5) Crescimento de células do músculo liso humanas na presença de diferentes biomateriais

Foi também estudado o crescimento das HSMC isoladas a partir do cordão umbilical em vários hidrogéis com diferentes níveis de oxidação de dextranos e reticulados com AAD, Gel ou mesmo ambos. Os materiais foram preparados quer em PBS quer no meio de cultura (DMEM-F12).

As células foram colocadas em placas de cultura revestidas com os diferentes biomateriais, fornecidos pelo Departamento de Engenharia da Universidade de Coimbra (ver anexo II, figura nº2). O crescimento celular foi acompanhado ao longo de 24 horas.

As imagens mostram os resultados ao fim de 24 horas de incubação das HSMC em contacto com materiais dissolvidos em DMEM-F12 e em PBS. Como se pode observar na figura nº 34 houve adesão e crescimento celular para células no controlo negativo assim como em contacto com AAD (20mg/ mL), sendo superior no controlo negativo. Este crescimento é superior na presença de DMEM-F12 em relação ao observado na presença de PBS (figura nº 34).

	<b>Controlo positivo</b>	<b>Controlo negativo</b>	<b>AAD</b>
<b>DME M-F12</b>			
<b>PBS</b>			

**Figura nº 34** – Crescimento de HSMC para o controlo positivo, controlo negativo, 20mg/ mL e AAD inicialmente dissolvido em DMEM-F12 ou em PBS após 24 horas de incubação.

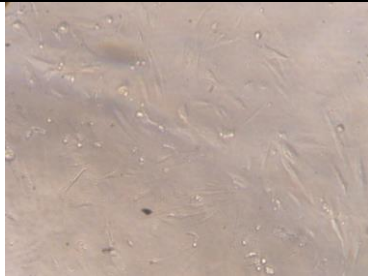
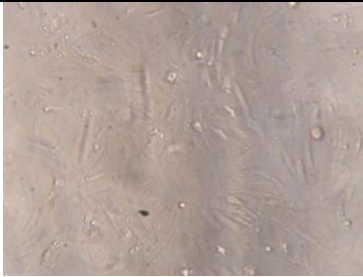
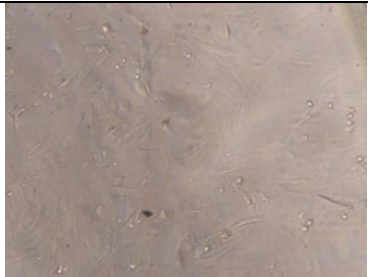
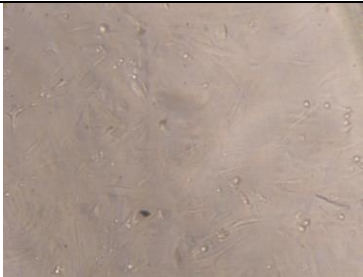
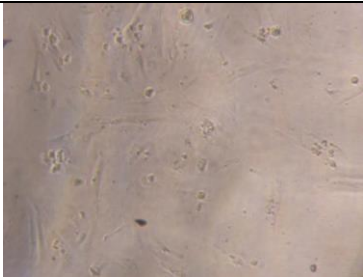
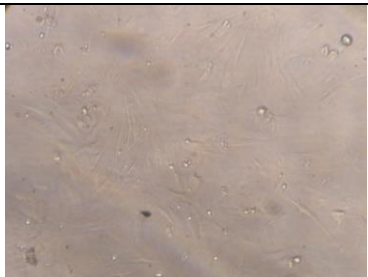
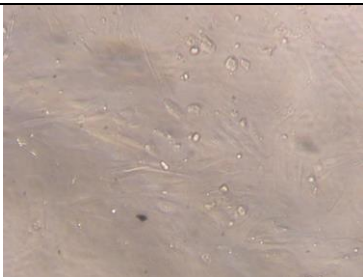
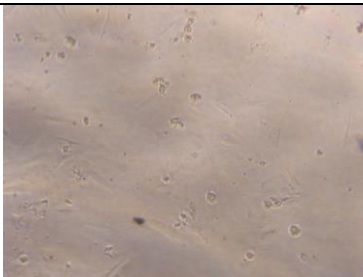
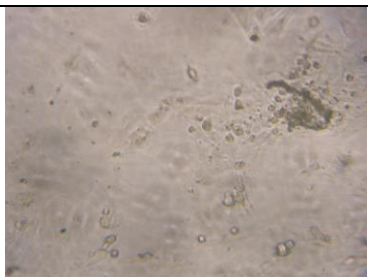
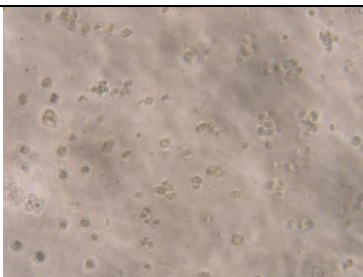

A figura nº 35 mostra-nos os resultados obtidos do crescimento das HSMC em placas de 96 poços revestidas por 60 µL de hidrogéis (baseados nas diferentes formulações de DexOx reticulados por diferentes concentrações de AAD, ambos dissolvidas em DMEM-F12) após 24 horas. Na presença de DexOx 5% verificou-se adesão e crescimento celular tanto para DexOx 5%/ 5% AAD como para DexOx 5%/ 10% AAD.

Quando adicionadas a DexOx 10 % as células aderiram e cresceram para todas as percentagens de ADD (5%, 10% e 20%) adicionadas ao DexOx. Apesar de este crescimento ser inferior ao observado em dextrano oxidado 5%.

Também se observa crescimento celular para todas as formulações preparadas com dextrano oxidado 25%. Sendo este crescimento menor em relação aos graus de oxidação de dextrano 5 % e 10%. Ou seja, existe um menor crescimento celular em materiais com maior grau de oxidação.

Os grupos aldeídos do DexOx formam bases de Schiff com os grupos aminas do AAD, levando à formação de uma rede tridimensional de pontos de ligação (hidrogel). Isto pode explicar adesão celular nas diferentes formulações DexOx com as diferentes concentrações de AAD.

Na presença de DexOx 40% não houve qualquer adesão celular, nem crescimento celular, ao contrário dos casos anteriores. Esta falta de crescimento pode dever-se ao facto de não existir porosidade para esta formulação de DexOx, uma vez que é muito compacto (como se pode ver na figura nº29), logo não facilita o transporte de nutrientes e oxigénio, ou seja a proliferação celular.

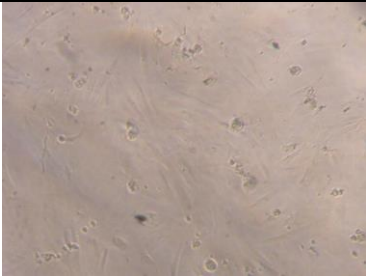
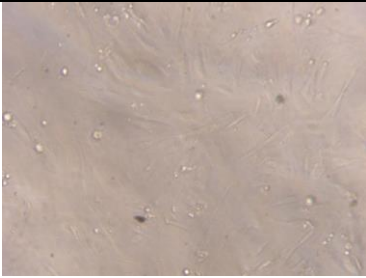
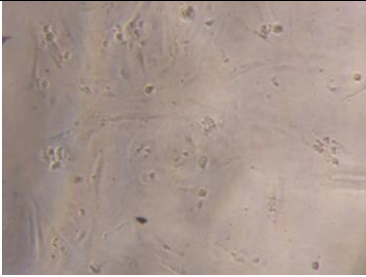
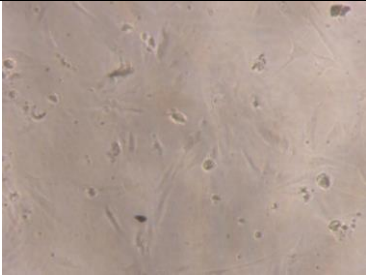
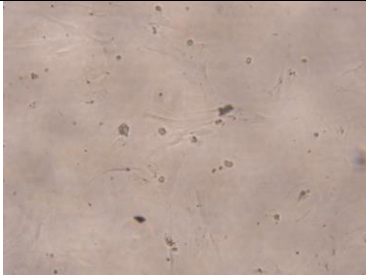
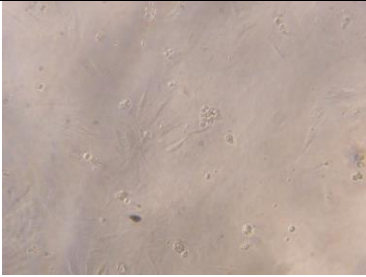
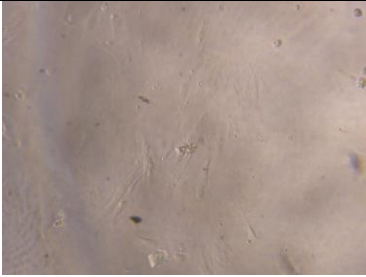

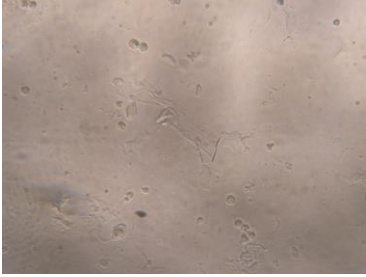
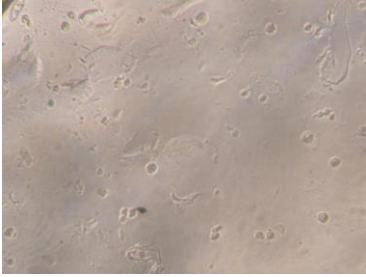
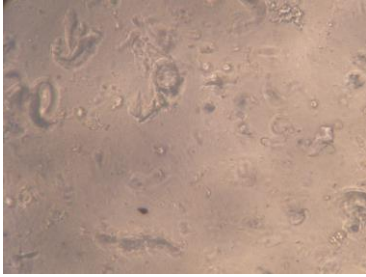
	<b>AAD 5%</b>	<b>AAD 10%</b>	<b>AAD 20%</b>
<b>DexOx 5%</b>			Não se forma
<b>DexOx 10%</b>			
<b>DexOx 25%</b>			
<b>DexOx 40%</b>			

**Figura nº 35** – Crescimento de HSMC após 24 horas de incubação em diferentes hidrogéis produzidos com diferentes formulações de DexOx e concentrações de AAD inicialmente dissolvidos em DMEM-F12.

As células HSMC também foram adicionadas a uma placa de 96 poços revestida com hidrogéis cujos materiais (diferentes formulações de DexOx e AAD) foram inicialmente dissolvidos em PBS (ver anexo II, figura nº 2). A figura nº 36 mostra-nos o crescimento das HSMC ao fim de 24 horas em contacto com estes hidrogéis.

Na presença de dextrano com 5% de oxidação as células aderiram e cresceram na presença de 5% e 10% AAD. Também se observa crescimento celular para DexOx 10% na presença de qualquer uma das percentagens (5%, 10% e 20%) de AAD. Sendo este crescimento relativamente menor ao obtido para dextrano oxidado 5%. Observa-se ainda um pequeno crescimento celular na presença de DexOx 25% em relação ao verificado em DexOx 5% e 10% na presença das mesmas percentagens de AAD (5%, 10% e 20%).

Por fim para o DexOx 40% não se observou qualquer adesão ou crescimento celular. Foi observado que quanto maior a oxidação do dextrano menor é o crescimento celular. Estes resultados são concordantes com os resultados observados anteriormente (figura nº 35).

	<b>AAD 5%</b>	<b>AAD 10%</b>	<b>AAD 20%</b>
<b>DexOx 5%</b>			Não se forma
<b>DexOx 10%</b>			
<b>DexOx 25%</b>			
<b>DexOx 40%</b>			

**Figura nº 36** – Crescimento de HSMC após 24 horas de incubação em diferentes hidrogéis produzidos com diferentes formulações de DexOx e concentrações de AAD inicialmente dissolvidos em PBS.

**Tabela 4** – Adesão e crescimento celular das HSMC nos diferentes materiais à base de dextrano oxidado.

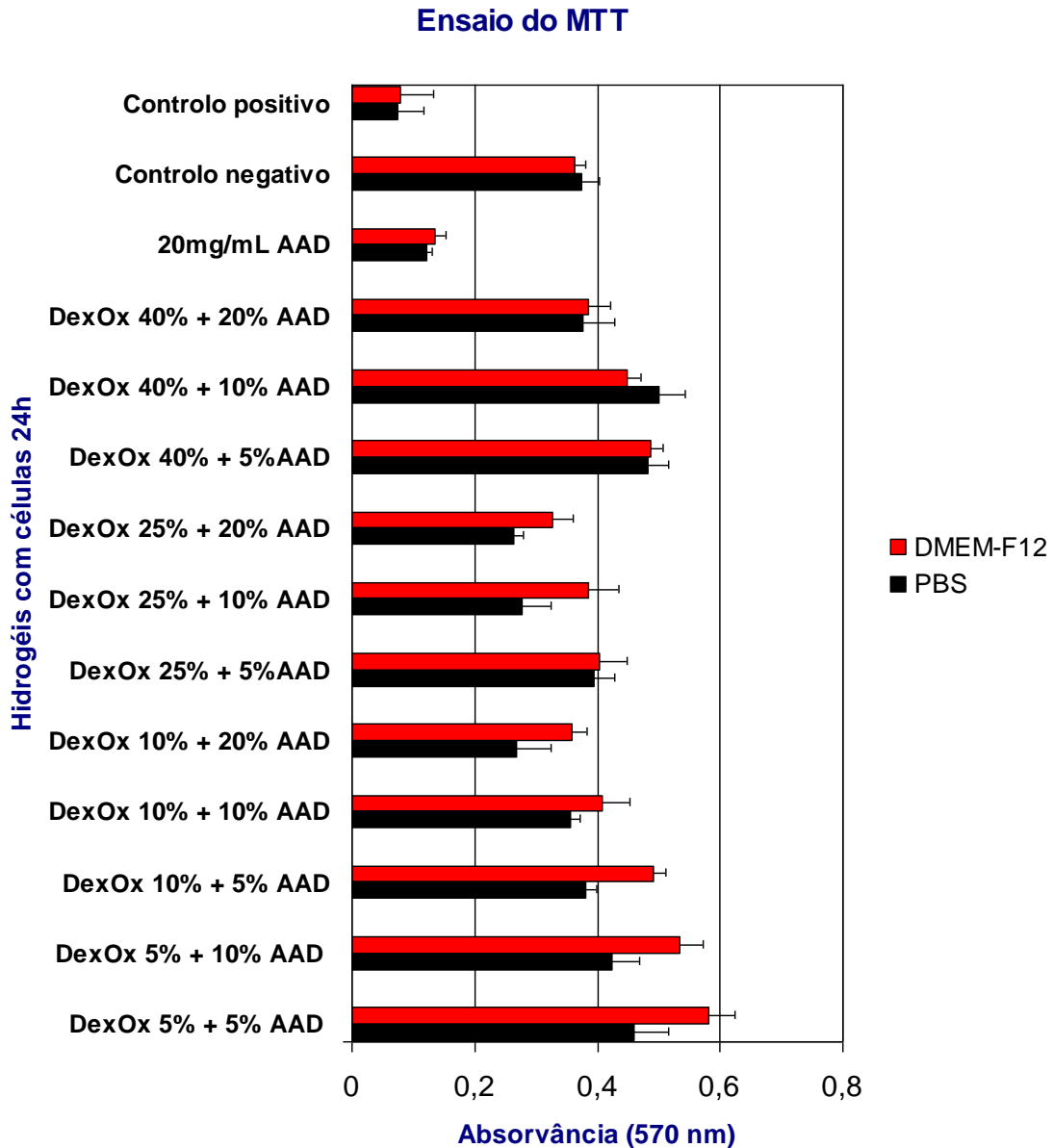
DexOx		AAD 5%	AAD 10%	AAD 20%	AAD 20mg	Controlo negativo	Controlo positivo
5%	PBS	*	*	Não se forma			
	DMEM	* +	* +	Não se forma			
10%	PBS	*	*	*			
	DMEM	* +	* +	* +			
25%	PBS	*	*	*			
	DMEM	*	*	*			
40%	PBS	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>			
	DMEM	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>			
Sem	PBS				*	* +	<b>X</b>
	DMEM				*	* +	<b>X</b>

**Legenda:**

\* - adesão e crescimento, \*+ - adesão e grande crescimento e **X**- não aderem

Após análise microscópica onde se observou se existia adesão e crescimento celular das HSMC (tabela 4) nas placas preparadas com os diferentes hidrogéis foi realizado o ensaio do MTT para avaliar a biocompatibilidade dos hidrogéis.

O gráfico do ensaio do MTT apresenta as absorvâncias para as HSMC em contacto com materiais preparados quer no meio DMEM-F12 assim como com PBS (ver anexo I tabela nº9 e nº10) após 24h de incubação (figura nº 37). O MTT é um método eficaz para avaliar a citotoxicidade do biomaterial.



**Figura nº 37** – Viabilidade celular das células musculares lisas humanas determinada pelo teste de redução do MTT. A percentagem de viabilidade celular foi calculada relacionando os valores de absorvância obtidos a 570nm para cada amostra, com o controlo positivo (um controlo contendo apenas as células expostas a 96% de etanol) e com o controlo negativo (um controlo contendo apenas as células). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão, considerando os resultados obtidos para 3 experiências independentes.

Neste ensaio de viabilidade celular (MTT) verifica-se que os resultados são concordantes com o que foi observado por microscopia óptica, ou seja, a existência de maior número de células para os hidrogéis com menor grau de oxidação de dextrano. À exceção do DexOx 40%, que possui altas absorvâncias apesar de não se observar qualquer tipo de adesão celular por microscopia óptica, isto pode dever-se possivelmente a interferência do biomaterial. Contudo os melhores resultados foram observados para a formulação de DexOx 5%/ 5% AAD, confirmando-se portanto a maior adesão celular observada à superfície do biomaterial.

Podemos também observar no gráfico que todas as formulações em que os materiais tinham sido previamente dissolvidos em DMEM-F12 possuem maiores absorvâncias em relação aos que foram dissolvidos em PBS. Isto pode indicar a importância de se utilizar o meio de cultura das células na preparação dos hidrogéis, uma vez que se obtiveram resultados mais satisfatórios. Este meio possui nutrientes básicos e concentrações de aminoácidos semelhantes às concentrações proteicas das células de mamíferos, isto explica possivelmente o maior crescimento das células em DMEM-F12 em relação ao PBS.

Recentemente, Bhatia e colaboradores semearam células de fibroblastos 3T3 de rato sobre adesivos cirúrgicos formados por DexOx e PEG e demonstraram que estes não eram tóxicos e que houve confluência celular ao fim de 24 horas de crescimento (Bhatia *et al.*, 2007). A adesão celular e crescimento celular foram conseguidos com um grau de oxidação superior ao DexOx 5% onde se obteve melhores resultados no presente estudo. Porém é demonstrado como a ligação a dextrano oxidado pode ter melhores propriedades de adesão de células que o próprio dextrano (Massia *et al.*, 2000). Apesar de mostrar alguma toxicidade quando se apresenta, só, em cultura de células com células mesoteliais (Ito *et al.*, 2007).

Em relação à adesão esta pode ser melhorada através do enxerto de peptídeos de adesão (RGD). A base de Schiff formada após a reação do grupo amina do peptídeo com o grupo aldeído do DexOx pode ser facilmente reduzida usando cianoborohidreto (Bouhadir *et al.*, 1999).

## V- Conclusão

Este estudo permitiu o isolamento de células de músculo liso humanas por diferentes métodos. Após várias tentativas, verificou-se que o método mais eficaz para se obter células de músculo liso foi o método I, uma vez que foi possível o isolamento apenas de células de músculo liso. Também foi possível a obtenção de células de músculo liso através do método II, apesar de no início do isolamento haver dois tipos de células (endoteliais e de músculo liso), após 2 ou 3 dias obteve-se uma cultura com apenas células de músculo liso.

Foi utilizada a técnica da imunofluorescência indirecta com marcadores específicos moleculares, em que as células apresentaram sinal positivo para *anti-actin*,  $\alpha$  *smooth muscle*, o que permitiu identificar a existência de células do músculo liso. Não houve contaminação da cultura de células de músculo liso por células endoteliais, uma vez que não foi confirmado o sinal positivo para a expressão do factor  $vW$  e do factor *CD144*. Nem contaminação da cultura muscular por fibroblastos devido à ausência de imunodeteção do anticorpo monoclonal *anti-human fibroblast*. Conclui-se assim que o objectivo de obter uma cultura pura de células de músculo liso humana isoladas a partir das artérias do cordão umbilical foi atingido.

Maia e colaboradores verificaram num estudo anterior que nos hidrogéis baseados em dextrano oxidado reticulado com AAD, os grupos aldeídos presentes no dextrano oxidado reagem com o grupo hidrazida do AAD, aumentando os grupos hidroxilo que vão facilitar a adesão celular ao dextrano. A quantidade de AAD adicionada (é muito importante no período de dissolução do hidrogel, na gelificação e na relação de inchamento) deve estar dentro da mesma gama da quantidade de resíduos oxidados presente no dextrano ou relativamente inferior.

Entre as diferentes formulações de dextrano oxidado testadas onde se verificou melhor adesão e crescimento para a linha celular A7r5 e para as células de músculo liso humanas, foi para DexOx 5% com qualquer concentração de AAD, para os materiais dissolvidos em DMEM-F12. A percentagem máxima de oxidação de dextrano na qual se observou células aderidas foi de 10% para células de músculo liso A7r5 e 25% para HSMC. Para formulações de DexOx 40% não houve crescimento celular em nenhum dos dois tipos de células musculares, tanto para materiais dissolvidos em DMEM-F12 como dissolvidos em PBS. Segundo as imagens de SEM isto deve-se ao facto de na

presença de dextrano com 40% de oxidação o hidrogel não tem porosidade é muito compacto, logo não facilita a proliferação celular. Num estudo recente Weng e seus colaboradores concluíram que um material poroso facilita o transporte de nutrientes e oxigénio, promovendo a proliferação celular.

Conclui-se que para ambos tipos de células A7r5 e HSMC que a adesão e o crescimento celular era superior nos hidrogéis cujos biomateriais foram dissolvidos em meio de cultura (DMEM-F12) e que à medida que o grau de oxidação de dextrano aumenta, menor é o crescimento celular.

O ensaio do MTT *in vitro* mede a viabilidade celular mostrando a biocompatibilidade e citotoxicidade dos hidrogéis utilizados. Podemos constatar através dos gráficos dos ensaios do MTT que as absorvâncias são mais elevadas para as formulações de DexOx 5% para ambos os tipos de células. Conclui-se portanto que existe uma viabilidade celular elevada para baixos graus de oxidação de dextrano.

Conclui-se assim, que os hidrogéis baseados no dextrano oxidado ligado com AAD são biocompatíveis e poderão ser usados *in vivo* para efectuar estudos que visem o desenvolvimento de aplicações na medicina regenerativa, como substitutos de vasos sanguíneos para o tratamento de doenças cardiovasculares. Estes hidrogéis podem também ser promissores sistemas de libertação de droga e/ou entrega de células (injectáveis).

Como perspectivas futuras propõe-se a criação de um biomaterial com DexOx 40% reticulado com uma concentração de AAD superior às que foram utilizadas neste estudo. De modo a se obter um polímero estável e mais durável. Mais ensaios de biocompatibilidade para os hidrogéis baseados em DexOx, como o LDH e MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) poderiam ser realizados para suporte da não toxicidade destes biomateriais.

## VI. Anexo I – Preparações de soluções

**Tabela 1** – Preparação da solução PSS (Solução Salina de Fosfato) básica concentrada, para volume final de 1 L.

Solução	Concentração	Volume (mL)	10x (mL)	Marca dos reagentes
EDTA	100 mM	5	50	Sigma
KCl	1 M	5	50	Sigma
HEPES	1 M	10	100	Sigma
Reagente	Quantidade (g)		10 x (g)	
MgCl <sub>2</sub>	0,4066		4,066	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	0,8401		8,401	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0680		0,680	Sigma
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0600		0,600	USB
Glicose	1,8016		18,016	Sigma
H <sub>2</sub> O destilada	Perfazer até 1 L			
pH = 7,4				

**Tabela 2** – Preparação da solução PSS diluída, para volume final de 1 L.

Solução	Concentração	Volume (mL)	Marca dos reagentes
PSS básico concentrado	-----	100	-----
NaCl	1 M	110	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	1 M	0,16	Sigma
H <sub>2</sub> O destilada	Perfazer até 1 L		
pH = 7,4			

**Nota** – A filtração desta solução é realizada com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar.

**Tabela 3** – Preparação da solução **PBS (Solução Salina Tampão)** para um volume final de 1 L.

<b>Solução</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
NaCl	81,816	Panreac
KCl	2,013	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,050	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,620	USB
H <sub>2</sub> O destilada	Perfazer até 1 L	
pH = 7,4		

**Nota** – A filtração desta solução é realizada com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar.

**Tabela 4** – Preparação da solução **HBSS (Solução Salina Hank's Balanced)** para um volume final de 1 L.

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
CaCl <sub>2</sub>	0,14	Sigma
KCl	0,4	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06	Sigma
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1	Sigma
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	Sigma
NaCl	8,0	Panreac
NaHCO <sub>3</sub>	0,35	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,09	Sigma
D-glucose	1,0	Sigma
H <sub>2</sub> O destilada	Perfazer até 1 L	
pH = 7,4		

**Nota** – A filtração desta solução é realizada com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar.

**Tabela 5** – Preparação da solução de **AP (Antiprotease)** para um volume final de 1 mL de PSS.

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade (mg)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
Pefabloc	6	Fluka
Benzamidina	6,5	Sigma
Inibidor de tripsina	2,5	Sigma
Leupectina	0,1125	Sigma
<b>Solução</b>	<b>Quantidade (mL)</b>	
PSS básico diluído	1	

**Nota** – É feita uma solução de 5 mL e alíquota-se 200 µL para eppendorfs. Esta solução é filtrada antes de se usar, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

**Tabela 6** – Solução **AB (Antibiótico/Antimicótico)**.

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
Penicilina	10000 U	Sigma
Estreptomicina	10 mg	Sigma
Anfotericina	25 µg	Sigma

**Nota** – A solução alíquota-se 1 mL para eppendorfs. A quantidade a acrescentar de AB ao meio de cultura e às soluções é 10 µL/mL de solução.

**Tabela 7** – Preparação da solução de cultura celular **DMEM – F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – F 12)** para um volume final de 1 L.

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
DMEM-F12 liofilizado	15,6	Sigma
L-ascórbico	0,02	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	1,2	Sigma
H <sub>2</sub> O destilada	Perfazer até 1 L	
pH = 7,4		

**Nota** – A filtração desta solução é realizada com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar.

**Tabela 8** – Preparação da solução de cultura celular **DMEM – F12 com 10 % de soro fetal bovino** para um volume final de 200 mL.

<b>Solução</b>	<b>Quantidade (mL)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
DMEM-F12	180	-----
FBS	20	Biochrom-AG
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade (g)</b>	
BSA (albumina sérica de bovino)	1	Sigma
pH = 7,4		

**Nota** – É necessário proceder à filtração da solução, com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar.

**Tabela 9** – Preparação da solução de cultura celular **DMEM – F12 com 5 % de soro fetal bovino** para um volume final de 200 mL.

<b>Solução</b>	<b>Quantidade (mL)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
DMEM-F12	190	-----
FBS	10	Biochrom-AG
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade (g)</b>	
BSA	1	Sigma
pH = 7,4		

**Nota** – É necessário proceder à filtração da solução, com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar.

**Tabela 10** – **Factores de crescimento** adicionados à solução de cultura celular **DMEM – F12 com 5 % de soro fetal bovino** para um volume final de 200 mL.

<b>Reagente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Quantidade (µL)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
GSP	-----	2000	-----
Insulina	10 mg/mL	100	Sigma

**Tabela 11** – Preparação do **GSP (componentes de suplemento do crescimento)**, para um volume final de 10 mL.

<b>Solução</b>	<b>Concentração</b>	<b>Quantidade (mL)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
EGF	100 ng/mL	2000	Sigma
FGF	1 µg/mL	100	Sigma
Heparina	2 mg/mL	1	LEO- Pharmaceutic
PBS	-----	2	-----

**Tabela 12** – Preparação da solução de cultura celular **RPMI 1640, com glutamina suplementado com 10 % de soro fetal bovino** para um volume final de 50 mL.

<b>Solução</b>	<b>Quantidade (mL)</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
RPMI 1640	45	GIBCO
FBS	5	Biochrom-AG
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade (g)</b>	
NaHCO <sub>3</sub>	0,1	Sigma
pH = 7,4		

**Nota** – A filtração desta solução é realizada com uma unidade de filtração no interior de uma câmara de fluxo laminar

**Tabela 13** – **Factores de crescimento** adicionados à solução de cultura celular **RPMI 1640 com glutamina e suplementado com 10 % de soro fetal bovino** para um volume final de 50 mL.

<b>Reagente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
Heparina	25 µg/mL	LEO-Pharmaceutic
ECGF	50 µg/mL	Sigma

**Tabela 14** – Preparação dos frascos de transporte dos olhos de coelhos e cordões umbilicais.

<b>Solução</b>	<b>PSS (mL)</b>	<b>AP (µL)</b>	<b>AB(µl)</b>
Frascos de shott	100	40	1000
Frascos de falcon	25	10	250

**Nota** – Os frascos de shott e falcons são preparados no interior da câmara de fluxo laminar e posteriormente são armazenados no frigorífico a 4°C.

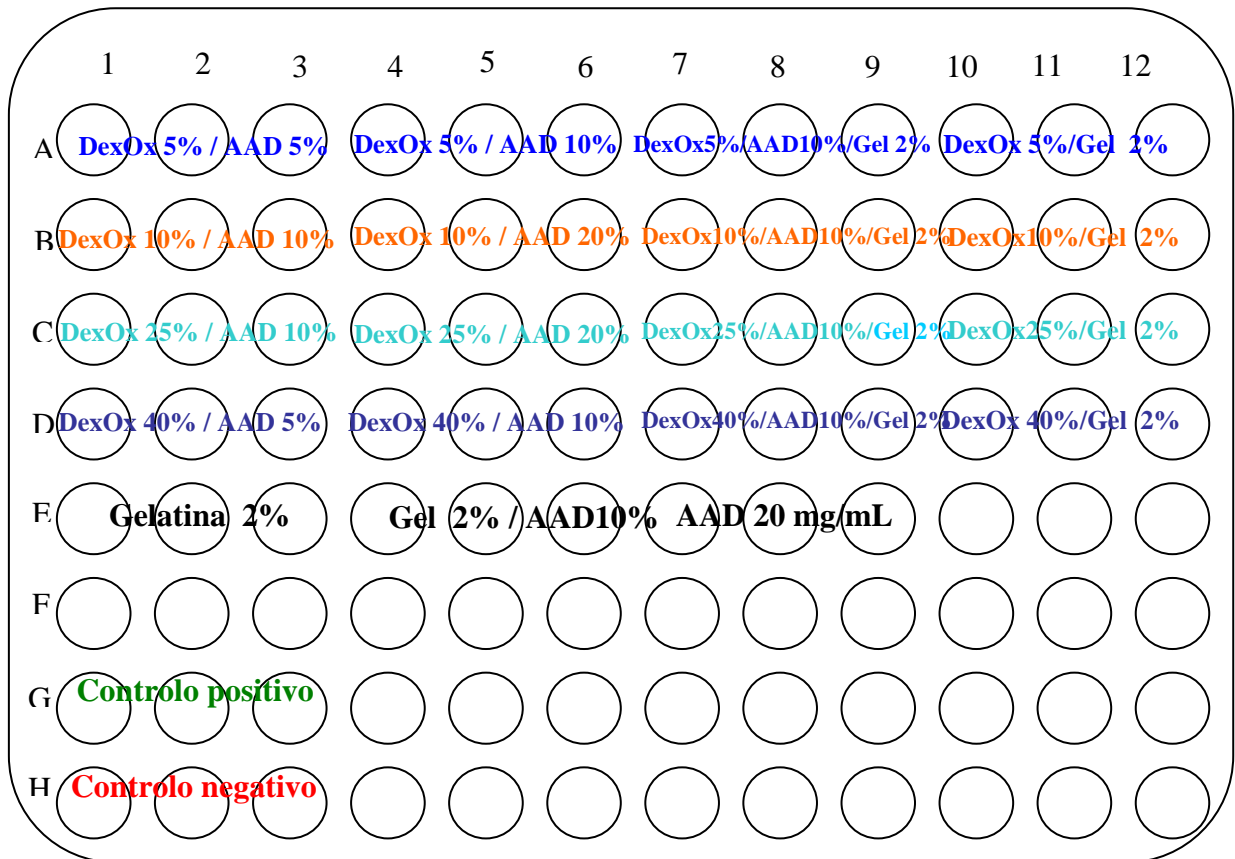
**Tabela 15** – Reagentes necessários na fixação de células e imunofluorescência.

<b>Reagente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Marca dos reagentes</b>
Paraformaldeio	4%	Applichem
Triton X-100	1%	-----
Albumina	3%	Sigma
Tween 20	0,2%	Panreac
Meio de montagem (media mounting)	-----	Dako Cytomation

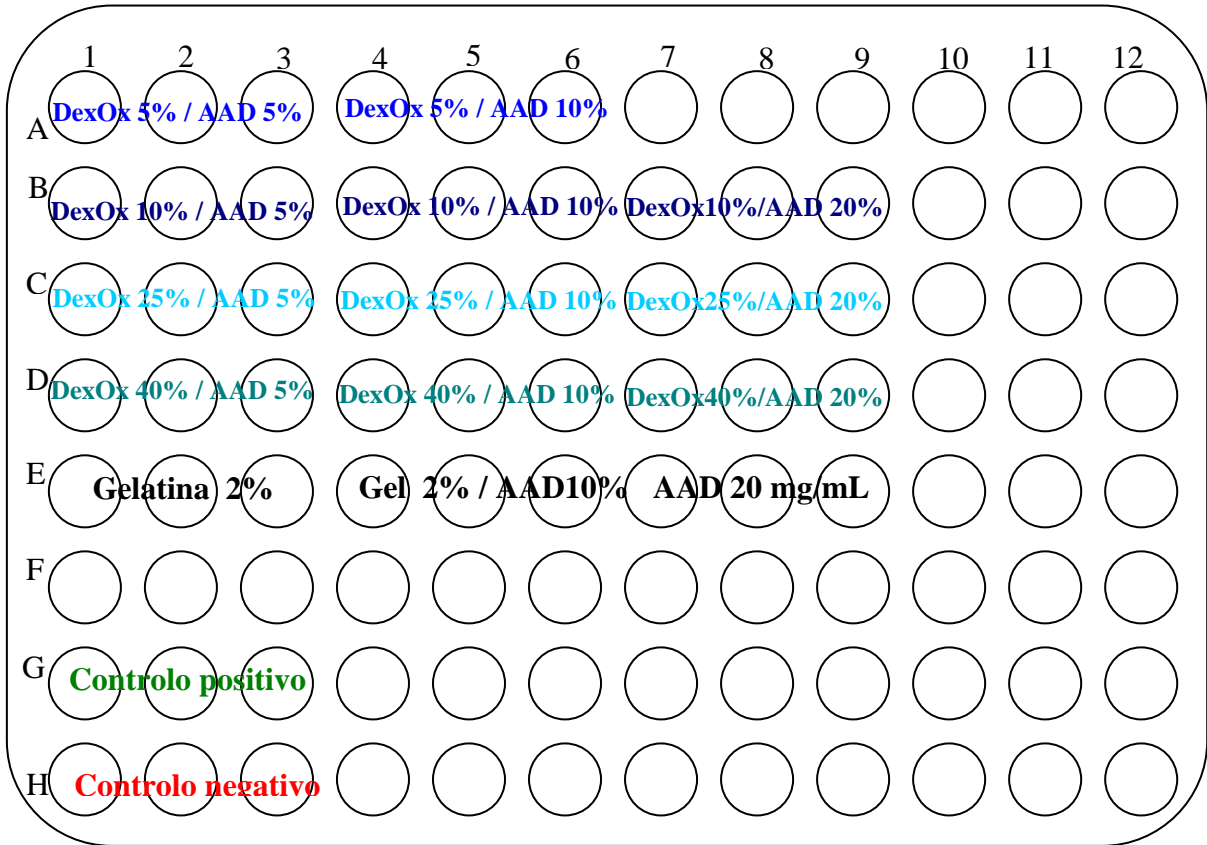
**Tabela 16** – Anticorpos primários e secundários usados na imunofluorescência.

<b>.Anticorpo</b>		<b>Concentração recomendada</b>	<b>Marca do anticorpo</b>
Anticorpo primário (1:1000)	E1	5-10 µg/ mL	Chemicon INTERNATIONAL
	E2	0,08-1,2 mg/mL	Sigma
	S	2 mg/mL	Sigma
	F	0,2 mg/ mL	Sigma
Anticorpo secundário (1:1000)	A <sub>488</sub>	-----	
	A <sub>546</sub>	-----	

## VI. Anexo II – Preparação das placas com biomateriais – hidrogéis baseados no dextrano oxidado.



**Figura nº 1** – Esquemas da placa com os biomateriais usadas para estudar a biocompatibilidade do dextrano nas células de musculo liso de rato A7r5.



**Figura nº 2** – Esquemas da placa com os biomateriais usadas para estudar a biocompatibilidade do dextrano nas células humanas de músculo liso.

## VII – Bibliografia

- Aird W. C. (2007), “Phenotypic heterogeneity of the endothelium, structure, function and mechanisms”, *Circulation Research*, **100**: 158-173.
- Alberts B. Johnson A. Lewis J. Raff M. Roberts K. e Walter P. (2002), “Molecular Biology of the Cell”, 4ª edition, *Garland Science*, New York, p.1640.
- Ali S.A., Zhong S.P., Doherty P.J. e Williams D.F. (1993), “Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. 1. Poly(caprolactone)”, *Biomaterials*, **14** (9): 648-56.
- Ames B.N. (1973), “Carcinogens and mutagens: a simple test system combining live homogenates for activation and bacteria for detection”, *Proceedings of the National Academy of Science United States of America*, **70**: 2281-2285.
- An Y.H., Woolf S.K e Friedman R.J (2000), "Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices", *Biomaterials*, **21** (24): 2635-2652.
- Andersson K. e Christ G.J. (2007), “Regenerative Pharmacology”, **7** (2): 79-86.
- Atala A. e Lanza R. (2002), “Methods of Tissue Engineering”, Academic Press, Florida.
- Atala A. (2007), “Engineering tissues, organs and cells”, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **1**: 83–96.
- Barbanti S.H., Zavaglia, C.A.C. e Duek, E.A.R. (2005), “Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos”, *Polímeros: Ciência e tecnologia*, **15**: 13-21.
- Baynes J. e Dominiczak M.K. (2000), “BIOQUÍMICA MÉDICA”, 1ª edição, *Manole*, São Paulo, p. 122.

- Bhatia SK, Arthur SD, Chenault HK, Kodokian GK. (2007), “Interactions of polysaccharide-based tissue adhesives with clinically relevant fibroblast and macrophage cell lines”, *Biotechnol Lett*, **29**: 1645-1649.
- Boccafoschi F. Habermehl J. Vesentini S. e Mantovani D. (2005), “Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering”, *Biomaterials*, **26**: 7410-7417.
- Brondsted H., Hovgaard L. e Simonsen L. (1995), “Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. III. In vitro and in vivo degradation”, *S.T.P. Pharma Sci.*, **5** (1): 60-64.
- Bronzino, J.D. (2006), “The Biomedical Engineering Handbook: Tissue Engineering and Artificial Organs”, 1ª edição, *Taylor & Francis*, USA.
- Bouhadir K.H., Kruger G.M., Lee K.Y. e Mooney D.J. (1999), “Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels”, *Polymer*, **40** (12): 3575-3584.
- Burkitt H.G. Burkitt H. G., Young B. e Heath J. W. (1994), “Wheater Histologia Funcional”, 3ª edição, *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro.
- Burkitt, H. G., Young, B. e Health, J, W. (2000), “Wheater’s functional histology: a text and colours atlas”, Edinburgh.
- Chandra e Rustgi. (1998), “Biodegradable polymers“, *Prog. Polym. Sci.*, **23** (7): 1273-1335.
- Chen T., Embree H.D., Brown E.M., Taylor M.M. e Payne G.F. (2003), “Enzyme-catalyzed gel formation of gelatine and chitosan: potencial for in situ applications”, *Biomaterials*, **24**: 2831-2841.

- Coviello T., Matricardi P., Marianecchi C. e Alhaique F. (2007), “Polysaccharide hydrogels for modified release formulations”, *Journal of Controlled Release*, **119**: 5–24.
- De Llano M.J., Fuertes G., García-Vicent C., Torró I., Fayos J.L. e Lurbe E. (2007), “Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord”, *Translational Research*, **149**: 1-9.
- Denizot Y., Leguyader A., Cornu E., Laskar M., Orsel I., Vincent C. e Nathan N. (2008), “Release of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1(sFlt-1) during coronary artery bypass surgery”, *Journal of Cardiothoracic Surgery*, **2**: 38.
- Di Naro E., Ghezzi F., Raio L., Franchi M. e D'Addario V. (2001), “Umbilical cord morphology and pregnancy outcome”, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **96**: 150-157.
- Edelman E.R. (2008), “Vascular Tissue Engineering: Designer Arteries”, *Circulation Research*, **85**: 1115-1117.
- Elke M., Rolf-Joachim M. e Wolf-Dieter D. (2005), “Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters.” **88**(3): 371-381.
- Falke G.F. e Atala A. (2000), “Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular”, *Arch. argent. Pediatr*, **98** (2): 103.
- Felicity R.A.J. e Oreffo R.O.C. (2002), “Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **292**:1–7.
- Ferdous A., Akaike T. e Maruyama A. (2004), “Inhibition of sequence-specific protein-DNA interaction and restriction endonuclease cleavage via triplex stabilization by poly(L-lysine)-graft-dextran copolymer” *Macromolecules*, **37**: 3239–48.

- Ferreira L., Gil M.H., Cabrita A.M. e Dordick J.S. (2005), “Biocatalytic synthesis of highly ordered degradable dextran-based hydrogels”, *Biomaterials*, **26**: 4707–16.
- Freshney, R.I. (1994), “Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique”, 3ª edição, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York.
- Friess W. (1998), “Collagen – biomaterial for drug delivery”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **45**: 113-136.
- Graça, L.M. e colaboradores (2000), “Medicine Materno Fetal 1”, 2ª edição, *Lidel*, Lisboa.
- Griffith, L.G. (2000), “Polymeric biomaterials”, *Acta Materialia*, **48**: 263-277.
- Gutierrez M., Lopes M.A., Hussain N.S., Cabral A.T., Almeida L. e Santos J.D. (2006), “Substitutos Ósseos” *Arquivos de Medicina*, **19** (4): 153-162.
- Han M., Wen J.K., Zheng B., Cheng Y. e Zhang C. (2006), “Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells”, *Am J Physiol Cell Physiol*, **291**: 50–58.
- Haines-Butterick L., Rajagopal K., Branco M., Salick D., Rughani R., Pilarz M., Lamm M.S., Pochan D.J. e Schneider J.P. (2007), “Controlling hydrogelation kinetics by peptide design for three-dimensional encapsulation and injectable delivery of cells”, *Proc natl acad sci USA*, **104** (19):7791-6.
- Heydarkhan-Hagvall S., Esguerra M., Helenius G., Söderberg R., Johansson B.R. e Risberg B. (2006), “Production of Extracellular Matrix Components in Tissue-Engineered Blood Vessels”, *Tissue Engineering*, **12** (4): 831-842.

- Heydarkhan-Hagvall S., Helenius G., Johansson B. R., Li J. Y., Mattsson E. e Risber B. (2003), “Co-Culture of Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells Affects Gene Expression of Angiogenic Factors”, *Journal of Cellular Biochemistry*, **89**: 1250-1259.
- Hennink et al. (2004), “Biodegradable dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation for the controlled release of pharmaceutical proteins”, *Int. J. Pharm.*, **277** (2): 99-103.
- Hoenig M.R., Campbell G.R., Rolfe B.E. e Campbell J.H. (2005), “Tissue-Engineered Blood Vessels: Alternative to Autologous Grafts?”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**: 1128-1134.
- Hoffman A.S. (2002), “Hydrogels for biomedical applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**(1):3-12.
- Huhtala A., Pohjonen T., Salminen L., Salminen A., Kaarniranta K. e Uusitalo H. (2007), “In vitro biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from various ocular tissues: direct contact studies”, *J Biomed Mater Res A*. **83** (2): 407-13.
- Infanger M., Grosse J., Westphal K., Leder A., Ulbrich C., Paul M. e Grimm D.(2007), “Vascular endothelial growth factor induces extracellular matrix proteins and osteopontin in the umbilical artery”, *Annals of Vascular Surgery*, **22** (2): 273-84.
- Isenberg B.C., Williams C. e Tranquillo R.T. (2006), ”Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro”, *Circ. Res.*, **98**: 25-35.
- Ishihara M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Uenoyama M., Kikuchi M. e Kurita A. (2002), “Photocrosslinkable chitosan as a dressing wound occlusion and accelerator in healing process”, *Biomaterials*, **23**: 833-40.

- Ito T., Yeo Y., Highley C.B., Bellas E. e Kohane D.S. (2007), “Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions”, *Biomaterials*, **28** (23): 3418-26.
- Jackson W.F. (2000), “Ion channels and vascular tone” *Hypertension*, **35** (part 2): 173-178.
- Kane J.B., Tompkins R.G., Yarmush M.L. e Burke, J.F (1996), “Biomaterials science: an introduction to materials in medicine”, *Academic Press: San Diego*, 360-70.
- Karageorgiou V. e Kaplan D. (2005), “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis”, *Biomaterials*, **26**: 5474-5491.
- Karp J.M. e Langer R. (2007), “Development and therapeutic applications of advanced biomaterials” *Current opinion in biotechnology*, **18**: 454-459.
- Kuby J., Kindt T.J., Osborne B.A. e Goldsby R.A. (2002) “Kuby Immunology” 5ª edição , W. H. Freeman and Company, New York.
- Kulkarni M.L. et al. (2007), “Absence of Wharton's jelly around the umbilical arteries”, *Indian journal of pediatrics*, **74** (8): 787-789.
- Li ST. 1995; “Biologic biomaterials: tissue-derived biomaterials (collagen) ”, *The Biomedical Engineering Handbook*, Bronzino JD (ed.). CRC Press: Boca Raton, FL; 627–647.
- Lieberman J.R., Daluiski A. E Einhorn T.A. (2002), “ The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications”, *J Bone Joint Surg Am*, **84** (6): 1032-44.

- Liu, Y. (1999), “Understanding the Biological Activity of Amyloid Proteins in Vitro: From Inhibited Cellular MTT Reduction to Altered Cellular Cholesterol Homeostasis”, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **23** (3): 377-395.
- Lee, H.B. 1989, “Application of synthetic polymers in implants. In: Frontiers of Macromolecular Science”, *Blackwell Scientific*, 579–584.
- Lee, J., Cuddihy M.J. e Kotov N.A. (2008), “Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art”, *TISSUE ENGINEERING: Part B*, **14** (1): 61- 86.
- Lin, C.C. e Metters, A.T. (2006), “Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modelling”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**: 1379–1408.
- L’Heureux N., Pâquet S., Labbé R., Germain L. e Auger F. A. (1998), “A completely biological tissue-engineered human blood vessel”, *FASEB J.*, **12**: 47-56.
- Ma, Z., Mao Z. e Gao C. (2007), “Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **60**: 137–157.
- Maia J., Ferreira L., Carvalho R., Ramos M. A. and Gil M. H. (2005), “Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels”, *Polymer*, **46** (23): 9604-9614.
- Malkowski A., Sobolewski K., Jaworski S. e Bankowski E. (2007) “FGF binding by extracellular matrix components of Wharton’s jelly”, *Acta Biochimica Polonica*, **54** (2):357-63.
- Marques, A.P., Reis R.L. e Hunt J.A. (2002), “The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies”, *Biomaterials*, **23** (6): 1471-8.

- Mather J. P. e Roberts P. E. (1998), “Introduction to cell and tissue culture: Theory and Technique”, *Plenum Press*, New York.
- Mehvar R. (2000), “Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents”, *J control Release* **69** (1):1-25.
- McCulloch, I. e Shalaby, S.W. (1998), “Tailored polymeric materials for controlled delivery systems”, *American Chemical Society*: Washington DC.
- McGlohorn J.B., Holder W.D., Grimes L.W., Thomas C.B. e Burg K.J. (2004), “Evaluation of smooth muscle cell response using two types of porous polylactide scaffolds with differing pore topography”, *Tissue engineering*, **10** : 505.
- Mori H. e Matsuda H. (2005), “Cardiovascular Regeneration Therapies Using TissueEngineering Approaches”, Springer-Verlag Tokyo, p. 234.
- Moore K.L. e Persaud T.V. (2000), “Embriologia Básica”, 5ª edição, *Guanabara Koogan S.A.*, Rio de Janeiro.
- Murphy R. A. (1996), “Mecanismo Contrátil das Células Musculares” In: BERNE, R. M.LEVY. *Fisiologia*, 265 – 274.
- Muschler G.F. Nakamoto C. e Griffith L. G. (2004), “Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering”, *The Journal of Bone & Joint Surgery*, **86**: 1541-1558.
- Nerem R.M. (2000), “Tissue engineering a blood vessel substitute: the role of biomechanics”, *Yonsei Medical Journal*, **41** (6): 735-739.

- Nerem R.M. e Ensley A. E. (2004), “The tissue engineering of blood vessels and the heart”, *American Journal of Transplantation*, **6**: 36-42.
- Patel A., Fine B., Sandig M., Mequanint K. (2006), “Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels”, *Cardiovascular Research*, **71**: 40-49.
- Pauly R.R. Bilato C., Cheng L., Monticone R., e Crow M. T. (1998), “Vascular Smooth Muscle Cell Cultures”, *Methods in cell biology*, **52**: 133-154.
- Park J.B. e Bronzino J.D. (2003), “Biomaterials principles and applications”, CRC PRESS, New York, p. 128.
- Peppas, N.A. (1996), “Hydrogels in: Biomaterials science: an introduction to materials in medicine”, *Academic Press: San Diego*, 60-4.
- Proubasta J., Mur J.G. e Planell J.A. (1997), “Biocompatibilidad, materiales implantables, tipos de implante. In: Fundamentos de Biomecânica y Biomateriales”, 271-350.
- Racliffe A. (2000), “Tissue engineering of vascular grafts”, *Matrix Biology*, **19**: 353-357.
- Raingo, J., Rebolledo, A., Iveli, F., Grassi de Gende, A. O. e Milesi, V. (2004), “Non selective cationic channels (NSCC) in smooth muscle cells from human umbilical arteries”, *Placenta*, **25**: 723-9.
- Raio L., Ghezzi F., Di Naro E., Franchi M., Bolla D. e Schneider H. (2002), “Altered Sonographic Umbilical Cord Morphometry in Early-Onset Preeclampsia”, *The American College of Obstetricians and Gynecologists*, **100** (2): 311-6.

- Santos K.S.C.R., Coelho J.F.J., Ferreira P., Pinto I., Lorenzetti S.G., Ferreira E.I., Higa O.Z. e Gil M.H. (2006), “Synthesis and characterization of membranes obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan”, *International Journal of Pharmaceutics*, **310**: 37-45.
- Sachlos E. e Czernuszka J.T. (2003), “Making tissue engineering scaffolds work”, Review on the application of solid freeform fabrication technology of the production of tissue engineering scaffold”, *European Cells and Materials*, **5**: 29-40.
- Saladin K.S. (2001), “Anatomy & Physiology: the Unity of Form and Function”, 2ª edição, *McGraw-Hill*, USA.
- Seal B.L., Otero T. C. e Panitch A. (2001), “Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration”, *Materials Science and Engineering*, **34**: 147-230.
- Serrano M.C. Pagani R., Vallet-Regi M., Pena J., Ramila A., Izquierdo I. e Portolés M.T. (2004), “In vitro biocompatibility assessment of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts”, *Biomaterials*, **25**: 5603 – 5611.
- Silva G.A., Ducheyne P. e Reis R.L. (2007), “Materials in particulate form for tissue engineering. Basic concepts”, *J. Tissue Eng Regen Med*, **1**: 4-24
- Silver F.H. e Pins G. (1992), “Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix”, *J Long Term Effect Med Implants*, **2** (1): 67–81.
- Sjogren G., Sletten G. e Dahl J.E. (2000), “Cytotoxicity of dental alloys metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay and MTT tests”, *Journal of Prosthetic Dentistry*, **84**: 299-236.

- Snell R.S. (1999), “Anatomia Clínica para estudantes de medicina”, 5ª edição, *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro.
- Sobolewski K., Małkowski A., Bańkowski E. e Jaworski S. (2005), “Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors”, *Placenta*, **26** (10):747-52.
- Solomon, E.P. e Phillips, G. (1987), “Understanding Human Anatomy and Physiology”, Saunders, Boston.
- Spector D., Goldman R. e Leinwand L. (1998), “Cells: A laboratory manual, volume 1 – Culture and Biochemical Analysis of Cells”, *CSHL Press*, USA.
- Stryer, L. (1998), *Biochemistry*, 4ª edição, *W. H. Freeman and Company*, New York.
- Suh H. (2000), “Tissue Restoration, Tissue Engineering and Regenerative Medicine”, *Yonsei Medical Journal*, **41** (6): 681-684.
- Supino R. (1995), “MTT Assays in Methods in Molecular Biology: In Vitro Toxicity Testing Protocols”, *Human Press Inc.*, **43**: 137-149.
- Tessmar J.K. e Göpferich A.M. (2007), “Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**: 274–291.
- Todros, T., Adamson S.L., Guiot C., Bankowski E., Raio L., Di Naro E. e Schneider H. (2002), “Umbilical cord and fetal growth-a workshop report”, *Placenta*, **23**:130-2.
- Van Tomme S.R, Van Steenberg M.J., De Smedt S.C., van Nostrum C.F. e Hennink W.E. (2005), “Self-gelling hydrogels based on oppositely charged dextran microspheres”, *Biomaterials*, **26**: 2129 – 2135.

- Van Tomme S.R. e Hennink W.E. (2007), “Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications”, *Expert Review of Medical Devices*, **4** (2):147-164.
- Van Rigen H. V. M., Van Kempen M. J. A., Analbers L. J. S., Rook M. B., Van Ginneken A. C. G., Daniel D. and Jongsma H. J. (1997), “Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins”, *Am. J. Physiol*, **272**: 117- 130.
- Vande V.B., Mohebbian N. e Wehrbein H. (2006), “Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three-dimensional cell culture”, *European Journal of Orthodontics*, **28**: 426-432.
- Vert M., Li S. e Garreau H. (1992), “New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids”, *Clin Mater*, **10** (1-2):3-8.
- Weng L., Romano A., Rooney J. e Chen W. (2008), “Non-cytotoxic, in situ gelable hydrogels composed of N-carboxyethyl chitosan and oxidized dextran”, *Biomaterials*, **29**: 3905–3913.
- Winn S.R., Uludag H. e Hollinger J.O. (1998), “Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **31** (3- 4): 303-318.
- Weinberg C.B., e Bell E. (1986), “A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells”, *Science*, **231**: 397–400.
- Wu L. e Ding J. (2004), “In vitro degradation of three-dimensional porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering”, *Biomaterial*, **25** (27): 5821-30.
- Zhang S. (1999), “An atlas of histology”, *Springer*, New York.