

I) Objectivo

O objectivo do presente trabalho de investigação foi avaliar a adesão e viabilidade celular em hidrogéis baseados no dextrano oxidado ligado com AAD e/ou gelatina, de forma a verificar se este biomaterial é biocompatível para criar por engenharia de tecidos um vaso sanguíneo substituto. Na produção de vasos substitutos é necessária a incorporação exterior de células do músculo liso e a incorporação interior de células endoteliais numa estrutura tridimensional de modo a estabelecer a arquitectura de um vaso sanguíneo nativo.

A adesão e a viabilidade celular na presença dos hidrogéis foram determinadas com dois tipos diferentes de células: células endoteliais da córnea de coelho e células de músculo liso humanas a partir das artérias de cordões umbilicais pelo ensaio do MTT.

O projecto de investigação tinha também como objectivo isolar células endoteliais humanas a partir das artérias de cordões umbilicais. A caracterização deste tipo de células foi determinada por imunofluorescência.

II) Introdução

1) Engenharia de tecidos versus Medicina Regenerativa

A medicina regenerativa e a engenharia de tecidos são áreas multidisciplinares que envolvem a aplicação de princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida para desenvolver substitutos biológicos que restabelecem, mantêm ou melhorem a função dos tecidos (Atala, 2007; Ma, 2008).

O termo "engenharia de tecido" foi inicialmente introduzido para descrever a tecnologia de formar tecido *in vitro* (Myron, 2006). Mais recentemente o termo "medicina regenerativa" foi usado para descrever o desenvolvimento de tecnologias e procedimentos cirúrgicos para a regeneração de tecido *in vivo* (Myron, 2006). Há vantagens e desvantagens para ambas as estratégias. A síntese de tecido *in vitro* têm como vantagem a capacidade de examinar como o tecido se forma e estabelece as funções antes de ser implantado, e como desvantagem a ausência de um ambiente fisiológico mecânico durante a formação dos tecidos. *In vivo*, existe a vantagem da presença de um ambiente fisiológico na formação dos tecidos, no entanto estes podem ser rejeitados pelo sistema imunitário ou degradados pelas forças mecânicas que normalmente agem no local antes do tecido ser incorporado completamente (Myron, 2006).

Os dois componentes fundamentais para formar tecidos são as células e a matriz extracelular (Myron, 2006). As células são a chave para a regeneração e reparação dos tecidos, devido à sua proliferação e diferenciação, sinalização célula-célula, produção e deposição de componentes da matriz extracelular (Heydarkhan-Hagvall *et al*, 2006). A matriz extracelular é constituída por diferentes moléculas sintetizadas pelas células: fibras (colagénio e elastina), glicoproteínas adesivas (fibronectina e laminina) e proteoglicanos que ajudam no suporte físico das células e tecidos, promovendo uma barreira permeável entre os compartimentos dos tecidos (Rosso *et al.*, 2004). As moléculas da matriz extracelular têm diversos domínios e regiões funcionais, incluindo aqueles envolvidos na adesão celular assim como as regiões que interagem com outras moléculas da matriz extracelular ou com factores de crescimento (Griffith, 2000).

Um aspecto importante na engenharia dos tecidos é a investigação das interacções da célula-matriz. As respostas da célula a estas interacções incluem a proliferação celular e a biossíntese de moléculas da matriz. O biomaterial serve como

análogo da matriz do tecido regenerado, proporcionando às células um suporte mecânico e físico, de modo a mantê-las na orientação desejada (Myron, 2006).

Na adesão celular aos biomateriais, após a implantação de um biomaterial num sistema vivo, ocorre o revestimento da superfície do material com uma camada de proteínas (Ratner, 2006; Atala, 2007). A adesão celular aos biomateriais é mediada por receptores da membrana citoplasmática, que interactivam com proteínas e outros ligandos (provenientes do plasma ou de outros fluídos) que adsorvem/aderem à superfície do material (Ratner, 2006). A família das integrinas é o receptor mais comum que medeia a adesão celular à matriz extracelular e interage especificamente com o epitopo Arg-Gly-Asp (RGD) (Rosso *et al.*, 2004). A interacção da proteína com o biomaterial modula e inicia a adesão celular e desencadeia a resposta por parte do hospedeiro (Rehfeldt *et al.*, 2007).

Após implantação do biomaterial, as células podem aderir ao implante, podem libertar moléculas metabolicamente activas, recrutar outras células, aumentar de tamanho, replicarem-se ou morrer (Anderson *et al.*, 2008). A resposta da célula (por exemplo, proliferação ou expressão de gene) é modelada pela interacção entre a célula e a matriz extracelular, sendo esta interacção afectada pelas propriedades físicas e pela presença de ligandos de adesão na matriz, por forças físicas e factores solúveis celulares (citocinas, factores de crescimento) e sinais de outras células (figura 1) (Huebsch e Mooney, 2007).

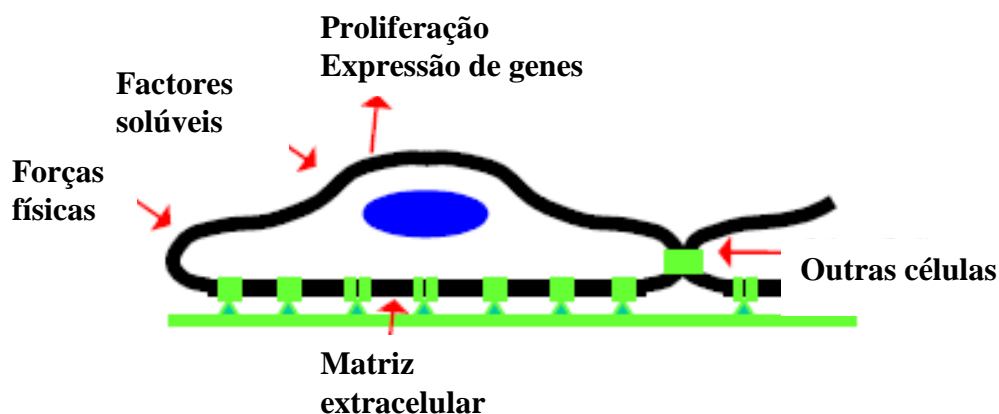


Figura 1 – Diferentes factores que afectam a morfologia da célula (Huebsch e Mooney, 2007).

A superfície do biomaterial pode conter informação química e estrutural que controla formação do tecido, de uma forma semelhante à comunicação celular (célula-célula) que ocorre durante o desenvolvimento embrionário (Ratner, 2006). Actualmente,

em engenharia de tecidos aplicam-se biomateriais com superfícies desenhadas para estimularem reacções precisas com proteínas e células ao nível molecular (Ratner, 2006). Através de uma criteriosa selecção de ligandos, as superfícies podem ser desenhadas para reduzirem a adesão de proteínas e células, prevenirem a coagulação sanguínea, incentivarem a adesão de células endoteliais e a sua retenção e promoverem a produção de capilares (Ratner, 2006). Este princípio está na base do desenvolvimento de biomateriais que possam ser adicionados às células *in vitro* para posterior implantação no hospedeiro ou para atrair determinado tipo de células *in vivo* (Ratner, 2006). Pela combinação adequada entre os biomateriais e as células procuram-se soluções para vários problemas clínicos que só são tratados adequadamente pelo uso de dispositivos de substituição. As investigações das interacções biomaterial-célula *in vitro* oferecem a possibilidade de descobrir o comportamento biológico da célula quando elas crescem dentro do tecido tridimensional, a oportunidade para modificar a composição e a estrutura do biomaterial e melhorar os resultados *in vivo* (Myron, 2006).

Uma das estratégias aplicadas na engenharia dos tecidos envolve a expansão de células humanas *in vitro* em estruturas tridimensionais biodegradáveis e biocompatíveis (Hutmacher *et al.*, 2007). Essas estruturas formam um veículo de distribuição de células num local de implante onde é necessário a formação de um novo tecido, tendo como finalidade acomodar e dirigir o crescimento e a proliferação de novas células a três dimensões (Muschler *et al.*, 2004). A produção de uma estrutura tridimensional a partir de materiais naturais, sintéticos ou semi-sintéticos, fornece assim um suporte para a proliferação celular (Hutmacher *et al.*, 2007).

A produção de uma estrutura tridimensional deve obedecer a vários requisitos: 1) possuir poros de tamanho apropriada de modo a acomodar as células, favorecer a vascularização e permitir o fornecimento de oxigénio e nutrientes no interior da estrutura tridimensional; 2) o material utilizado tem que ser biodegradável, no entanto a sua degradação deve ocorrer a um ritmo apropriado sem que, no entanto, a sua degradação origine subprodutos tóxicos; 3) uma superfície química apropriada que favoreça a adesão, diferenciação e proliferação celular; 4) possuir propriedades mecânicas adequadas ao local pretendido para a implantação; 5) o material não deve induzir resposta adversa; 6) ser facilmente sintetizado em uma variedade de formas e tamanhos (Sachlos *et al.*, 2003a e b).

Um dos avanços tecnológicos mais importantes na engenharia dos tecidos foi a produção de estruturas porosas e absorvíveis. Talvez a primeira aplicação com sucesso

surgiu na implementação de matrizes porosas de colageneo-glicosaminoglicano na regeneração *in vivo* de tecidos da derme (citado em Myron, 2006). Um outro desafio das estruturas tridimensionais é o controlo das propriedades mecânicas ao longo do tempo. Estruturas não degradáveis, como metais e cerâmicas, desempenham uma função excelente e duradoura mas comprometem a função e reparação dos tecidos, uma vez que a permanência do biomaterial no local impede a formação do novo tecido no espaço que este ocupa. Outra limitação está relacionada com o facto de que nem todas as células implantadas sobreviverem, devido à competição entre células pelo oxigénio disponível (Myron, 2006). A morte celular resulta na libertação de produtos resultantes da lise celular e pode aumentar a resposta inflamatória no local de implante. O efeito que os produtos de degradação têm na célula depende da concentração, do efeito que têm em pH local e da toxicidade (Sachlos e Czernuszka, 2003a; Muschler *et al.*, 2004).

Vários processos industriais têm sido estudados para a produção das estruturas tridimensionais, controlando as microestruturas internas que favorecem o transporte de oxigénio e nutrientes no seu interior (Sachlos e Czernuszka, 2003a). A figura 2 representa as células adicionadas à estrutura tridimensional, na qual foi previamente adicionado meio de cultura contendo os nutrientes necessários ao crescimento celular. A arquitectura dessa estrutura tridimensional pode definir a forma do novo tecido (Williams e Sebastine, 2005).

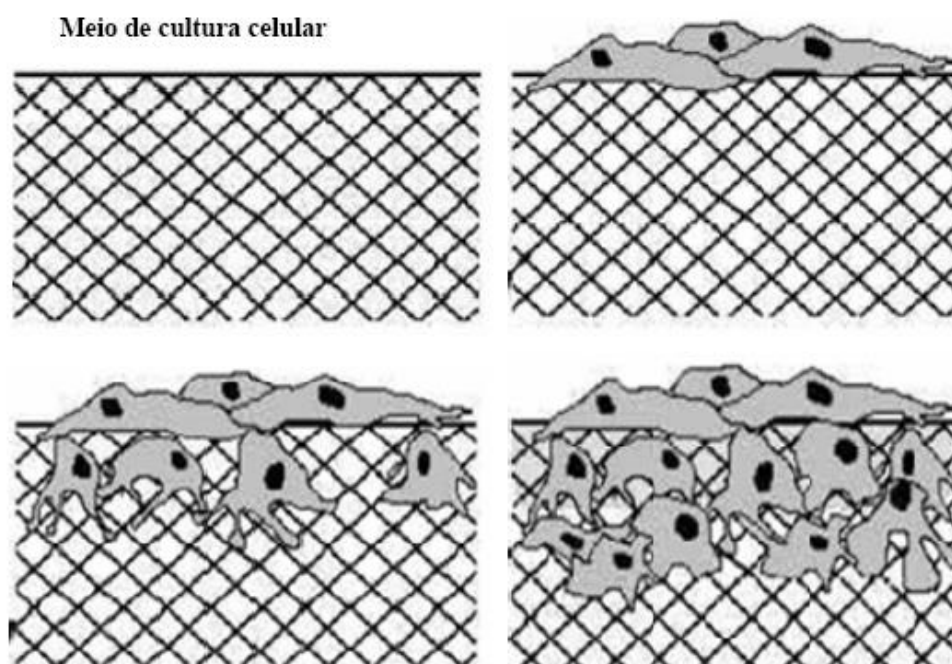


Figura 2 – Adesão e crescimento celular na superfície dos biomateriais (adaptada de Sachlos e Czernuszka, 2003a).

O meio ambiente possui um papel fundamental na remodelação e na regeneração de tecidos. Na engenharia dos tecidos, os bio-reactores são definidos como um meio capaz de criar ambientes propícios à criação de produtos biológicos e são utilizados para oferecer condições semelhantes às do corpo (Martin *et al.*, 2004; Bronzino, 2006).

Embora o restauro e a substituição de tecidos não funcionais tivessem um grande progresso e contribuíssem significativamente para a medicina no século XX, a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa precisam de uma intensa investigação que permita o melhoramento das estruturas tridimensionais, o desenvolvimento de novos bioreactores e a otimização da construção de tecidos artificiais com funções fisiológicas (Williams e Sebastine, 2005; Priya *et al.*, 2008).

1.1) Engenharia de tecidos aplicada aos vasos sanguíneos

Biomateriais poliméricos podem ser usados como substitutos de artérias em doentes com problemas ao nível dos vasos sanguíneos (García-Honduvilla *et al.*, 2008). As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no EUA e mais de 54% das mortes desta doença estão relacionadas com disfunções na artéria coronária (Gao *et al.*, 2008). A engenharia dos tecidos é um promissor avanço para tratar esta doença, combinando princípios da engenharia com a ciência biológica para produzir estruturas viáveis que substituam e reparem as deficiências dos tecidos nativos (Gao *et al.*, 2008).

Presentemente, o tratamento da doença aterosclerose consiste na obtenção de um enxerto da artéria lesada usando uma outra artéria ou veia do paciente (Heydarkhan-Hagvall, *et al.*, 2006). Nos pacientes que não possuem veias disponíveis para enxerto, têm sido utilizados materiais sintéticos, principalmente Dacron e ePTFE (politetrafluoretileno). Estes materiais são 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). Apesar dos enxertos vasculares sintéticos formados por Dacron e por ePTFE terem sucesso em tratamentos de patologias de artérias de grande diâmetro ainda não foram usados com sucesso na substituição de vasos de pequeno diâmetro (Racliffe, 2000).

Em 1986, Weinberg e Bell, conseguiram produzir por engenharia de tecidos o primeiro vaso sanguíneo em Dacron, com células endoteliais, de músculo liso e fibroblastos de bovino. Porém, este modelo não dispunha dos requisitos mecânicos,

nomeadamente da força de tensão necessários para desempenhar correctamente a sua função (citado em L'Heureux *et al*, 1998).

O enxerto vascular ideal seria biocompatível, não-trombogénico e resistente a infecções. A engenharia de tecidos aplicada aos vasos sanguíneos pode oferecer uma redução das limitações nos enxertos de pequenos vasos sanguíneos, ao criar construções viáveis com capacidades de reparação e reconstrução. Nos últimos anos têm sido estudados substitutos de vasos sanguíneos para serem usados em enxertos vasculares em cirurgias *bypass*. Para aumentar o sucesso dos enxertos vasculares, os vasos sanguíneos construídos devem ser feitos de modo a reproduzir as propriedades dos vasos sanguíneos (Heydarkhan-Hagvall *et al*, 2006).

Existem muitas investigações que projectam por engenharia dos tecidos substitutos arteriais de pequeno diâmetro (Jeong *et al.*, 2007). Vários estudos demonstram que para criar um vaso sanguíneo substituto, por 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 3) (Nerem e Ensley, 2004; Jeong *et al.*, 2007). Enxertos arteriais, cada vez mais reproduzem as propriedades dos vasos naturais, incorporam células endoteliais na sua estrutura tridimensional (Rodriguez-Morata *et al.*, 2008).

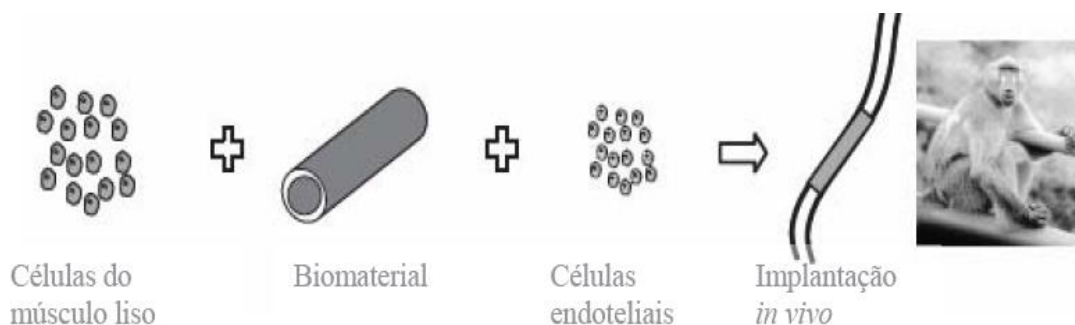


Figura 3 – Criação de um enxerto vascular de pequeno diâmetro. Este esquema demonstra como a combinação de várias estratégias podem ser necessárias para atingir o sucesso (adaptada de Nerem e Ensley, 2004).

Heydarkhan-Hagvall e seus colaboradores, com o intuito de estudar e comparar a matriz extracelular de vasos sanguíneos produzidos artificialmente com a matriz extracelular de vasos sanguíneos nativos, colocaram em crescimento células do músculo liso em contacto com PGA (ácido poliglicólico). 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) (figura 4).

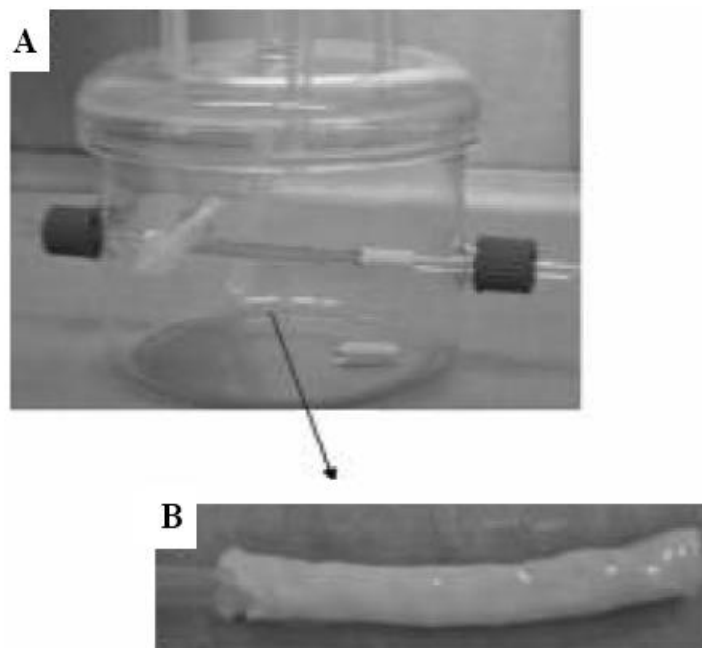


Figura 4 – Produção de vasos sanguíneos *in vitro*. **A)** Bio-reactor utilizado para o fabrico do vaso sanguíneo. **B)** Vaso sanguíneo obtido por engenharia dos tecidos após seis semanas de cultura e da adição de células endoteliais (adaptada de Heydarkhan-Hagvall *et al*, 2006).

O vaso sanguíneo mantinha uma aparência semelhante aos vasos nativos, no entanto, enquanto que as células do músculo liso nos vasos sanguíneos nativos se encontram num estado de quiescência, no vaso obtido por engenharia dos tecidos apresentavam uma rápida proliferação. Foi notória ainda uma baixa expressão de genes que actuam como marcadores específicos de células do músculo liso (Heydarkhan-Hagvall *et al*, 2006).

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). O endotélio vascular é o elemento presente nos vasos sanguíneos normais que promove o efeito não-trombogénico. A molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) é uma molécula importante no recrutamento de monócitos, células da família dos glóbulos brancos com importante papel nas respostas inflamatórias (Nerem, 2000).

2) Biomateriais e suas aplicações

Uma das áreas da engenharia de tecidos é a pesquisa de biomateriais para aplicações médicas, especialmente para cirurgia reconstrutiva (Williams, 2003). Um biomaterial compreende uma substância pura ou composta, de natureza sintética ou natural, que pode ser utilizado temporária ou definitivamente, com finalidade de melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou totalmente um tecido de um modo seguro, económico e fisiologicamente aceitável (Williams, 1987; Ratner *et al.*, 1996). Recentemente, o termo “biomaterial” é utilizado para descrever materiais obtidos de uma fonte biológica ou para descrever materiais usados em terapias de organismos vivos (Griffith *et al.*, 2000). O desempenho de um dispositivo médico é controlado por duas características: a compatibilidade do material dentro do corpo e a capacidade de executar a função apropriada e específica – biocompatibilidade e biofuncionalidade (Rickert *et al.*, 2006).

A biocompatibilidade está relacionada com as interações que acontecem entre o biomaterial e o tecido do corpo. Esta propriedade é definida como a capacidade de um material desempenhar uma função específica no organismo e desencadear uma resposta adequada no hospedeiro sem causar reacções adversas. O biomaterial usado não deve prejudicar os tecidos, órgãos ou sistemas e os produtos de degradação não devem prejudicar e perturbar o sistema biológico (Park e Lakes, 2007). A funcionalidade de um dispositivo médico implica que o biomaterial usado para uma determinada aplicação, mantenha a sua característica por tempo necessário, seja ele temporário ou definitivo (Rickert *et al.*, 2006). O cumprimento destes e de outros requisitos depende das propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas do material (composição, estrutura, estabilidade, a físico-química da superfície, resistência a forças ou pressões às quais será submetido, resistências ao ataque de fluídos fisiológicos e enzimas, entre outras) (Vallet-Regí, 1997).

Os desenvolvimentos na área da ciência dos Materiais, da Medicina e Engenharia permitiram que, a partir da segunda metade do Sec. XX, a ciência dos Biomateriais pudesse revolucionar a utilização criteriosa de polímeros, cerâmicos, compósitos ou metais em implantes, dispositivos médicos, sistemas de libertação de agentes activos e, mais recentemente, em suportes de tecidos humanos (Lee *et al.*, 2008; Kohane e Langer, 2008).

Existem assim polímeros naturais de origem vegetal (celulose, amido) ou animal (colagénio, gelatina, albumina e elastina), e polímeros sintéticos, por exemplo o polimetilmetacrilato (PMMA) e o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) aplicados na reconstrução óssea, polivinil siloxano (PVS) em clínica dentária e polihidroxietilmetacrilato (PHEMA) na produção de lentes de contacto (Seal *et al.*, 2001; Gunatillake e Adhikari, 2003; Atala, 2007).

Os polímeros naturais podem ser utilizados na forma natural ou quimicamente modificados, e as aplicações envolvem substituintes de ligação, hemodiálise, dispositivos de libertação controlada de drogas e implantes biodegradáveis (Jorge-Herrero, 1997). Estes polímeros têm como principal vantagem moléculas na sua constituição que facilitam a adesão, proliferação e diferenciação celular e como desvantagens a dificuldade em controlar a sua degradação pelas diferentes enzimas existentes no organismo (Mano *et al.*, 2007). O polímero natural mais utilizado é o colagénio e pode ser o biomaterial ideal, uma vez que é o componente maioritário da matriz extracelular (Jeong *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Glowacki e Mizuno, 2008).

O uso de polímeros sintéticos na medicina iniciou-se em 1940, estruturas de nylon, PMMA, Dacron poliéster e cloreto de polivinil (PVC) começaram a ser utilizados em cirurgias (Griffith *et al.*, 2000). As cerâmicas foram introduzidas na medicina, especialmente como material de restauro para o sistema esquelético nos anos 60 e apresentavam propriedades com boa estabilidade biológica (citado em Suh, 2000). Desde a utilização do PVC, para restaurar vasos em 1952 que os polímeros sintéticos têm sido considerados como uns dos mais importantes biomateriais na engenharia dos tecidos (Park e Lakes, 2007).

Muitos polímeros sintéticos já disponíveis comercialmente apresentam propriedades mecânicas e físico-químicas comparáveis à dos tecidos biológicos (Gunatillake e Adhikari, 2003). As melhorias nas características de um biomaterial sintético podem ser obtidas pela adição de macromoléculas biológicas. O material resultante deve combinar as propriedades mecânicas adequadas do componente sintético com a biocompatibilidade do componente biológico (Cascone *et al.*, 1995; Sartri e Scandola, 1995).

A procura de novos biomateriais que desempenhem funções específicas sem, no entanto, desencadearem respostas adversas nos hospedeiros constitui um desafio permanente e actual. Os biomateriais degradáveis foram uma das soluções propostas mas, embora possuam vantagens inegáveis, também apresentam alguns problemas

nomeadamente possíveis produtos tóxicos que resultam da sua degradação (Kim *et al.*, 2000).

Existem biomateriais que são produzidos considerando que os seus produtos de degradação poderão ser incorporados nas vias metabólicas normais evitando efeitos secundários no hospedeiro. Habitualmente são usados três termos para descrever a interacção dos materiais com os tecidos: bioinerte, bioreabsorvível/biodegradável e bioactivo. Quando se diz que o material é inerte ou bioinerte significa que o material não apresenta reacção com os tecidos vizinhos, porém essa definição parece ser errónea, pois os tecidos adjacentes ao implante apresentam sempre uma resposta ao biomaterial, por menor que ela seja. A biodegradação, é uma diminuição gradual de quantidade de material mediada por actividade biológica ou bioquímica específicas; bioreabsorção, que é um processo de remoção do material mediada por actividade celular, directamente por fagocitose ou indirectamente por acção enzimática e/ou através de dissolução por difusão iónica continua do material quando colocado em meios biológicos; bioactividade, que é o comportamento do material bioactivo capaz de induzir uma reacção biológica específica, podendo ser integrado no tecido (Ravagliolo e Krajewski, 1992; Hench, 1991;1998).

Na área da medicina, os polímeros biodegradáveis têm sido aplicados para reparar tecidos lesados, válvulas cardíacas e artérias, reconstrução dentária, reconstrução de fracturas ósseas, substituição total ou parcial de órgãos e libertação direccionada de fármacos no organismo, tanto em tecidos alvo (por exemplo directamente em tumores) como na libertação de substâncias por fases (por exemplo insulina, contraceptivos) (Chandra e Rustgi, 1998). Poliésteres como o ácido poliglicólico (PGA), o ácido poliláctico (PLA), a policaprolactona (PCL) e o PLGA são os polímeros biodegradáveis habitualmente utilizados na produção de estruturas tridimensionais para aplicação na engenharia de tecidos. Estes não apresentam toxicidade e os seus produtos de degradação são removidos do corpo humano por vias metabólicas naturais (Kim *et al.*, 2000; Sachlos e Czernuszka, 2003a).

2.1) Biomateriais utilizados no presente estudo

O nome dextrano foi pela primeira vez utilizado em 1874 por Scheibler (citado em Naessens *et al.*, 2005), e define um polissacárido natural e biocompatível que pode ser degradado por acção das dextranases, em diferentes órgãos do corpo humano, incluindo o fígado, rim, cólon e baço (Mehvar, 2000).

O dextrano é um polímero constituído por glicose e tem sido usado clinicamente como agente antitrombótico, para terapia anticoagulante, como um dilatador de volume de protoplasma para prevenir a oclusão vascular (citado em Ito *et al.*, 2007). Os dextranos são também utilizados em suturas cirúrgicas no tratamento de anemias tanto em seres humanos como em animais (Mehavar, 2005). Ito e seus colaboradores sintetizaram uma formulação de hidrogéis injectáveis baseados em dextrano para a prevenção de adesões peritoneais (Ito *et al.*, 2007). Recentemente, começou a ser usado como agente terapêutico para entregar drogas, proteínas ou enzimas nos órgãos onde o dextrano é degradado (Bhatia *et al.*, 2007b).

O grau de oxidação do dextrano é definido como o número de resíduos oxidados por 100 resíduos de glicose (ver figura 5). O dextrano contém um número grande de grupos hidroxilo, que podem ser conjugados facilmente com outras moléculas (Mehvar, 2000)

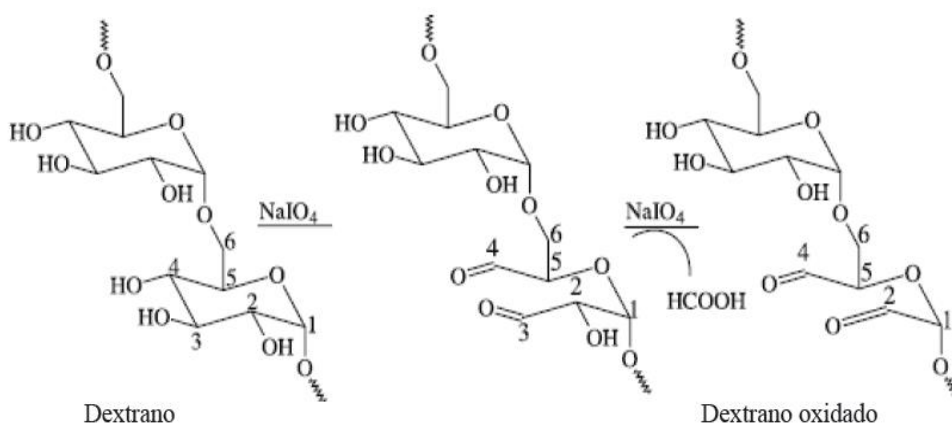


Figura 5 – Oxidação do dextrano por acção do periodato de sódio (adaptado de Maia *et al.*, 2005).

Os hidrogéis de dextrano foram primeiramente produzidos para actuarem como veículos na entrega de fármacos e não como suportes para formar tecidos, pois estes hidrogéis sintetizados possuíam poros muito pequenos para a penetração das células (citado em Lévesque *et al.*, 2005). Recentemente, foi descrito a produção de hidrogéis injectáveis e degradáveis compostos por dexOx e AAD. Os grupos aldeído presentes no dextrano oxidado reagem com o grupo hidrazida da AAD (figura 6) (Maia *et al.*, 2005).

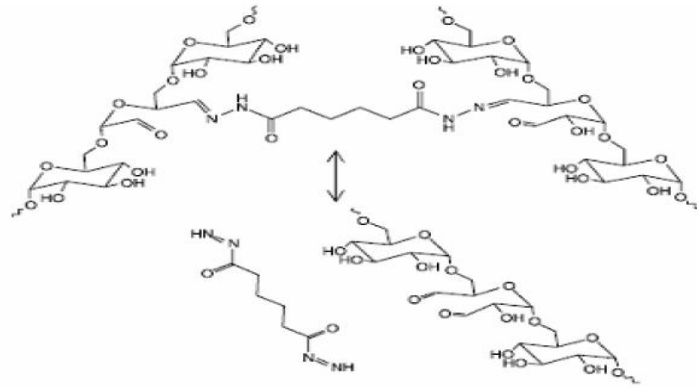


Figura 6 – Reacção entre o dextrano oxidado e a dihidrazida de ácido adípico (adaptado de Maia *et al*, 2005).

Durante a reticulação, o aumento dos poros do dexOx pode contribuir para o crescimento das células no interior deste, contribuindo para uma melhor integração junto das células vizinhas ao local de implante (ver figura 7) (Maia *et al*, 2005).

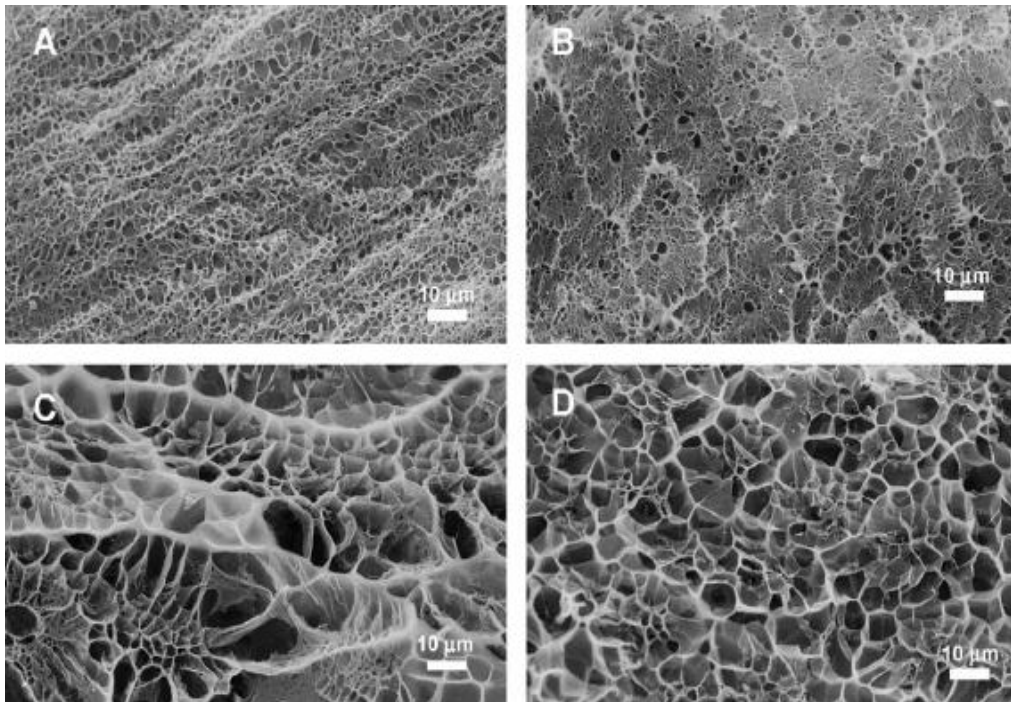


Figura 7 – Imagens de Microscopia electrónica de varrimento (SEM) de dextrano oxidado 15 % e AAD 10 % antes (A) e depois da imersão em PBS após 3 dias (B) após 6 dias (C) e 11 dias (D). É notório o aumento da porosidade (adaptado de Maia *et al*, 2005).

Recentemente, Van Tomme e colaboradores descreveram diferentes estratégias na produção de hidrogéis baseados no dextrano, demonstrando-o que este polímero apresenta uma elevada versatilidade (Van Tomme *et al.*, 2007). Estes hidrogéis são biocompatíveis e biodegradáveis (Ferreira *et al.*, 2002; 2004; 2005; 2007). Weng e colaboradores sintetizaram hidrogéis não citotóxicos de dexOx/N-carboxietil-quitosano capazes de aumentar a cura de feridas transcutâneas em ratos (Weng *et al.*, 2008).

O colagénio (figura 8) é o componente principal da matriz extracelular humana e possui uma superfície que favorece a adesão celular (Mano *et al.*, 2007). É constituído por três cadeias polipeptídicas que se entrelaçam formando uma tripla hélice. As cadeias polipeptídicas têm uma sequência repetitiva de glicina-X-Y, onde X e Y são ocupados por prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Bronzino, 2006; Cen *et al.*, 2008).

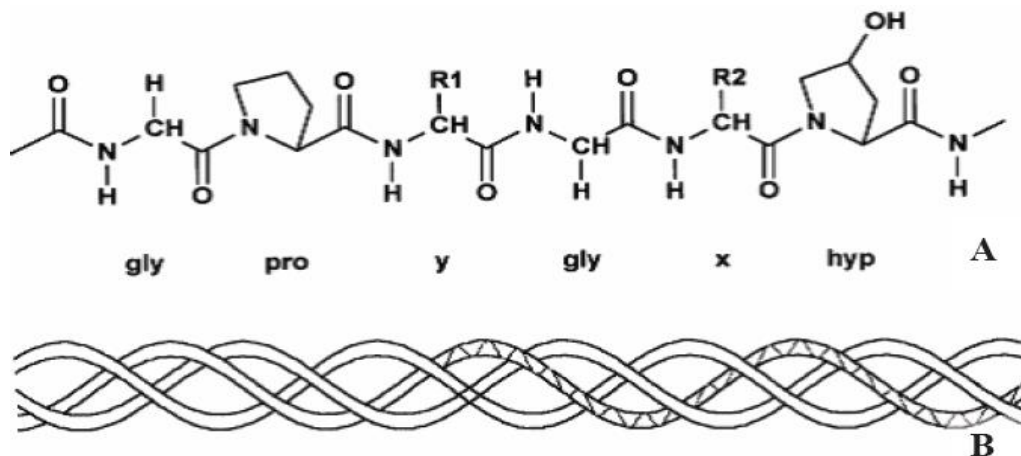


Figura 8 – Estrutura do colagénio tipo I. **A)** Sequência de aminoácidos; **B)** Tripla hélice de colagénio (adaptada de Friess *et al.*, 1998).

A gelatina é um derivado do colagénio, obtido 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 possui utilidade industrial, farmacêutica e biomédica. Embora este polímero não seja encontrado na natureza, a classificação como natural é a mais adequada. Há diversas variedades de gelatina, na qual a sua composição depende da fonte de colagénio e do tratamento hidrolítico usado. Em todos os tipos há um predomínio dos aminoácidos prolina, glicina, ácido glutâmico, hidroxiprolina, alanina, ácido aspártico e arginina (Silva *et al.*, 2007). Tem sido utilizada no revestimento de vários fármacos e na preparação de hidrogéis biodegradáveis (Chandra e Rustgi, 1998). A gelatina tem também vindo a ser usada, na forma de micropartículas, para a incorporação e libertação de fármacos (Chandra e Rustgi, 1998).

A estabilização dos biomateriais baseados em colagénio é necessária para diminuir a susceptibilidade à degradação enzimática. Somente materiais suficientemente estabilizados manterão as propriedades mecânicas requeridas durante o período de implantação desejado (Silva *et al.*, 2007).

2.2) Hidrogéis

Os hidrogéis são polímeros hidrofílicos na forma de rede tridimensional, capazes de reter grande quantidade de água (Cade'e *et al.*, 2000; De Groot *et al.*, 2001; Hiemstra *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2007 e 2008). Estes podem ser quimicamente estáveis ou podem degradar-se (eventualmente desintegrar e dissolver). Para manter estas estruturas, as cadeias poliméricas do hidrogel 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, interações de *Van der Waals*, iónicas e hidrofóbicas (Hoffman *et al.*, 2002; Lin e Metters, 2006). Os hidrogéis derivam de polímeros naturais ou sintéticos que têm sido usados para criar estruturas tridimensionais que suportam e promovem a regeneração dos tecidos (Lévesque *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2007).

O interesse por hidrogéis na área de biomateriais é justificado por algumas vantagens que esses polímeros apresentam: a natureza elastomérica e macia dos hidrogéis minimiza a irritação mecânica causada por fricção aos tecidos (Lin e Metters, 2006). Os hidrogéis são aplicados como componentes fundamentais numa variedade de aplicações terapêuticas. São aplicados como agentes de preenchimento de espaços, como veículos de entrega de moléculas bioactivas e como estruturas tridimensionais que organizam células e apresentam estímulos para dirigir a formação do tecido desejado (Hiemstra *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2007 e 2008). Recentemente, tem sido dada especial atenção ao uso de micro e nanofabricações na entrega de fármacos (Peppas *et al.*, 2000; Drury e Mooney, 2003), na libertação controlada de fármacos, revestimento de superfícies para melhorar a biocompatibilidade e desenvolvimento de músculos artificiais (Lin e Metters, 2006).

3) Testes de citotoxicidade

Aproximadamente há dez anos o Comité Técnico 194 - *International Organization for Standardization* (ISO) e outros grupos desenvolveram um documento conhecido como ISO 10993, que é composto por uma série de normas e padrões que organizam a avaliação biológica de dispositivos médicos (Bhatia e Yetter, 2007a).

Uma das primeiras considerações sobre dispositivos médicos é a sua caracterização, quanto às propriedades físico-químicas, toxicológicas, eléctricas, morfológicas e mecânicas. Dessa forma a caracterização dos biomateriais é claramente identificada como o primeiro passo da avaliação, na qual avaliará o tipo de material, a presença de resíduos, os aditivos e contaminantes, as substâncias nocivas, os produtos de degradação e as características finais do produto (Rogerio *et al.*, 2003).

Várias são as técnicas utilizadas na caracterização dos materiais, análise por espectroscopia de infravermelho, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial e microscopia electrónica de varrimento são alguns exemplos (Rogerio *et al.*, 2003).

Após a realização da caracterização, os testes de viabilidade celular e de citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5) devem ser executados para determinar os efeitos biológicos adversos causados pelos materiais. Normalmente para estes testes são usadas células cultivadas sob condições padrões e colocadas na presença do material. A cultura de células em laboratório apresentam um baixo custo e facilidade de manutenção, podendo ser utilizadas para diferentes estudos principalmente na avaliação da toxicidade de diferentes materiais (Bhatia e Yetter, 2007a).

3.1) Ensaios de biocompatibilidade *in vitro*

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de materiais para o uso em seres humanos, principalmente aqueles para aplicação clínica (Rogerio *et al.*, 2003). A toxicidade envolve a perturbação da homeostase celular que afecta as funções celulares que podem conduzir a uma multiplicidade de mudanças bioquímicas (Park e Lakes, 2007).

O azul de tripano é utilizado para corar as células mortas, assim as células que têm a membrana citoplasmática comprometida permitem a entrada de azul de tripano. A viabilidade celular é avaliada por contagem do número das células num hemocítmetro. Posteriormente, determina-se a percentagem de células viáveis (Doyle e Griffiths, 1998).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com o auxílio do método MTT (3-(4,5-dimethylthiazol 2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Rickert *et al.*, 2006). Este método

revela-se adequado para proceder a esta avaliação e esta descrito nos compêndios oficiais e normas internacionais, apresentando como principais vantagens a sensibilidade, facilidade na execução, reprodutibilidade, além de atender à tendência mundial em suprimir o uso de modelos animais experimentais (Bhatia e Yetter, 2007a).

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria, a formazano (figura 9). A succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs activa nas mitocôndrias de células viáveis, é capaz de transformar o MTT que é de cor amarela em cristais de formazano, que são de cor roxa. Os cristais podem ser observados ao microscópio e posteriormente dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o dimetilsufóxido (DMSO) ou isopropanol, permitindo a sua quantificação através da determinação da absorvância a 570 nm. Somente as células viáveis possuem actividade mitocondrial e consequente viabilidade celular (figura 9) (Doyle e Griffiths, 1998, Serrano *et al.*, 2004).

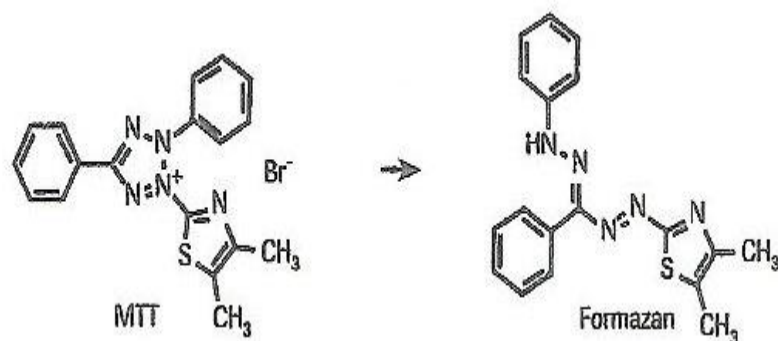


Figura 9 - Estrutura do MTT e do formazano formado por acção da succinato desidrogenase mitocôndrial (*Cell Proliferation KIT 1 (MTT) – roche*).

O MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium é também um ensaio de biocompatibilidade *in vitro* para analisar a viabilidade celular. O MTS na presença de *phenazine methosulfate* (PMS) dá origem à formação de formazano solúvel no meio de cultura de células (figura 10). A quantidade de produto de formazano é medida pela absorvância a 490 nm. Tal como no ensaio do MTT também aqui a quantidade de formazano formado está directamente relacionado com o número de células viáveis na cultura (Wielgus *et al.*, 2007).

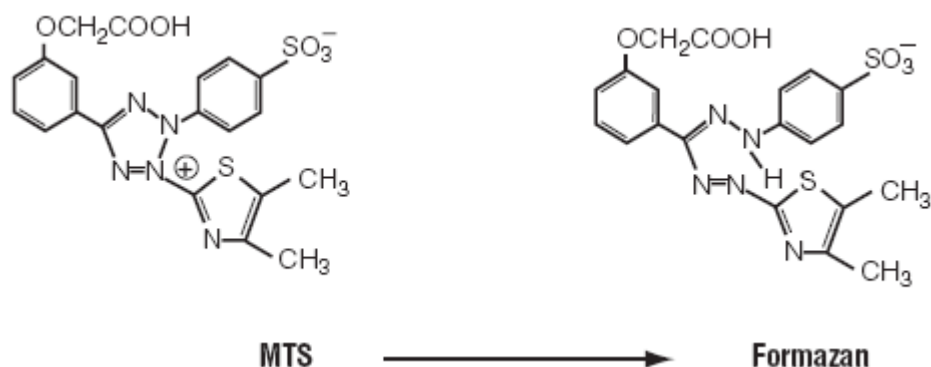


Figura 10 – Estrutura do MTS e do Formazano (*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* – promega).

O teste de citotoxicidade LDH determina os níveis da lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica estável, presente no meio de cultura. Esta enzima faz a conversão de lactato a piruvato, o que leva à produção de NADH. O NADH sintetizado converte o sal de tetrazolio (INT) em formazano (figura 11). A LDH não atravessa livremente a membrana citoplasmática, mas quando a membrana é danificada, a LDH é libertada para o meio circundante (Serrano *et al.*, 2004).

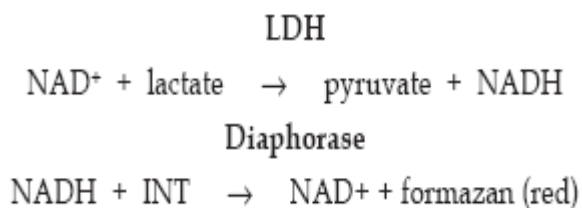


Figura 11– Reacção química da LDH e formação do formazano (*CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*).

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 o método *in vitro* MTT visando agregar informação da biocompatibilidade do dextrano oxidado (dexOx). As culturas celulares CEC (células endoteliais da córnea de coelho) e HUASMC (células humanas de musculo liso das artérias do cordão umbilical humano) foram utilizadas em estudos da biocompatibilidade *in vitro* nos hidrogéis baseados em dextrano com diferentes graus de oxidação reticulado com AAD e/ou gelatina.

4) Morfologia do cordão umbilical

O cordão umbilical é o órgão que durante a gravidez une o feto à placenta. Quando a vida começa é o cordão umbilical, provavelmente, o único órgão que morre. Contudo é uma estrutura vital para o crescimento e bem-estar do feto, sendo essencial para o seu desenvolvimento uma vez que fornece os nutrientes e o oxigênio necessários ao desenvolvimento fetal, através da corrente sanguínea (Di Naro *et al*, 2001; Koblas *et al*, 2005).

Habitualmente, o cordão umbilical tem um comprimento de 30 a 90 cm e um diâmetro de 1 a 2 cm (Moore *et al*, 1994; Gray, 2001). É constituído por duas artérias e uma veia, as quais se encontram envolvidas por um tecido conjuntivo mucóide, conhecido como geleia de Wharton. Os vasos são usualmente tortuosos e dispõem-se em espiral tendo, portanto, um comprimento maior que o próprio cordão (Graça *et al*, 2000) (figura 12).

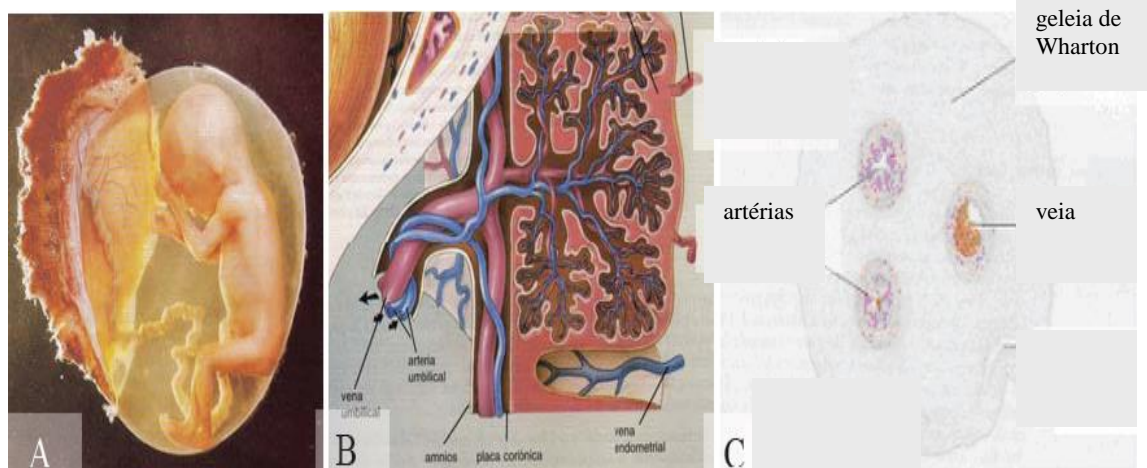


Figura 12 – A) O cordão umbilical (adaptada de Solomon *et al.*, 1987); B) Representação da morfologia do cordão umbilical (adaptada de Moore *et al*, 1994); C) Corte transversal do cordão umbilical (adaptada de Zhang, 1999).

A geleia de Wharton é formada por um baixo número de células e por elevadas quantidade de fibras de colagénio, substância fundamental, fibroblastos, ácido hialurónico e sulfatos de glicosaminoglicanos. Esta pode participar na regulação do fluxo sanguíneo no cordão umbilical e, em alguns casos, a diminuição desta geleia leva a que haja uma redução do crescimento fetal, levando a hipoplasia dos vasos umbilicais (Zhang, 1999).

Vários estudos têm demonstrado que alterações na composição e no metabolismo do cordão umbilical estão frequentemente relacionados com doenças que ocorrem durante a gravidez (restrição do crescimento fetal, diabetes ou dano fetal) ou

durante o parto (distúrbios no coração do feto, perigo fetal, entre outras) (Zhang, 1999). Existem anomalias na constituição do cordão umbilical que se caracterizam pela presença de uma veia e uma única artéria umbilical. Esta situação pode causar a morte intra-uterina ou pós-parto do embrião. A única artéria presente pode, por vezes, ser maior que em casos normais, chegando até a ter um diâmetro semelhante ao da veia umbilical (Di Naro *et al*, 2001).

4.1) Morfologia dos vasos sanguíneos

Os vasos sanguíneos são de três tipos: artérias, veias e capilares. As artérias transportam e distribuem sangue do coração para os diversos tecidos do corpo e as veias transportam o sangue de volta para o coração. Os capilares são vasos microscópios na forma de rede que ligam as arteríolas às vênulas (Snell, 1993; Gray, 2001) (ver figura 13). Com menos músculo que as artérias, as veias são constituídas por paredes mais finas. Muitas veias de tamanho médio, que fazem com que o sangue volte para coração contra a gravidade, têm válvulas permitindo que o fluxo sanguíneo se dê somente em direcção ao coração (Moore e Daley, 2001; Graaff, 2002).

O coração e os vasos sanguíneos formam uma rede de transporte, o sistema circulatório (Moore e Dalley, 2001). A parede dos vasos sanguíneos é constituída por três camadas (figura 13):

- **Túnica externa** (adventícia) é constituída por tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos;

- **Túnica média** é constituída por músculo liso, colagénio e por tecido elástico. O músculo liso é responsável pela vasoconstricção e vasodilatação dos vasos sanguíneos;

- **Túnica interna** (íntima) é a camada mais interna em contacto com o sangue, é constituída por uma camada de células endoteliais (endotélio). O endotélio actua como barreira permeável selectiva de solutos sanguíneos e segrega agentes vasoconstritores/vasodilatadores (Saladin, 2001).

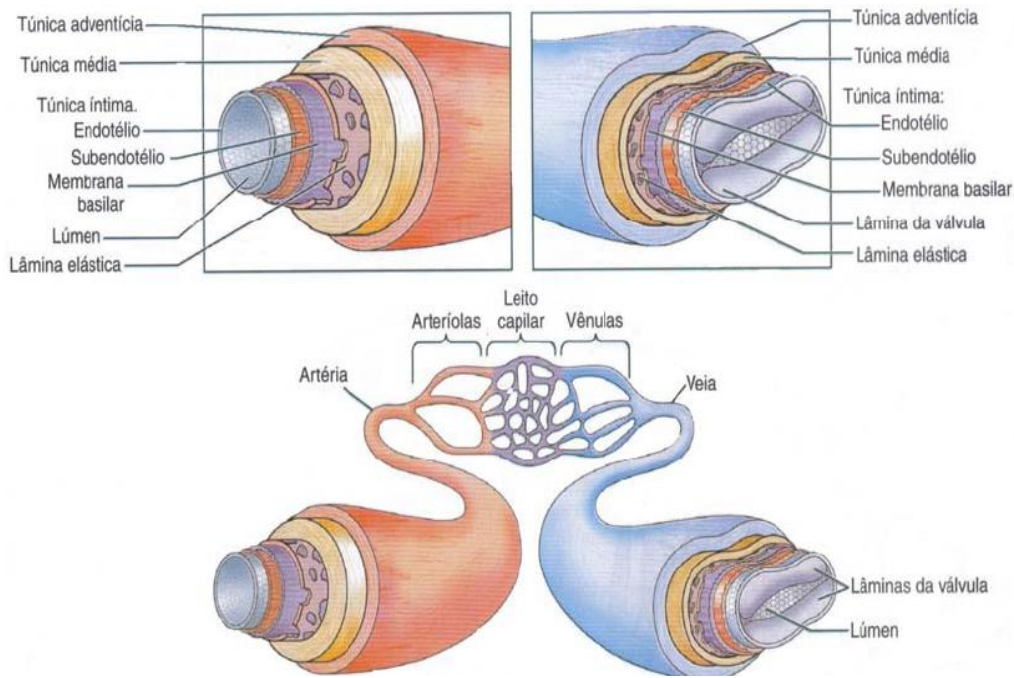


Figura 13 – Representação da estrutura de uma artéria e veia onde se identificam as principais camadas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia (adaptada de Moore e Dalley, 2001).

As artérias umbilicais são mais simples que as restantes artérias do organismo. Estas artérias são rodeadas por uma única e fina camada de células endoteliais achatadas ou cúbicas, não contendo nenhuma camada subendotelial subjacente ou lâmina elástica interna, encontrando-se o endotélio adjacente às camadas musculares. Estas são composta por fibras musculares lisas numa camada longitudinal interna e uma camada circular externa que tem continuação na geleia de Wharton. A veia umbilical tem estrutura semelhante à das artérias umbilicais (Zhang, 1999) (figura 14).

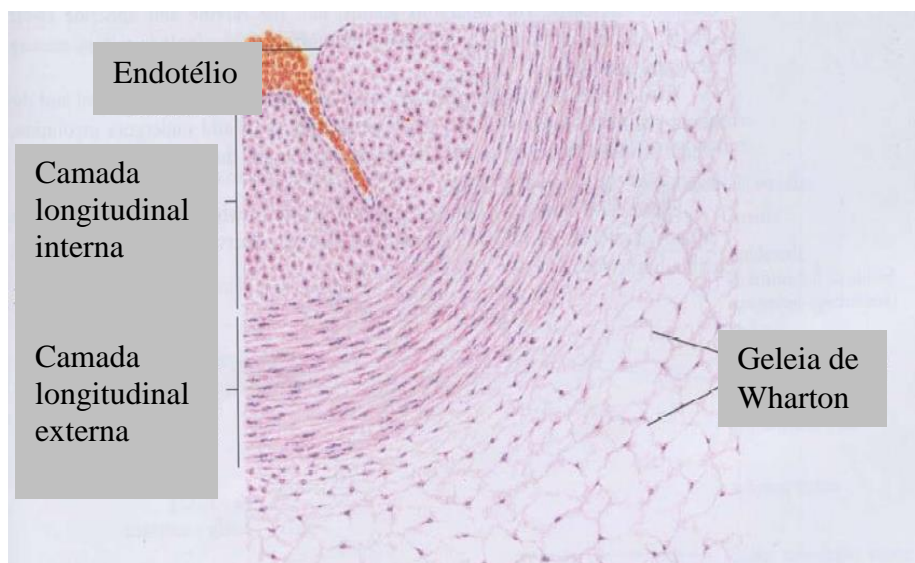


Figura 14 – Esquema parcial da artéria do cordão umbilical mostrando as várias camadas de células que a compõe: endotélio, camada longitudinal interna, camada circular externa e geleia de Wharton (adaptado de Zhang, 1999).

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. A recolha destas amostras biológicas tem que ser autorizada pelas mães dadoras e pela comissão de ética dos hospitais onde as amostras são recolhidas. Das artérias e veias do cordão umbilical podem ser isoladas células endoteliais e células do músculo liso (De Llano *et al*, 2007).

5) Células endoteliais

O endotélio é a camada interna dos vasos sanguíneos e tem um papel indispensável em varias funções biológicas, incluindo o controlo vasomotor, tráfego das células do sangue, balanço hemostático, permeabilidade, sobrevivência e imunidade. É formado por uma única camada de células endoteliais achatadas e de espessura variada que possuem elevada actividade metabólica. A espessura das células endoteliais está compreendida entre menos de 0,1 μm nos capilares e nas veias, e cerca de 1 μm na artéria aorta. A forma destas células varia mas regularmente têm uma forma plana, arredondada ou cúbicas (Aird, 2007).

Normalmente, as células endoteliais são obtidas a partir das veias do cordão umbilical por tratamento enzimático com a colagenase. As artérias do cordão umbilical são menos utilizadas para o isolamento destas células devido ao seu pequeno diâmetro, no entanto o isolamento de células endoteliais a partir das artérias umbilicais também é possível (Shaw, 1996).

Em 1973 e 1974 foi descrito pela primeira vez o isolamento de células endoteliais a partir de veias umbilicais por dois investigadores (Jaffe *et al*, 1973; Shaw, 1996). Jaffe e seus colaboradores, em 1973, isolaram células endoteliais humanas a partir de veias do cordão umbilical. O procedimento não contou com o isolamento das veias. Foi efectuada a perfusão das veias umbilicais com colagenase e após incubação de 15 minutos, a 37° C, foram recolhidas células endoteliais (Jaffe *et al*, 1973). Gimbrone e seus colaboradores, em 1974, isolaram células endoteliais por tratamento das veias umbilicais humanas com colagenase, com incubação de 20 minutos a 37°C. As células apresentavam-se alongadas contendo um núcleo ovóide (ver figura 15). Obteve ainda um segundo tipo de células que identificaram como células do músculo liso (Gimbrone *et al*, 1974).

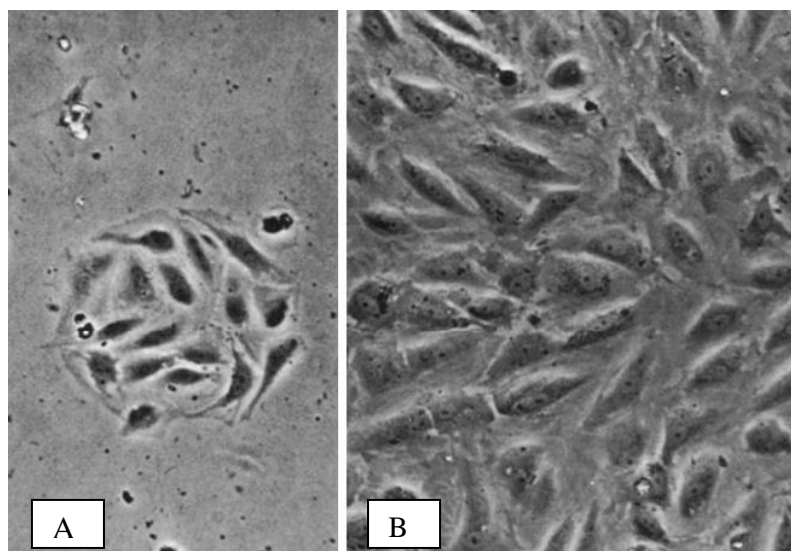


Figura 15 – Células endoteliais após 6 horas (A) e 3 dias (B) em cultura obtidas por Gimbrone e seus colaboradores (Adaptada de Gimbrone *et al.*, 1974)

As células endoteliais em cultura crescem em colónias de células com aparência semelhante à disposição de pedras da calçada (aparência “cobblestone”) e podem ser identificadas com o factor *von Willebrand* (*vW factor*) (De Llano *et al.*, 2007).

6) Cultura de células

O termo cultura de células refere-se as culturas derivadas de células dispersas obtidas de um tecido, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular através da degradação enzimática, mecânica ou química. Em 1940, o desenvolvimento dos meios líquidos e os antibióticos possibilitaram o desenvolvimento de experiências com as culturas de tecidos, impulsionando ampla gama de pesquisas (Freshney, 1987).

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. No entanto, a expansão de células em cultura envolve alguns riscos, nomeadamente contaminações por bactérias, fungos, vírus ou por depleção da capacidade proliferativa do tecido após implantação (citado em 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 com crescimento

rápido e contínuo que podem ser repetidamente subcultivadas por semanas ou meses (Mather e Roberts, 1998).

A cultura de células deve ser realizada dentro de uma câmara de fluxo laminar, pois é a forma mais eficaz de criar um ambiente estéril e todo o material utilizado para cultura de células deve ser esterilizado. A esterilização por autoclave é a técnica mais comum para esterilizar o equipamento da sala de cultura. O material que não pode ser autoclavado, é esterilizado com etanol 70 % ou ultra-violeta (UV). O material que sofre contaminação por resíduos biológicos tem que ser tratado, sendo os métodos mais seguros de tratamento a incineração e a esterilização do material (Spector *et al*, 1998).

Para um metabolismo normal as células necessitam de oxigénio, que é fornecido pelo meio de cultura. Normalmente, o oxigénio apenas é fornecido pelos primeiros milímetros a partir da superfície, logo um excesso de meio de cultura provoca uma inibição da difusão do oxigénio e conseqüentemente um crescimento celular lento. Por outro lado, baixas quantidades de meio podem levar à morte celular por falta de nutrientes. A maioria das culturas celulares são mantidas em crescimento em incubadoras a 37° C com uma atmosfera contendo 5 % de CO₂ (Mather e Roberts, 1998).

As incubadoras humidificadas são uma comum fonte de contaminações pois estas requerem água para promover os níveis de humidificação adequados que pode levar ao crescimento de várias bactérias e fungos, na água colocada no interior ou até nas paredes e tubagem da incubadora. As células em cultura devem ser observadas ao microscópio várias vezes por semana para assegurar que crescem como esperado e para controlar a ausência de contaminações. As culturas contaminadas devem ser imediatamente retiradas da incubadora e eliminadas (Spector *et al*, 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. Diferentes estudos têm sido realizados com o objectivo de demonstrar os efeitos que a superfície à qual as células aderem tem sobre a forma e função destas. Estes factos devem-se em parte aos constituintes da matriz extracelular (por exemplo: colagénio, laminina e fibronectina) (Mather e Roberts, 1998). As moléculas da matriz extracelular têm diversos domínios e regiões funcionais, incluindo aqueles envolvidos na adesão celular e as regiões que interagem com outras moléculas da matriz extracelular ou factores de crescimento (Griffith, 2000). As placas e frascos (*T-flasks*) de cultura podem ser revestidos por proteínas de ligação como laminina ou colagénio. Na matriz extracelular cresce uma monocamada de proteínas de

ligação que permite a aderência celular à superfície. As células quando submetidas a alterações do ambiente de cultura, tais como alterações de pH ou temperatura, podem entrarem em *stress* e conseqüentemente morrer (Spector *et al*, 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) 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). Dois reagentes, glicerol e 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 é adicionado em maior concentração no meio utilizado para congelar as células (Spector *et al*, 1998).

6.1) Meios

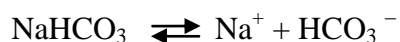
Os meios de cultura são constituídos por aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, glucose e soro. O soro é adicionado à maioria dos meios de cultura como suplemento (fonte de factores de crescimento, hormonas e factores de ligação), no entanto este tem de ser testado para as respectivas células pois pode conter componentes tóxicos para determinadas linhas celulares (Spector *et al*, 1998). Uma cultura de células pode ser suplementada com soro de várias espécies animais, bovino, equino ou soro humano são os mais utilizados (Mather e Roberts, 1998).

O vermelho de fenol é adicionado à maioria dos meios de cultura como indicador de pH e os antibióticos e antimicóticos (Ab) são adicionados para minimizar as contaminações. O pH do meio de cultura da maioria das células varia entre 7,2 e 7,4 (Spector *et al*, 1998). O pH é importante não só para manter o equilíbrio iónico apropriado mas também para manter um correcto funcionamento das enzimas celulares e para uma óptima ligação das hormonas e factores de crescimento aos receptores da superfície celular (Mather e Roberts, 1998).

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 interação do CO₂ libertado pelas células ou pelo ambiente segundo esta equação:



Quando aumentamos a concentração de bicarbonato no meio neutraliza o efeito de CO₂ da seguinte forma:



Elevada concentração de bicarbonato no meio requer uma maior percentagem de CO₂ 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 apenas podem ser abertos dentro de uma câmara de fluxo laminar. Estes são armazenados a 4° C e devem ser aquecidos a 37° C antes da sua adição às células (Spector *et al*, 1998).

6.2) Factores de crescimento

Os factores de crescimento são proteínas utilizadas para acelerar a diferenciação e taxa de crescimento da cultura celular *in vitro*, (Suh, 2000).

O factor de crescimento de fibroblastos-1 (FGF-1), tem cerca de 16 kDa, e é isolado do olho, cérebro e também é 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 músculo liso, células endoteliais vasculares e células da glia (Spector *et al*, 1998).

O factor de crescimento epidérmico (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 (Spector *et al*, 1998).

O factor de crescimento neural (NGF) existe na forma de dímero com 26 kDa e liga a proteínas transportadoras do soro. É isolado na glândula submaxilar. Não é um mitogénico potente mas induz a diferenciação, aumenta a sobrevivência das células neuronais em cultura e previne a perda de neurónios *in vivo* (Spector *et al*, 1998).

A descoberta do factor de crescimento endotelial (ECGF) permitiu melhorar as técnicas de cultura das células endoteliais. Foi demonstrado que a heparina pode aumentar a proliferação destas células na presença de factores de crescimento ECGF e FGF, ligando-se a eles (Marin *et al.*, 2001).

O factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína cujo papel é promover a formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese) para auxiliar no crescimento dos tecidos e órgãos do organismo. É o principal factor de crescimento vascular fundamental para a sobrevivência e proliferação das células endoteliais (Aird, 2007).

7) Imunocitoquímica e Imunofluorescência

A citoquímica é o estudo da organização química celular e dos processos biológicos a nível molecular que se desenrolam no interior das células. É uma área da biologia celular e estrutural dedicada aos métodos de coloração dos tecidos e constituintes celulares, preparando-os não somente com os princípios químicos das reacções de coloração, mas também com os procedimentos protocolares para obtenção de materiais a serem avaliados no microscópio. A imunocitoquímica é o conjunto de técnicas que usam anticorpos para identificar estruturas tecidulares, que funcionam como antígenos, nos tecidos (Polak e Noorden, 2003). Esta identificação ocorre devido a reacções específicas, interacção anticorpo-antígeno permitindo a sua visualização ao microscópio (Owen *et al.*, 2005).

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando fluorocromos que absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda (Storch, 2000). Quando estes estão ligados ou conjugados com um anticorpo, os locais de reacção entre o antígeno e o anticorpo conjugado, podem facilmente ser visualizados num microscópio de imunofluorescência (Owen *et al.*, 2005). Os fluorocromos são assim substâncias capazes de armazenar energia quando excitados por radiação luminosa com um comprimento de onda adequado, e são capazes de emitir esta mesma energia luminosa absorvida, em geral de maior comprimento de onda que a luz excitante. Os fluorocromos devem formar, com o anticorpo, complexos que não alterem a essência da estrutura molecular e

ser estáveis. Os fluorocromos mais utilizados nas técnicas de imunofluorescência são a fluoresceína e a rodamina (Rivitti *et al*, 1990; Storch, 2000).

A combinação da sensibilidade, especificidade e simplicidade torna este método muito útil. A imunofluorescência é a técnica mais comum da microscopia de fluorescência (Mathers e Roberts, 1999)

A localização de antígenos através da utilização de anticorpos fluorescentes foi utilizada pela primeira vez em 1941 por Coons, Creech e Jones (citado em Madeley e Peiris, 2002). Em 1950 Coons e Kaplan introduziram métodos de congelamento, filtros ópticos e sistemas de iluminação especiais para realizar esta técnica. Em 1954, Weller e Coons descreveram a técnica da imunofluorescência. Utilizaram culturas de vírus expostos inicialmente a soros humanos antivírus e a seguir a anticorpos ligados a substâncias fluorescentes. Ainda em 1957, Deacon e Cols descreveram a reacção de fluorescência para sífilis, FTA (*Fluorescent treponemal antibody* (Madeley e Peiris, 2002). Em 1958, Goldwasser e Shepard utilizaram a técnica de imunofluorescência para detectar anticorpos fixadores de complemento utilizando conjugados fluorescentes anticomplementares (Madeley e Peiris, 2002). Desde então, a imunofluorescência assumiu um papel importante na citoquímica, não somente como recurso para detectar estruturas teciduais, mas também como instrumento bastante útil na investigação de doenças (Rivitti *et al*, 1990).

Neste trabalho após o isolamento de células endoteliais das artérias do cordão umbilical humano (HUAEC) pelo método enzimático com colagenase, a presença destas células foi confirmada pela técnica de imunofluorescência. Os marcadores celulares específicos das células endoteliais foram o *von Willibrand (vW factor)* e o *VE-Cadherina (CD144)*. A presença das células HUASMC foi confirmada usando o anticorpo *monoclonal anti-actin, a smooth muscle*.

III) Materiais e métodos

1) Preparação dos frascos para transporte dos cordões umbilicais

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 de recolha continham PSS (solução salina de fosfato) diluído (ver anexo I tabela 2), antiproteases (ver anexo I tabela 5) e antibiótico/antimicótico (AB) (Sigma) (ver anexo I tabela 6). Os frascos foram posteriormente armazenados no frigorífico a 4° C (ver anexo I tabela 16). Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

2) Preparação de placas de cultura revestidas com colagénio

Para revestir as placas de cultura com colagénio (Sigma), colocaram-se 20 µL de solução de colagénio em cada poço da placa de cultura e espalhou-se por toda a sua superfície com a ajuda de um *cell scraper*. A placa foi posteriormente incubada a 37° C até a solução de colagénio estar seca (cerca de 2 horas). A placa revestida com colagénio foi guardada no frigorífico para evitar a degradação do colagénio. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

3) Preparação das placas com biomateriais – hidrogéis baseados no dextrano oxidado.

As placas de 96 poços com os biomateriais foram cedidas por João Maia do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. As mesmas 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. O dextrano oxidado (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 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 poro) escolhidos pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra foram colocadas em placas de 96 poços, nunca excedendo os 60 µL.

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 para cada linha de células, MEM (Minimum Essential medium Eagle) (ver anexo I tabela 9 e10) para as células endoteliais da córnea de coelho (CEC) e DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – F 12) 5% (ver anexo I tabela 12) para as células humanas de musculo liso (hSMC) (ver anexo II figura 1 e 2). As quatro placas foram colocadas em UV durante 30 minutos, antes de serem cultivadas as células.

4) Cultura e crescimento das células endoteliais da córnea de coelho

As CEC foram obtidas como foi descrito anteriormente na literatura (Natu *et al.*, 2007). Posteriormente, as células foram cultivadas em *T-flasks* de 25 cm³ com 20 mL de meio MEM, 10% de FBS (soro fetal bovino), AB suplementado com os factores de crescimento FGF, EGF e NGF (ver anexo I tabela 9 e 10). Os *T-flasks* foram colocados numa incubadora a 37°C com uma atmosfera húmida 5% CO₂. O meio de cultura foi mudado de 3 em 3 dias e a confluência celular foi obtida passados 5-7 dias.

Após a cultura de células estar confluenta, as células foram subcultivadas por tripsinização, tripsina 0,18% (1:250) e 5 mM EDTA (ver ponto 8 dos materiais e métodos). Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar (aura 2000).

5) Isolamento das artérias umbilicais

As artérias foram isoladas a partir dos cordões umbilicais imersos numa solução de PSS diluído e AB, a 4° C (figura 16A e B). A geleia de Wharton foi removida com a ajuda de uma pinça e uma tesoura (figura 16C), o que permitiu isolar as artérias (figura 16D). Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

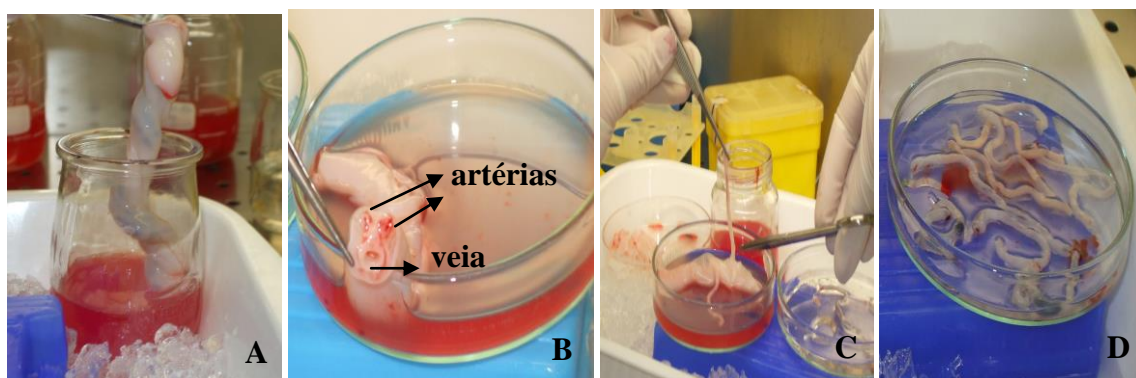


Figura 16 – Método de isolamento das artérias umbilicais. **A)** Cordão umbilical em solução de PSS diluído e AB; **B)** artérias e veia do cordão umbilical; **C)** remoção da geleia de Wharton; **D)** artérias umbilicais.

6) Isolamento de células endoteliais humanas

As células endoteliais humanas foram isoladas de acordo com o método anteriormente descrito na literatura (Van Rigen *et al.*, 1997). As artérias foram entubadas com uma cânula e de seguida fez-se a perfusão com solução de PSS diluído para lavar o sangue e coágulos (figura 17A). Após esta primeira lavagem, fez-se passar meio RPMI 1640 com 10 % de FBS (ver anexo I tabela 14 e 15) nas artérias para as lavar e para ajudar na sua dilatação. Posteriormente, as artérias foram fechadas numa extremidade com uma linha (figura 17B) 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 4) (figura 17C). Foi dado um nó na outra extremidade da artéria para a solução de colagenase permanecer dentro desta (figura 17D). Após incubação com PBS (ver anexo I tabela 3) a 37° C durante 25 minutos num banho com agitação (figura 17E), os nós das artérias são cortados (figura 17F) e as células dissociadas foram recolhidas fazendo passar pelas artérias aproximadamente 0,2 a 0,5 mL (dependendo do tamanho da artéria) de meio

DMEM – F12 com 5 % de FBS (ver anexo I tabela 11) para inibir a actividade da colagenase (figura 17G). Para obter as células dissociadas realizou-se uma centrifugação a 1200 rpm durante 8 minutos (figura 17H), e o sobrenadante foi aspirado.

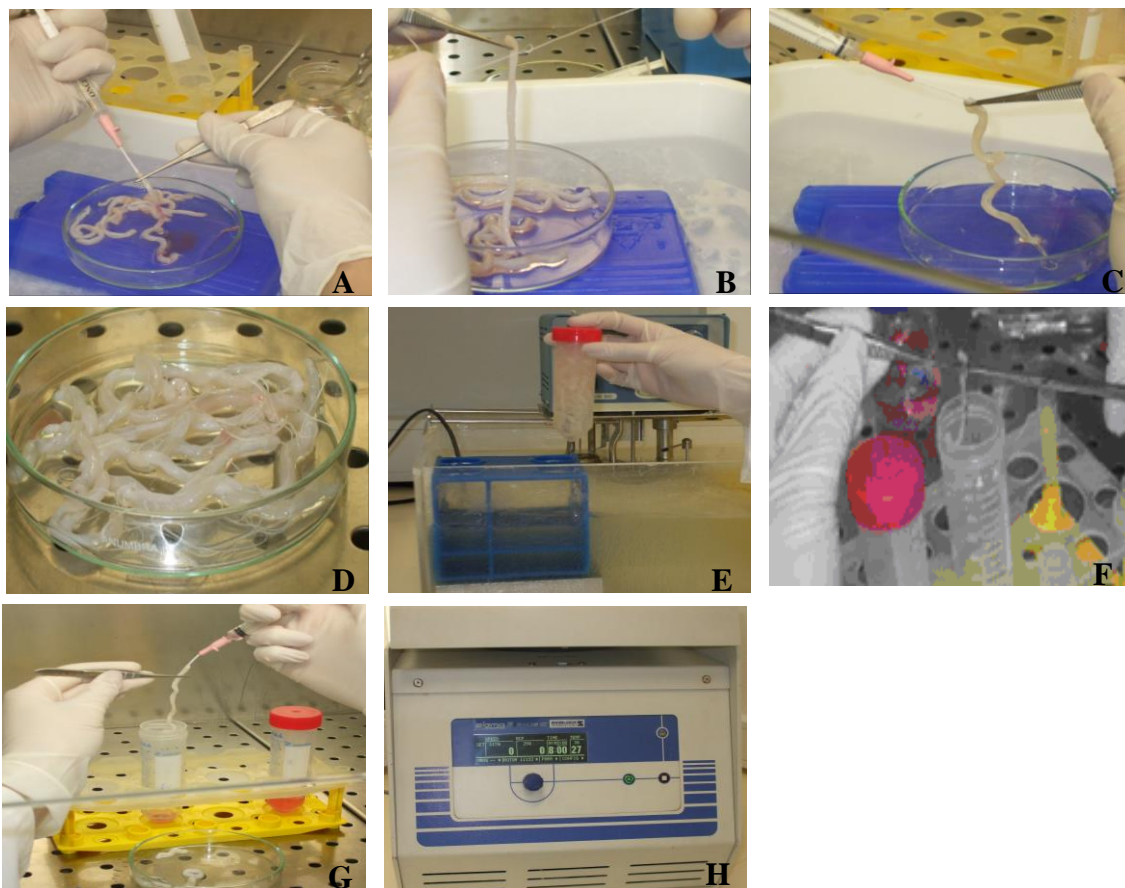


Figura 17 – Isolamento das células endoteliais. **A)** Lavagem das artérias; **B)** Encerramento da extremidade da artéria; **C)** Introdução de colagenase; **D)** Artéria com nós em ambas as extremidades; **E)** Incubação das artérias durante 25 min num banho a 37°C com agitação; **F)** Corte dos nós; **G)** Passagem de meio de cultura DMEM-F12 com 5 % de FBS pela artéria; **H)** Centrifugação a 1200 rpm durante 8 min a 37 °C.

O pellet, após ressuspendido, foi colocado numa placa de cultura revestida com colagénio, com meio DMEM – F12 com 5 % de FBS suplementado com insulina e GSP e AB (ver anexo I tabela 12).

Posteriormente, foram realizados outros estudos em que o pellet foi colocado em placas de cultura revestidas com colagénio utilizando meios de cultura diferentes:

(i) com meio RPMI 1640 com 10 % de FBS com heparina, ECGF (ver anexo I tabela 14 e 15) e AB;

(ii) com meio RPMI 1640 com 20 % de FBS com heparina, ECGF e AB;

- (iii) com meio DMEM-F12 com 5% de FBS com heparina, ECGF e AB;
- (iv) com meio DMEM-F12 com 20% de FBS com heparina, ECGF e AB;
- (v) com meio DMEM-F12 com 20% de FBS suplementado com insulina, GSP e ECGF e AB. Neste estudo, não se passou o meio RPMI pelas artérias e diminuiu-se o tempo de incubação em PBS para 15 minutos.

Após a cultura de células estar confluenta, as células foram subcultivadas por tripsinização, tripsina 0,18% (1:250) e 5 mM EDTA (ver ponto 8 dos materiais e métodos). Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar (aura 2000).

7) Cultura e crescimento dos diferentes tipos de células

O crescimento dos diferentes tipos de células, da córnea de coelho e células humanas, foi feito em incubadoras com atmosfera húmida (Nuair DH Autoflow CO₂ air-jacketed incubator) a 37° C com 95 % ar/5 % CO₂. Os respectivos meios de cultura foram mudados de 3 em 3 dias. Ao meio de cultura foi adicionado AB na proporção de 10 µL de AB para 1 mL de meio. A mudança de meio de cultura foi feita por aspiração do meio e adição de novo meio e AB. O crescimento das células foi acompanhado por observação ao microscópio (Olympus CX41) com ampliação 100x e por fotografias retiradas com uma máquina fotográfica Olympus SP-500 UZ.

8) Tripsinização de células

A tripsinização foi realizada apenas quando as células ocupavam 90 – 95 % da superfície do *T-flask*/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 colocou-se cerca do mesmo volume de tripsina no *T-flask*. Posteriormente, o *T-flask* foi incubado a 37 ° C durante 2 minutos (tempo necessário para as células se soltarem). Após terminar o tempo de incubação observaram-se os *T-flasks* ao microscópio e verificou-se se as células estavam soltas.

Este procedimento foi efectuado no menor tempo possível, pois um tempo excessivo de exposição à tripsina pode matar as células. Imediatamente a seguir adicionou-se meio de cultura, na mesma quantidade de volume utilizado de tripsina,

para parar a reacção de tripsinização. Transferiu-se todo o seu conteúdo (com a ajuda de uma pipeta) para um tubo *falcon*. Realizou-se uma centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente e aspirou-se o sobrenadante. O pellet foi homogeneizado com uma pipeta de pasteur. Uma parte das células obtidas foi subcultivada e procedeu-se à sua adição em *T-flask* ou placas de cultura que continham meio de cultura e AB. A outra parte das células foi armazenada a -80° C. Para tal, o *pellet* foi ressuscitado em meio de cultura em tubos de congelação e adicionou-se DMSO (Fluka) (95 % de meio de cultura e 5 % de DMSO). As células foram colocadas a -20 ° C durante cerca de 2 horas e posteriormente foram armazenadas a -80° C. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

9) Caracterização das células por imunofluorescência

As células endoteliais do isolamento das artérias do cordão umbilical humano (HUAECs), após atingirem confluência celular, foram subcultivadas por tripsinização em placas de 12 poços (passagem 1) (ver ponto 8 dos materiais e métodos).

Seguidamente, colocaram-se lamelas com a ajuda de uma pinça em placas de 12 poços. Estas foram colocadas sob UV durante 30 minutos na câmara de fluxo laminar. De seguida, fez-se o revestimento das placas com o colagénio (ver ponto 2 dos materiais e métodos).

Após atingirem confluência celular, as células foram subcultivadas por tripsinização durante 2 minutos nas placas de 12 poços com lamelas e foram a incubar a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera húmida até atingirem confluência celular (passagem 2).

Aproximadamente após 2/3 dias as células endoteliais humanas atingiram confluência celular, procedendo-se de seguida à sua fixação. Assim, aspirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas 2x com PBS. Posteriormente, adicionaram-se 400 µL de paraformaldeído/PBS 4% durante 20 minutos. Aspirou-se a solução de fixação e lavaram-se 3x as células com PBS. As placas foram revestidas com parafilme e guardadas em PBS a 4°C para posteriormente realizar-se o procedimento de imunofluorescência.

A imunodeteccção do *vW factor* e do CD144 começou na permeabilização das células com 500 µL de Triton X-100 (1% em PBS) durante 5 minutos à temperatura

ambiente. De seguida as células foram lavadas 3x com PBS. No bloqueio, adicionaram-se em cada poço 500 µL de albumina (3% BSA e 0,2% de Tween20) e incubou-se durante 1 hora. Durante este tempo preparam-se os anticorpos primários diluídos em PBS com Tween20 (0,2%): *rabbit anti-human von Willibrand factor polyclonal* (E1); *anti-VE-Cadherin* (E2); *monoclonal anti-human fibroblast* (F) e *monoclonal anti-actin, α smooth muscle* (S) (anexo I tabela 18). Depois da incubação com a solução de bloqueio, aspirou-se a solução e adicionaram-se 200 µL de anticorpo primário diluído.

Após o tempo de incubação de 90 minutos à temperatura ambiente, aspirou-se o anticorpo primário e lavaram-se as células 3x em PBS. Adicionaram-se 50 µL de anticorpo secundário diluído 1:1000 de A₄₈₈ *goat anti-rabbit* conjugado com GFP (*green fluorescent protein*) para a imunodeteção do *vW factor* e CD144 e A₅₄₆ *goat anti-mouse* conjugado com rodamina para a imunodeteção da α -actina e dos fibroblastos. Incubou-se a placa com as células à temperatura ambiente durante 1 hora no escuro. De seguida, as células foram lavadas 3x com PBS em intervalos de 5 minutos.

Após as lavagens, foram preparadas as lâminas, deitando uma pequena gota de meio de montagem. As lamelas foram colocadas sobre as lâminas com a ajuda de duas pinças de modo que as células ficassem em contacto com o meio. O excesso de meio de montagem foi retirado das lâminas e deixaram-se secar no escuro durante 1 hora. De forma a isolar as células foi aplicado verniz em volta de cada lamela e colocaram-se a secar no escuro durante 1 hora. Por fim as lamelas foram guardadas a -20 °C para posterior visualização ao microscópio de fluorescência com o programa *Axion VisionLE 4.6.3* (os reagentes necessários ao procedimento de fixação das células e imunofluorescência encontram-se no anexo I tabela 17 e 18).

10) Estudo da biocompatibilidade do dextrano oxidado: determinação da viabilidade celular pelo ensaio MTT

As células CEC foram subcultivadas numa densidade de 65000 células por poço e as HUASMC subcultivadas numa densidade de 40000 células por poço nas diferentes placas de 96 poços que continham os biomateriais (ver anexo II figura 1 e 2). As placas foram incubadas 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ numa atmosfera húmida.

A biocompatibilidade dos hidrogéis baseados no dexOx foi estudada pelo crescimento e aderência das células após incubação de 24 horas para cada formulação do dexOx. Os resultados foram registados por observação ao microscópio (Olympus CX41) com ampliação 100x e por fotografias retiradas com uma máquina fotográfica Olympus SP-500 UZ.

Após um período de incubação de 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada por determinação da quantidade de reagente MTT que foi reduzido a formazano. Assim, aspirou-se o meio de cultura das placas e adicionaram-se 50 µL de MTT (5 mg/ml em PBS) a cada amostra. As placas foram incubadas durante 4 horas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂. De seguida, o reagente MTT foi aspirado e as culturas de células foram tratadas com 50 µL de isopropanol/HCl (0,04M) por poço, durante 90 minutos no escuro para dissolver os cristais roxos formados. A absorvância foi lida a 570 nm usando a Biorad Microplate Benchmark. O poço que continha células em meio apropriado sem biomateriais foi usado como controlo negativo. Nos controlos positivos, os poços que continha células sem biomateriais, foi adicionado etanol 96%. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, no interior de uma câmara de fluxo laminar.

IV) Resultados e Discussão

1) Placas com biomateriais – hidrogéis baseados no dextrano oxidado

Em consequência do dextrano com diferentes percentagens de oxidação e do dextrano dissolvidos em PBS a temperaturas diferentes sem agitação, obteve-se que perfis de dissolução poderiam ser controlados, não só pela quantidade de AAD (Maia *et al.*, 2005), como também pelo aumento da oxidação (dexOx 40%) (figura 18). Este pode ser um resultado importante se o material tiver êxito numa aplicação biomédica. 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) que são bastante promissores para fins biomédicos (Ferreira *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2008).

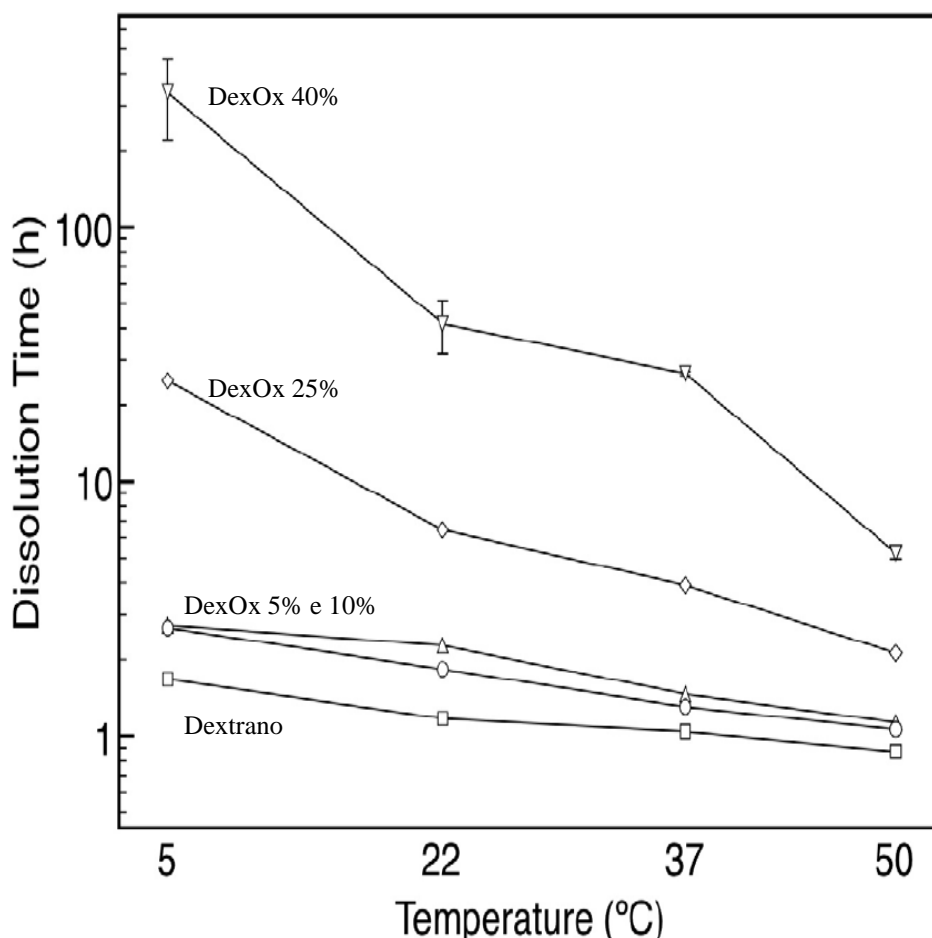


Figura 18 – Tempo de dissolução das amostras do dextrano e dextrano oxidado a 5, 10, 25 e 40% a diferentes temperaturas (gráfico cedido pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra).

As imagens de microscopia electrónica demonstram que existe a tendência decrescente em tamanho de poro com o aumento da concentração de AAD (figura 19).

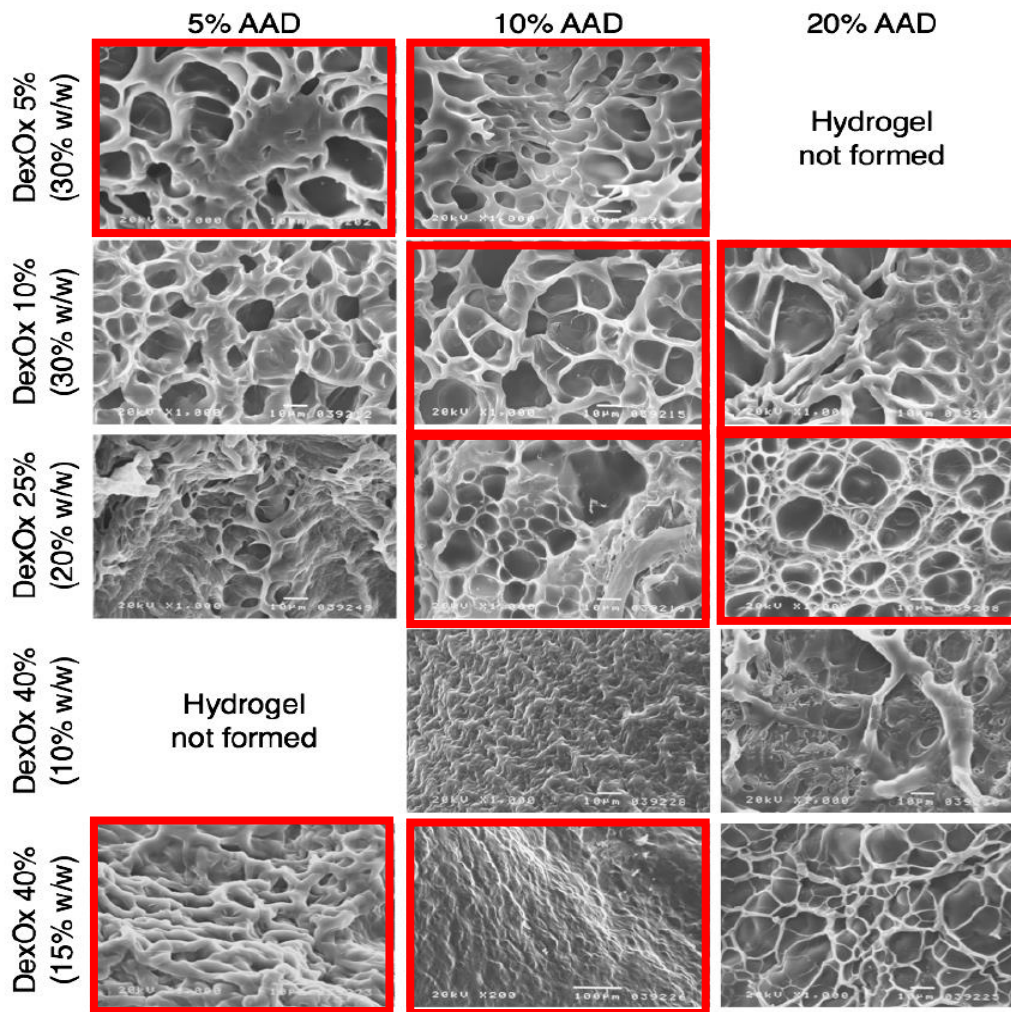


Figura 19 - Imagens de SEM das diferentes formulações do dextrano oxidado (as formulações estudadas no presente trabalho estão marcadas a vermelho) (imagens cedidas pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra).

Nestes hidrogéis baseados no 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) (ver figura 6 da introdução). A hidrofiliicidade/hidrofobicidade é talvez o parâmetro inicial que afecta a absorção das proteínas ao biomaterial (Ma *et al.*, 2007). Os materiais hidrofílicos são melhores a imitar o ambiente aquoso *in vivo* e por essa razão, os hidrogéis formam redes de cadeias de polímeros hidrofílicos (Lee *et al.*, 2008). Os grupos hidroxilo e carboxilo são importantes para adesão e crescimento celular (depende do tipo de células). No entanto, há estudos que revelaram que o bloqueio ou um excesso dos grupos hidroxilo resultam na ausência de adesão celular (Ma *et al.*, 2007).

A reticulação dos hidrogéis baseado no dextrano oxidado com o AAD aumentou a porosidade do dextrano oxidado e contribuiu para o crescimento das células no interior (Maia *et al.*, 2005). A gelatina foi usada como agente de estabilização dos biomateriais para diminuir a susceptibilidade à degradação enzimática (citado em Silva *et al.*, 2007).

2) Isolamento de células endoteliais humanas

Para o isolamento de HUAECs foi testado o método adaptado de um procedimento descrito na literatura (Van Rigen *et al.*, 1997). As células obtidas foram colocadas em cultura em placas de 12 poços com meio de cultura DMEM-F12 com 5% de FBS suplementado com insulina, GSP e AB.

Inicialmente houve algumas contaminações nas culturas de células, contudo, após várias tentativas, foram obtidas células endoteliais (ECs) e células de músculo liso (SMCs) (figura 20A). As ECs cresceram em meio de cultura apropriado às SMCs. A confluência destas células foi atingida após 2 semanas, verificando-se a presença de HUAECs e HUASMCs (figura 20B).

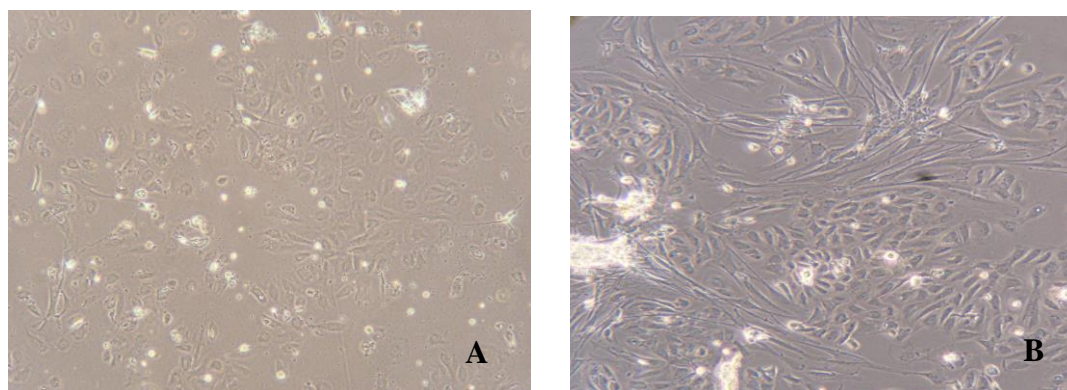


Figura 20 – Células endoteliais e de músculo liso humanas obtidas pelo método adaptado de Van Rigen *et al.*, 1997. Fotos da 1 semana (A) e 2 semanas (B) após o isolamento com ampliação 100x.

Para obter unicamente HUAECs realizaram-se quatro ensaios com diferentes meios de cultura e diferentes concentrações de FBS. Os factores de crescimento usados eram específicos do crescimento de ECs, heparina e ECGF (Van Rigen *et al.*, 1997; Marin *et al.*, 2001). As células obtidas foram colocadas em cultura em placas de 12 poços com:

- (1º) meio de cultura RPMI 1640 com 10 % de FBS com heparina, ECGF e AB;
- (2º) meio de cultura RPMI 1640 com 20 % de FBS com heparina, ECGF e AB;

(3º) meio DMEM-F12 com 5% de FBS com heparina, ECGF e AB;

(4º) meio DMEM-F12 com 20% de FBS com heparina, ECGF e AB.

Nos **dois primeiros ensaios** foram obtidas HUAECs (figura 21A), no entanto soltaram-se após o quarto dia (figura 21B).

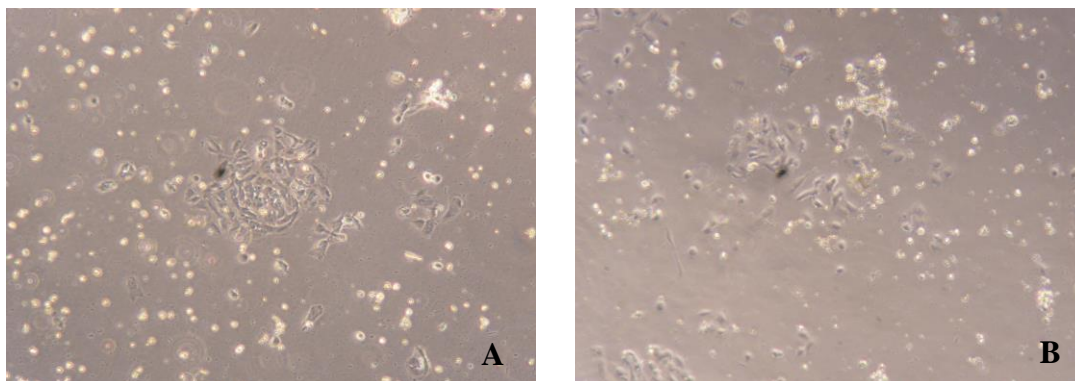


Figura 21 – Células endoteliais humanas obtidas no 1º e 2º ensaio pelo método adaptado de Van Rigen *et al.*, 1997. Fotos obtidas após o 2 dia (A) e o 4 dia (B) do isolamento com ampliação 100x.

No **3º ensaio** foram obtidas HUAECs e HUASMCs (figura 22A). A confluência destas células foi obtida após 2 semanas, período após o qual apenas se observaram HUASMCs (figura 22B).

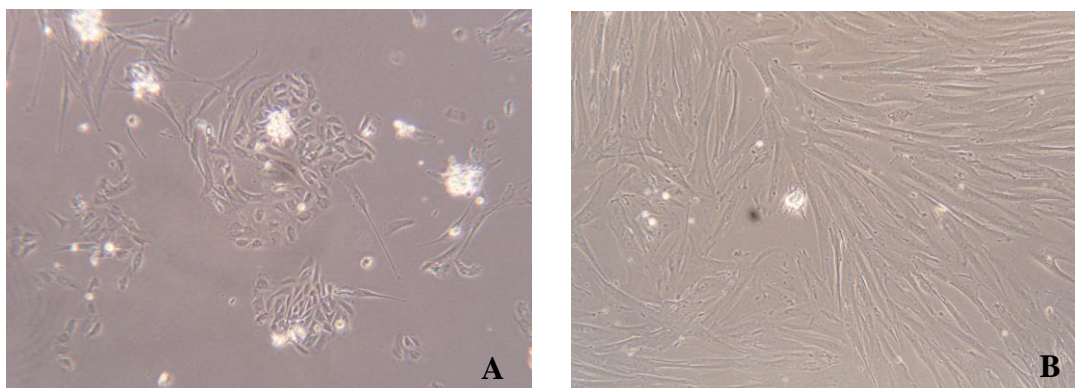


Figura 22 – Células endoteliais e de músculo liso humanas obtidas no 3º ensaio pelo método adaptado de Van Rigen *et al.*, 1997. Fotos do 2 dia (A) e 2 da semana (B) após o isolamento com ampliação 100x.

No **4º ensaio**, foi possível crescer HUAECs e HUASMCs (figura 23A). A confluência destas células foi obtida após 1 semana em que se verificou apenas a presença de HUASMCs (figura 23B).

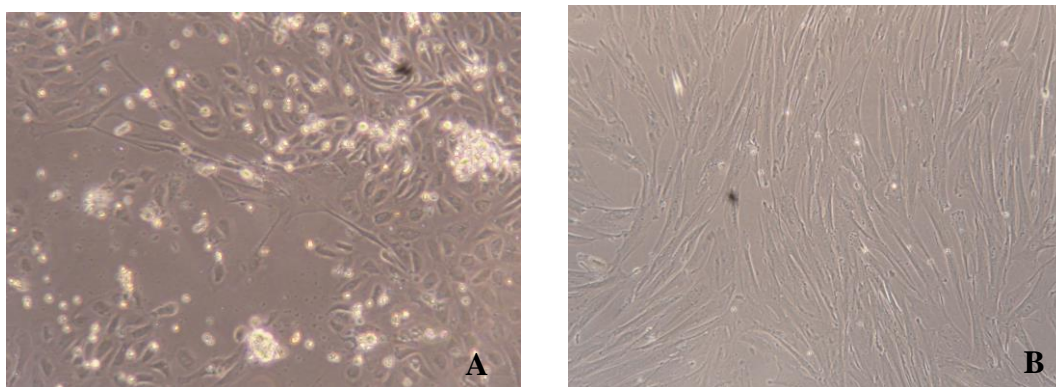


Figura 23 – Células endoteliais e de músculo liso humanas obtidas no 4º ensaio pelo método adaptado de Van Rigen *et al.*, 1997. Fotos do 2 dia (A) e 1 da semana (B) após o isolamento com ampliação 100x.

Após a realização dos quatro ensaios anteriores não foi possível obter HUAECs em confluência. Assim, verificando que as HUAECs cresciam melhor em meio DMEM-F12 suplementado com insulina e GSP, testou-se este meio com 20% de FBS suplementado com novo factor crescimento, o ECGF.

No 5º ensaio efectuaram-se as seguintes variações no método de isolamento das HUAECs: não se passou o meio RPMI pelas artérias e diminuiu-se o tempo de incubação em PBS para 15 minutos (Dunzendorfer *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 2001; Baudin *et al.*, 2007; Crampton *et al.*, 2007; Cheung, 2007).

Neste ensaio cresceram maioritariamente HUAECs (Figura 24A), em que a confluência foi obtida após 1 semana (figura 24B) (tabela 1).

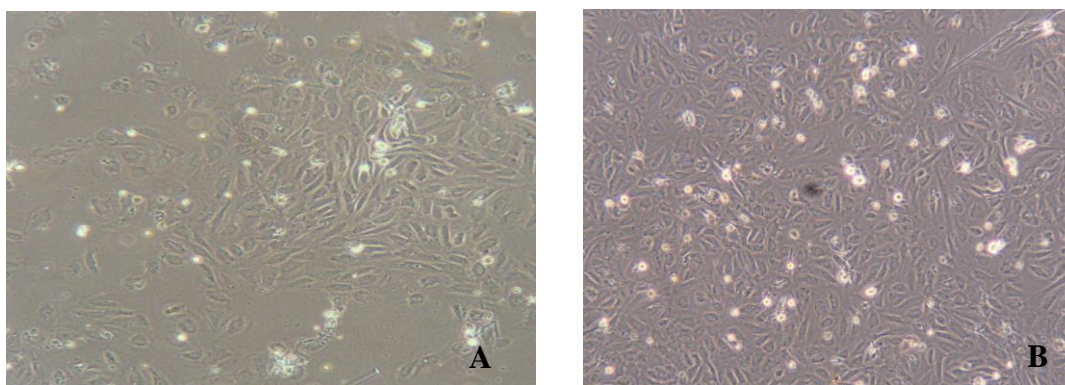


Figura 24 – Células endoteliais humanas obtidas no 5º ensaio pelo método adaptado de Van Rigen *et al.*, 1997. Fotos do 2 dia (A) e 1 da semana (B) após o isolamento com ampliação 100x.

Tabela 1 – Ensaio para o isolamento de células endoteliais humanas.

Ensaio	Meio de cultura, % de FBS e factores de crescimento	Tipo de células			Observações
		2º Dia	em confluência		
			1ª semana	2ª semanas	
Ensaio do ano anterior	DMEM – F12, 5 % de FBS com insulina e GSP	ECs e SMCs	-----	ECs e SMCs	Apresentava células endoteliais e células do músculo liso, após 2 semanas do isolamento.
1º	RPMI 1640, 10 % de FBS com heparina e ECGF	ECs	-----	-----	As células soltaram- se após 4 dias.
2º	RPMI 1640, 20 % de FBS com heparina e ECGF				
3º	DMEM-F12 , 5% de FBS com heparina e ECGF	ECs e SMCs	-----	SMCs	Não se observou a presença de células endoteliais 2 semanas após do isolamento.
4º	DMEM-F12, 20% de FBS com heparina e ECGF	ECs e SMCs	SMCs	-----	Não se observou a presença de células endoteliais 2 semanas após do isolamento.
5º	DMEM-F12, 20% de FBS com insulina e GSP e ECGF	ECs e SMCs	ECs	-----	Não se passou o meio RPMI pelas artérias e diminuiu-se o tempo de incubação em PBS para 15 minutos; Observou-se maioritariamente a presença de células endoteliais após 1 semanas do isolamento.

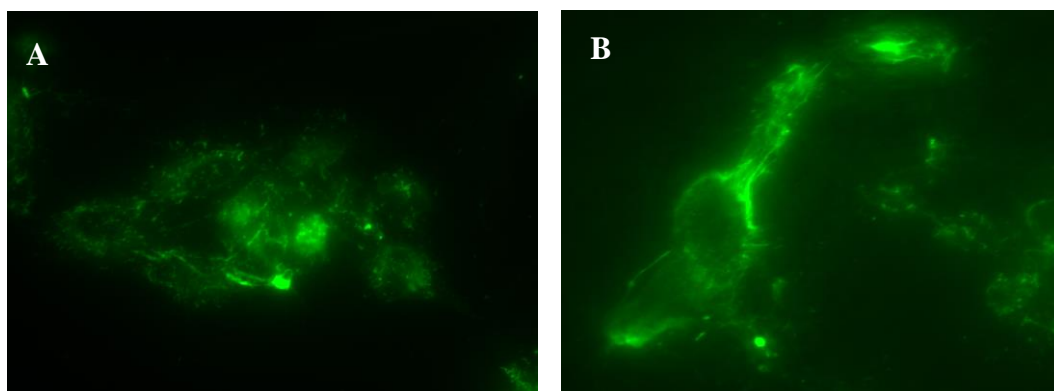
3) Caracterização das células por imunofluorescência

Após o isolamento das artérias do cordão umbilical humano, em adição às características morfológicas das HUAECs observadas ao microscópio óptico (forma plana, arredondada e em cultura crescem em colónias de células com aparência semelhante à disposição de pedras da calçada) (Morgan, 1996; Larrivé e Karsan, 2004), foram usados quatro tipos de anticorpos para controlar o crescimento das HUAEC, HUASMC ou fibroblastos na cultura de células.

A presença das HUAECs foi demonstrada por imunofluorescência usando os anticorpos *rabbit anti-human von Willibrand factor polyclonal* e *anti-VE-Cadherin*. O factor *vW* e o *VE-cadherin* (também designado CD144) são geralmente consideradas moléculas específicas das células endoteliais, pois são sintetizadas por estes tipos de células (Luo e Radice, 2005; De Llano *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2007).

Se o tempo de incubação com a colagenase for muito longo ou se as artérias do cordão umbilical se encontrarem danificadas, a membrana pode ser digerida e o número de células de músculo liso ou fibroblastos aumentarão (Marin *et al.*, 2001). A presença de contaminações de outro tipo de células, HUASMCs e fibroblastos, foi demonstrada por imunofluorescência usando os anticorpos *monoclonal anti-actin α smooth muscle* e *monoclonal anti-human fibroblas*, respectivamente. A actina é uma das duas maiores proteínas do citoesqueleto e as suas isoformas são maioritárias nas SMCs (De Llano *et al.*, 2007).

As culturas de HUAECs analisadas expressaram o factor *vW* (Figura 25A e B) e o CD144 (figura 25C e D).



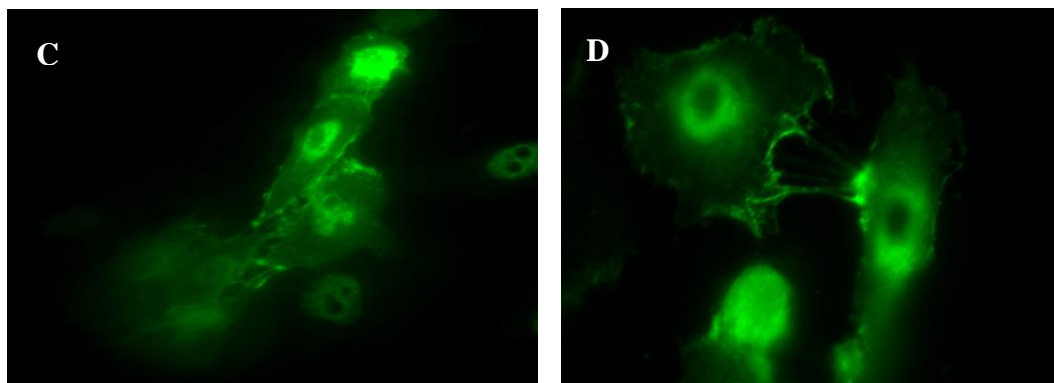


Figura 25 – Caracterização do fenótipo das células humanas endoteliais por imunofluorescência. Expressão do factor vW com ampliação 630x (A) e 1000x (B) e do CD144 com ampliação 630x (C) e 1000x (D).

A presença de HUASMC na cultura de células foi confirmada pela expressão da α -actin observada no microscópio de imunofluorescência (figura 26A e B) ((De Llano *et al.*, 2007).

A não contaminação da cultura de HUAECs por fibroblastos foi confirmada pela ausência de sinal na imunodeteccção dos fibroblastos.

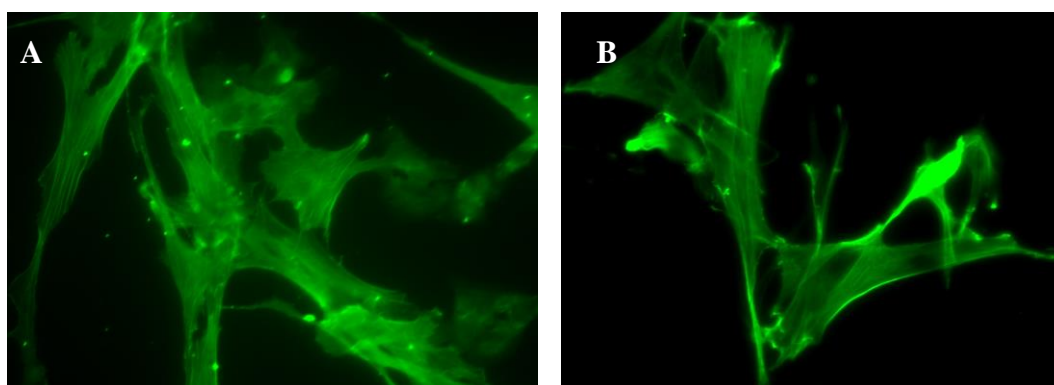


Figura 26 – Caracterização do fenótipo das células humanas de músculo liso por imunofluorescência. Expressão da α -actin com ampliação 630x (A) e 1000x (B).

A presença de HUAECs e HUASMC foi também observada por dupla-marcação na co-localização do factor vW e da α -actin (Figura 27A e B) e o CD144 e da α -actin (figura 27C e D).

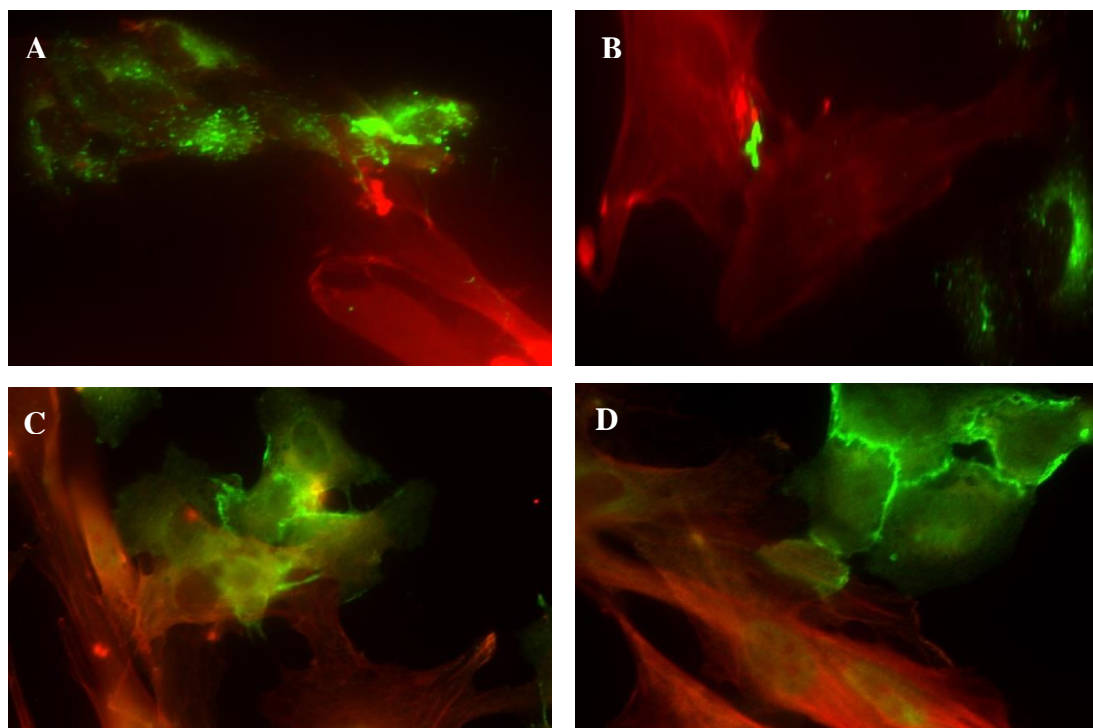


Figura 27 – Fotos de células endoteliais e de músculo liso humanas obtidas por imunofluorescência com dupla marcação. Expressão do factor vW (verde) e da α -actin (vermelho) com ampliação 630x (A) e 1000x (B) e expressão do CD144 (verde) e da α -actin (vermelho) com ampliação 630x (C) e 1000x (D).

4) Estudo da biocompatibilidade do hidrogel baseado em dextrano oxidado: determinação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT

Vários estudos demonstram que para criar um vaso sanguíneo substituto 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 (Nerem e Ensley, 2004). A construção eficiente de substitutos de vasos sanguíneos humanos é fortemente dependente do uso de células endoteliais viáveis e completamente funcionais (Jeong *et al.*, 2007; García-Honduvilla *et al.*, 2008; Rodriguez-Morata *et al.*, 2008) e de células de músculo liso (Buijtenhuijs *et al.*, 2004; Buttafoco *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008). Devido às dificuldades em obter HUAECs a viabilidade celular foi estudada nas CECs e HUASMCs.

As células foram semeadas em diferentes placas de cultura revestidas com os diferentes biomateriais, fornecidos pelo Departamento de Engenharia da Universidade de Coimbra. Foi estudado a biocompatibilidade do hidrogel baseado nas seguintes formulações: dexOx 5, 10, 25 e 40% reticulado com diferentes concentrações de AAD e

/ou gelatina 2% dissolvidos em meio de cultura apropriado para o tipo de células ou em PBS (ver anexo II figura 1 e 2).

i) Determinação da adesão das CEC no biomaterial e da resposta celular à presença do dextrano oxidado

Quando as CECs foram colocadas em placas revestidas com as formulações, preparadas em meio de cultura MEM, **dexOx 5%/ AAD 5%**; **dexOx 5%/ AAD 10%**; **dexOx 5%/ AAD 10%/ Gel 2%** e **dexOx 5%/ Gel 2%** as células aderiram, cresceram e apresentaram confluências em todas as formulações. Nas formulações **dexOx 10%/ AAD 10%** e **DexOx 10%/ AAD 20%** as células aderiram e cresceram e em **dexOx 10%/ AAD 10%/ Gel 2%** e **DexOx 10%/ Gel 2%** as células apresentaram confluência celular. Nas formulações **dexOx 25%** e **40%** as células aderiram e cresceram apenas em **dexOx 25%/ Gel 2%** e **dexOx 40%/ Gel 2%** (figura 28 e tabela 2).

Quando as CECs foram semeadas em placas revestidas com as formulações, preparadas em PBS, **dexOx 5%/ AAD 5%**; **dexOx 5%/ AAD 10%**; **dexOx 5%/ AAD 10%/ Gel 2%** e **dexOx 5%/ Gel 2%** as células aderiram e cresceram apenas nas formulações em que se usou gelatina (sozinha ou reticulada com o AAD). Na formulação **dexOx 5%/ Gel 2%** as células apresentaram confluência celular. Nas formulações **dexOx 10%/ AAD 10%** e **dexOx 10%/ AAD 20%** as células apresentam aglomerados e não se observou adesão e crescimento celular. Nas formulações **dexOx10%** em que se usou a gelatina (sozinha ou reticulada com o AAD) as células aderiram e cresceram apresentando confluência em **dexOx 10%/ Gel 2%**. Nas formulações **dexOx 25%** e **40%** as células aderiram e cresceram apenas em **dexOx 25%/ Gel 2%** e **dexOx 40%/ Gel 2%** (figura 29 e tabela 2).

Quando as CECs foram semeadas em placas revestidas com AAD, Gel 2% e Gel2%/AAD10%, com os materiais preparados em MEM, foi observada escassa adesão celular e fraco crescimento. Nas placas revestidas com AAD, Gel 2% e Gel2%/AAD10%, com os materiais preparados em PBS, observou-se pouca adesão e crescimento celular. Nos materiais preparados em MEM e PBS os controlos positivos não apresentaram crescimento celular e os controlos negativos apresentaram confluência celular (figura 30 e tabela 2).

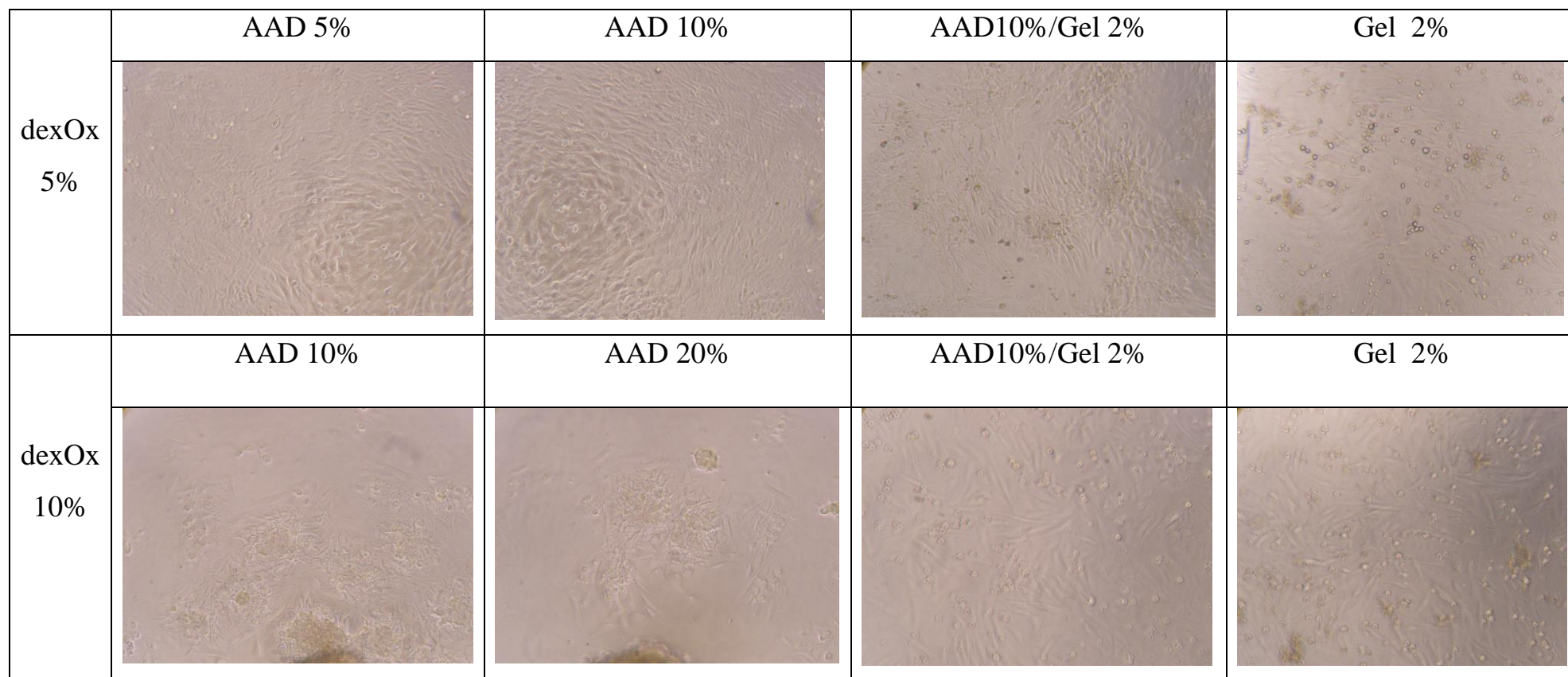
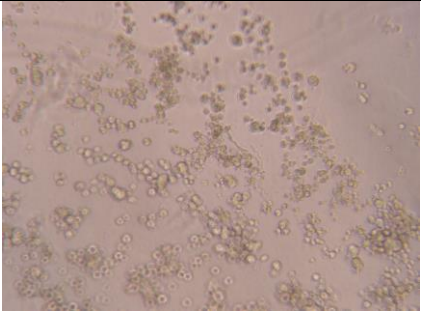
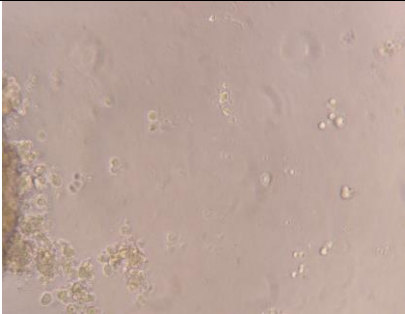
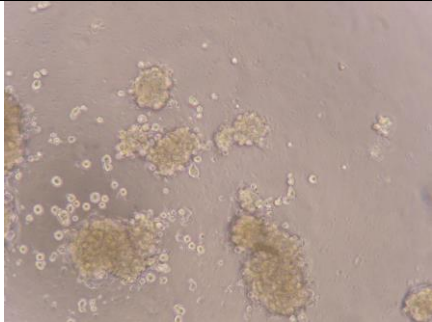
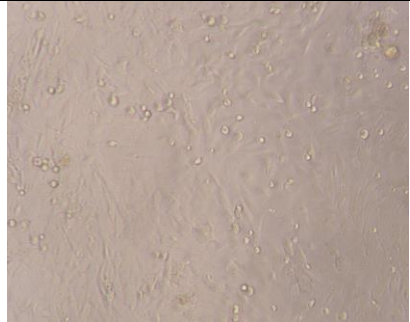
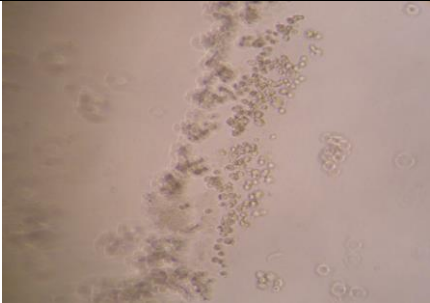
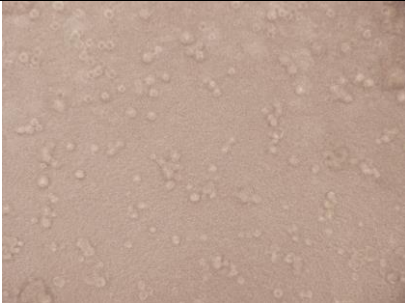
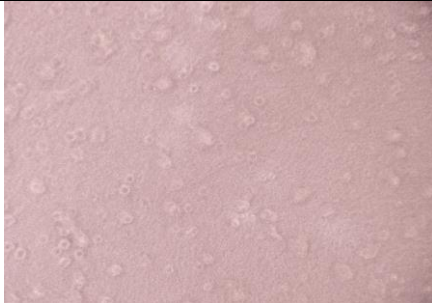
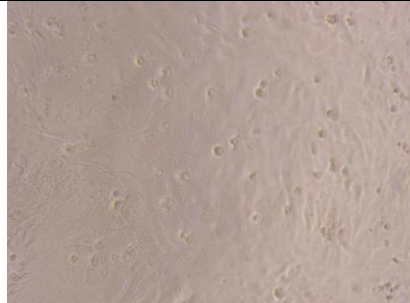


Figura 28 – Fotos das CEC após 24 horas na presença das diferentes formulações de dexOx com ampliação 100x. Materiais preparados por dissolução em MEM.

	AAD 10%	AAD 20%	AAD10%/Gel 2%	Gel 2%
dexOx 25%				
dexOx 40%	AAD 5%	AAD 10%	AAD10%/Gel 2%	Gel 2%
				

Continuação da figura 28 – Fotos das CEC após 24 horas na presença das diferentes formulações de dexOx com ampliação 100x. Materiais preparados por dissolução em MEM

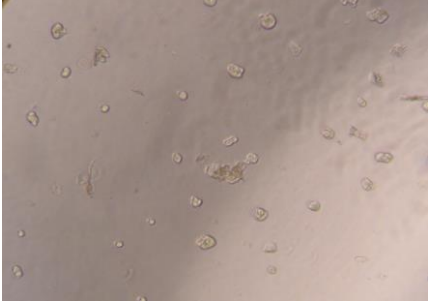
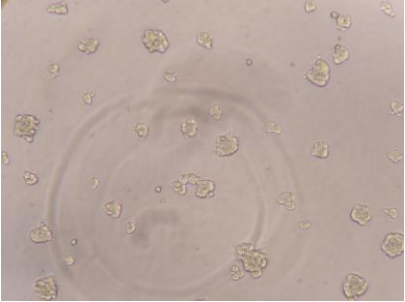
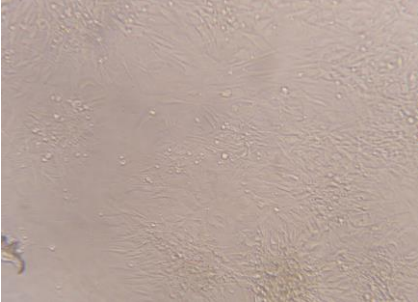


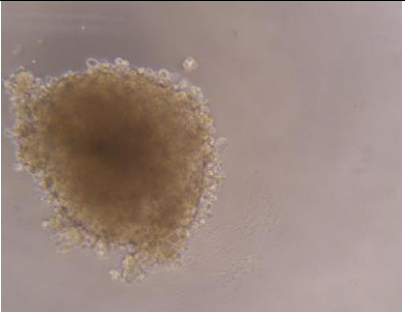
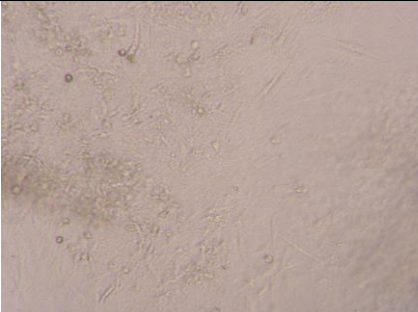
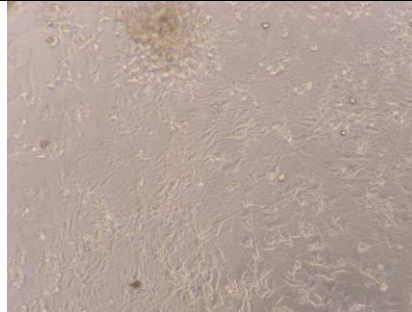
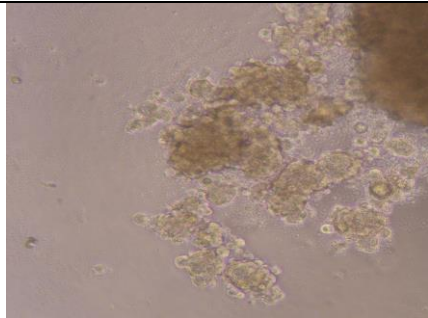
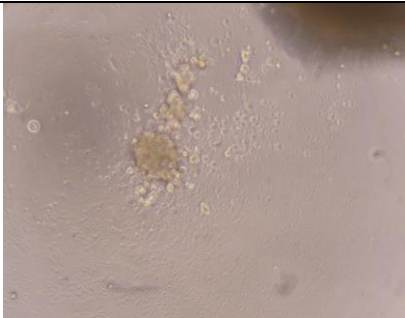

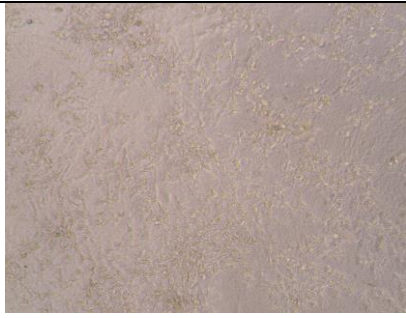

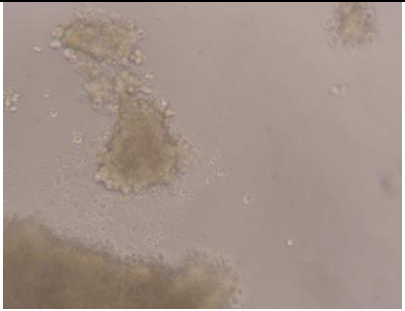
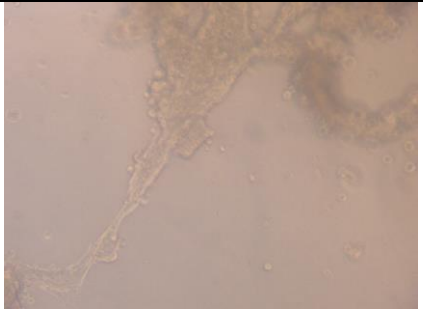
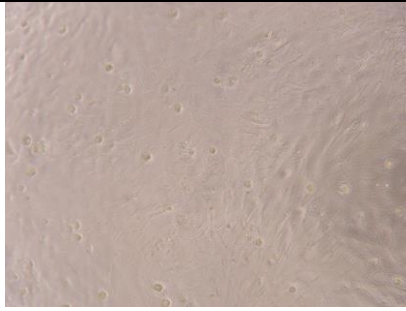
	AAD 5%	AAD 10%	AAD10%/Gel 2%	Gel 2%
dexOx 5%				
dexOx 10%	AAD 10%	AAD 20%	AAD10%/Gel 2%	Gel 2%
				

Figura 29 – Fotos das CEC após 24 horas na presença das diferentes formulações de dexOx com ampliação 100x. Materiais preparados por dissolução em PBS.

	AAD 10%	AAD 20%	AAD10%/Gel 2%	Gel 2%
dexOx 25%				
	AAD 5%	AAD 10%	AAD10%/Gel 2%	Gel 2%
dexOx 40%				

Continuação da figura 29 – Fotos das CEC após 24 horas na presença das diferentes formulações de dexOx com ampliação 100x. Materiais preparados por dissolução em PBS.

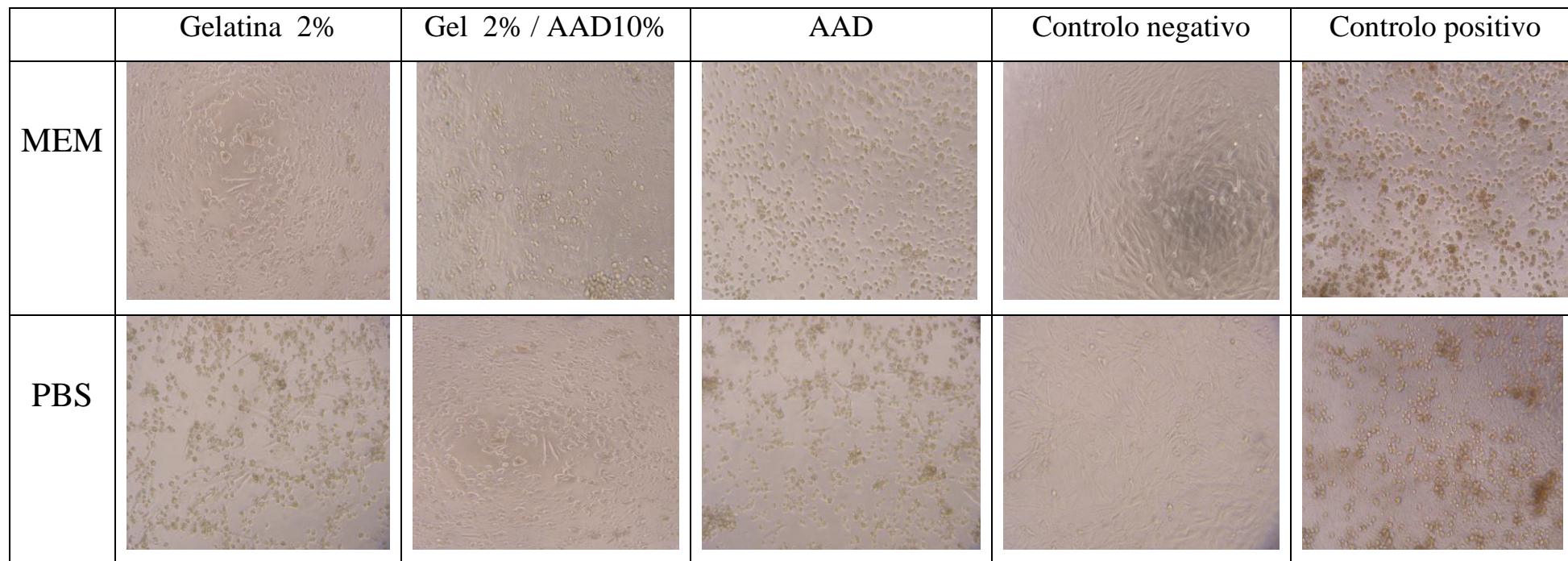


Figura 30 – Fotos das CEC após 24 horas na presença de Gelatina 2%, Gel 2%/AAD10%, AAD, controlo negativo e controlo positivo com ampliação 100x. Materiais preparados por dissolução em MEM e PBS.

Tabela 2 – Determinação da adesão das CEC no biomaterial dextrano oxidado.

Biomaterial	Adesão		Avaliação do crescimento		Confluência	
	MEM	PBS	MEM	PBS	MEM	PBS
DexOx 5% / AAD 5%	Sim	Não	+++	-	Sim	Não
DexOx 5% / AAD 10%	Sim	Não	+++	-	Sim	Não
DexOx5%/ AAD10%/Gel 2%	Sim	Sim	+++	++	Sim	Não
DexOx 5%/ Gel 2%	Sim	Sim	+++	+++	Sim	Sim
DexOx 10% / AAD 10%	Sim	Não	++	-	Não	Não
DexOx 10% / AAD 20%	Sim	Não	++	-	Não	Não
DexOx10%/ AAD10%/Gel 2%	Sim	Sim	+++	++	Sim	Não
DexOx10%/ Gel 2%	Sim	Sim	+++	+++	Sim	Sim
DexOx 25% / AAD 10%	Não	Não	-	-	Não	Não
DexOx 25% / AAD 20%	Não	Não	-	-	Não	Não
DexOx25%/ AAD10%/Gel 2%	Não	Não*	-	-	Não	Não
DexOx25%/ Gel 2%	Sim	Sim	++	++	Não	Não
DexOx 40% / AAD 5%	Não*	Não*	-	-	Não	Não
DexOx 40% / AAD 10%	Não*	Não*	-	-	Não	Não
DexOx40%/ AAD10%/Gel 2%	Não*	Não*	-	-	Não	Não
DexOx 40%/ Gel 2%	Sim	Sim	+	+	Não	Não

Continuação tabela 2 – Determinação da adesão das CEC em AAD, Getatina 2%, Gel2%/AAD10% e nos controlos preparados em MEM e PBS.

Biomaterial	Adesão		Avaliação do crescimento		Confluência	
	MEM	PBS	MEM	PBS	MEM	PBS
AAD 20 mg/mL	Sim		+		Não	
Getatina 2%	Sim		+		Não	
Gel 2% / AAD10%	Sim		+		Não	
Controlo negativo	Sim		+++		Sim	
Controlo positivo	Não		-		Não	
Legenda: + ; ++; +++ - crescente crescimento das células * - hidrogel com aparência opaca						

Os biomateriais utilizados neste estudo apresentaram um diferente grau de oxidação do dexOx 5,10, 25 e 40% reticulados com diferentes concentrações de AAD 5,10 e 20% e/ou Gel2% preparados em MEM ou em PBS (Maia *et al.*, 2005).

Em geral, os polissacarídeos degradam-se rapidamente e não são tão duráveis como os polímeros sintéticos. Assim, a oxidação do dextrano e a reticulação com agentes não tóxicos introduzem ligações nas cadeias dos polissacarídeos que estabilizam e aumentam a durabilidade destes (Wenh *et al.*, 2008). O dextrano contém grupos hidroxilo que foram facilmente modificados com a oxidação por periodato para formar grupos aldeído (Weng *et al.*, 2007 e 2008). Os grupos aldeído presentes no dextrano oxidado reagiram com o grupo hidrazida da AAD (Maia *et al.*, 2005). Durante a reticulação, o aumento dos poros do dexOx contribuiu para um maior crescimento das células no interior deste. Weng e colaboradores demonstraram que a reticulação de dexOx com N-carboxietil-quitosano formavam hidrogéis não citotóxicos, porosos, estáveis e com maior durabilidade (Weng *et al.*, 2007 e 2008).

No presente trabalho, todas as formulações de **dexOx 5% e 10%** preparadas por dissolução em MEM estimularam a adesão e crescimento das CEC, observando-se a confluência ao fim de um dia de incubação. A única formulação de **dexOx 25% e 40%** que estimulou o crescimento celular foi quando o material continha para além do dexOx a Gel 2%.

As formulações em PBS **dexOx 5% e 10%** reticuladas apenas com AAD não estimularam o crescimento celular, ao contrário das outras formulações. Nas formulações dexOx **25% e 40%** apenas se observou adesão e crescimento celular na reticulação com Gel2%.

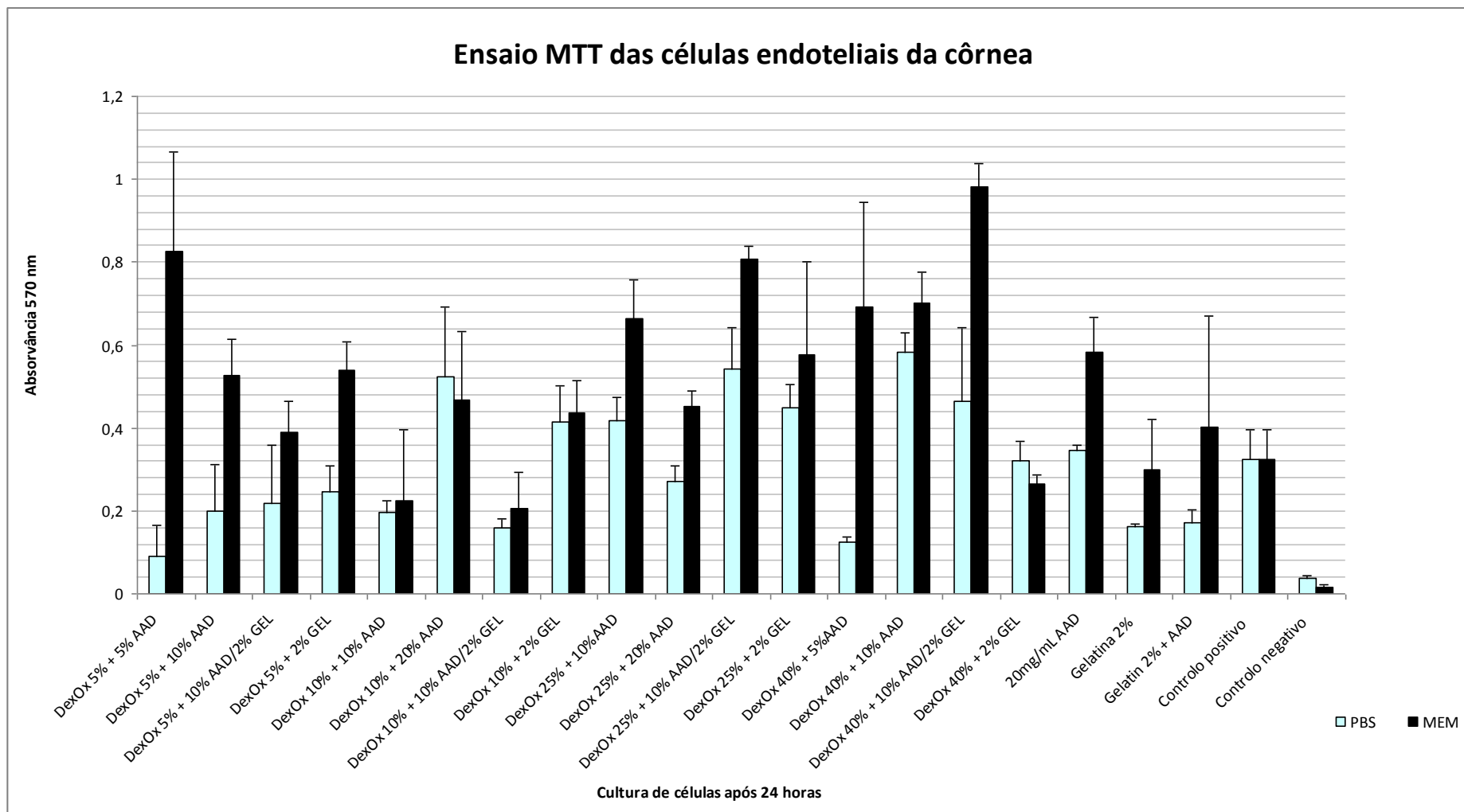
A gelatina em todas as formulações preparadas em MEM e PBS estimulou a adesão e crescimento celular.

Neste estudo foi possível observar que o aumento do grau de oxidação do dextrano e a sua preparação em PBS levou a uma diminuição da adesão e crescimento das células.

A biocompatibilidade dos hidrogéis baseados no dexOx foi estudada pela adesão celular e pela presença ou ausência de crescimento celular após 24 horas. Após incubação de 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada pela redução do reagente MTT. Os resultados significativos obtidos no ensaio do MTT revelaram elevada actividade redox mitocondrial para os hidrogéis dissolvidos em meio de cultura e com baixos graus de oxidação que promoveram adesão e proliferação celular. A actividade celular para

quase todos os graus de dexOx foi mais elevada nas formulações dissolvidas em meio de cultura. Todos os graus de oxidação apresentaram uma actividade celular acima do controle positivo (gráfico 1).

Grafico 1 – Actividade redox mitocondrial das CEC na presença de hidrogéis de dextrano oxidado preparados em MEM e PBS. As linhas por cima das barras correspondem ao desvio padrão.



i) Determinação da adesão das HUASMCs no biomaterial e da resposta celular à presença do dextrano oxidado

Os biomateriais utilizados neste estudo apresentaram um diferente grau de oxidação do dexOx 5,10, 25 e 40% reticulados com diferentes concentrações de AAD 5,10 e 20% preparados em DMEM-F12 ou em PBS (Maia *et al.*, 2005).

Quando as HUASMCs foram semeadas nas formulações **dexOx 5%**, **dexOx 10%** e **dexOx 25%** com diferentes percentagens de **AAD 5, 10 e 20%** foi possível observar adesão e crescimento celular para todas as formulações preparadas em meio de cultura e PBS. Verificou-se maior crescimento nas formulações de dexOx preparadas em meio de cultura. Nas placas revestidas com as formulações **dexOx 40%** dissolvidas em DMEM-F12 e PBS não se verificou adesão e crescimento celular (figura 31, figura 32 e tabela 3).

Neste ensaio, apesar da gelatina aumentar a adesão e crescimento celular no ensaio das CEC, não se usou gelatina 2% nas formulações de dexOx pois esta é de origem animal. O uso de colagénio de origem animal e seus derivados induz respostas imunológicas associadas a um risco mais elevado de varias doenças, como exemplo a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (Jeong *et al.*, 2007).

Nas placas de cultura preparadas em com meio de cultura e PBS, com AAD e no controlo negativo, verificou-se pouca adesão e crescimento celular (figura 33 e tabela 3).

A diminuição do grau de dexOx e da concentração de AAD e a diluição dos biomateriais em meio de cultura levaram a um aumento da adesão e crescimento das células.

Os resultados significativos do ensaio do MTT relevaram elevada actividade redox mitocondrial para os hidrogéis dissolvidos em meio de cultura e com baixos graus de oxidação (gráfico 2).

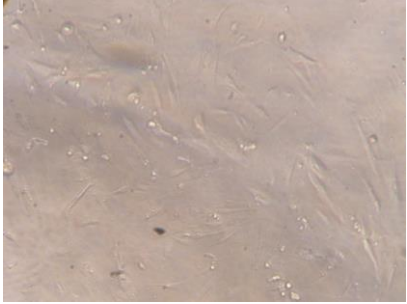
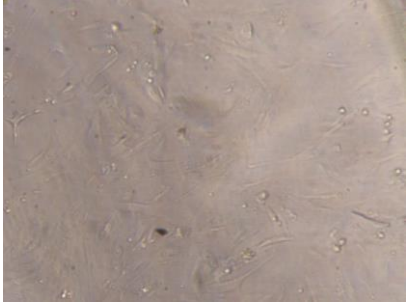
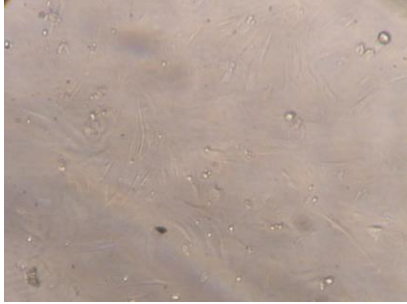
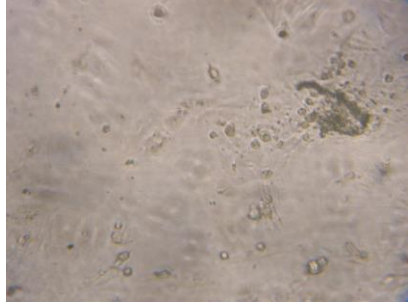

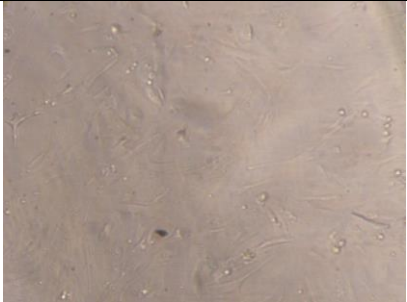
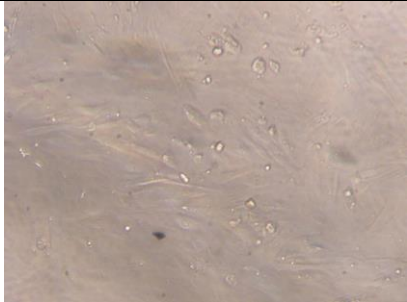
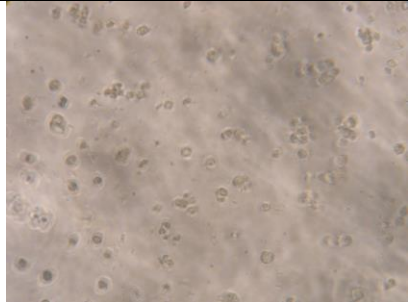
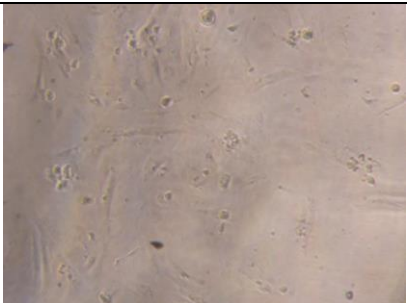
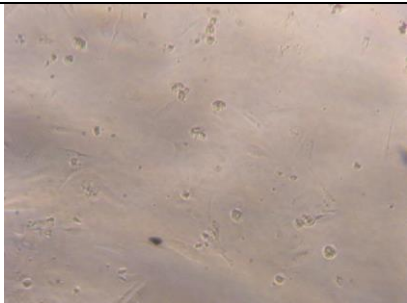
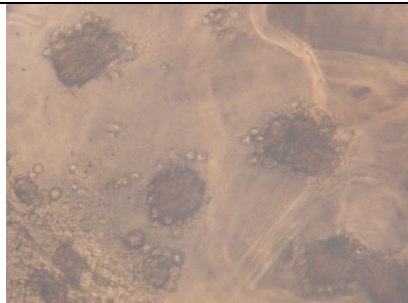
	dexOx 5%	dexOx 10%	dexOx 25%	dexOx 40%
AAD 5%				
AAD 10%				
AAD 20%	Não se forma			

Figura 31 – Fotos das HUASMCs após 24 horas na presença das diferentes formulações de dexOx com ampliação 100x. Materiais preparados por dissolução em DMEM-F12

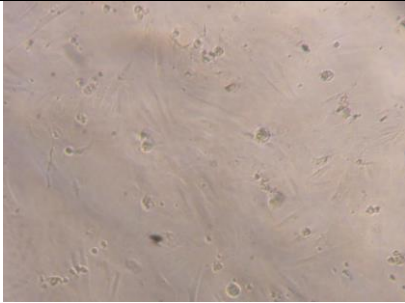
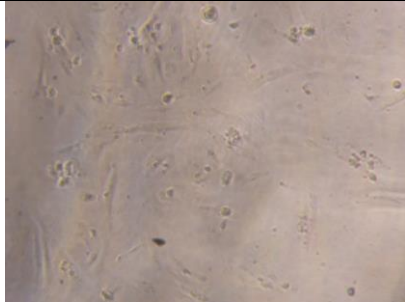
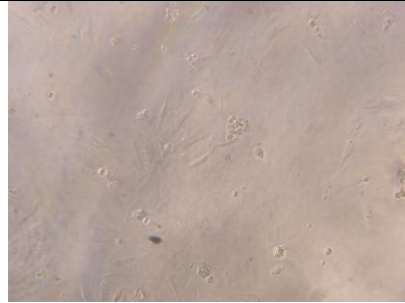
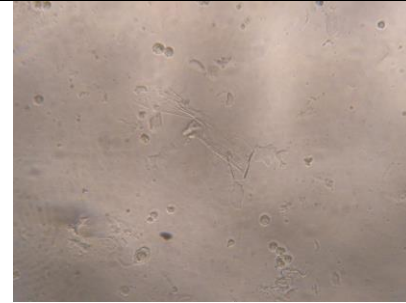
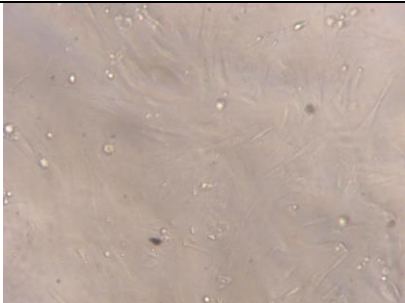
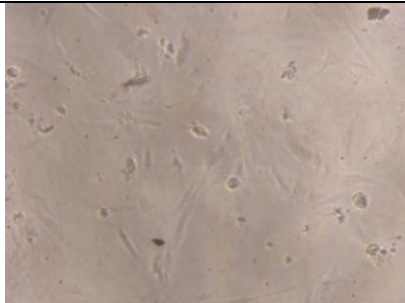
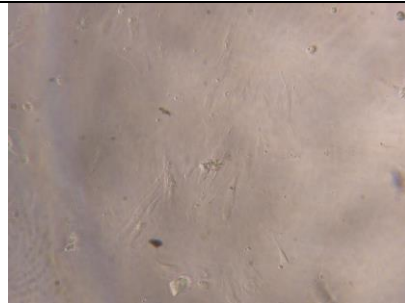
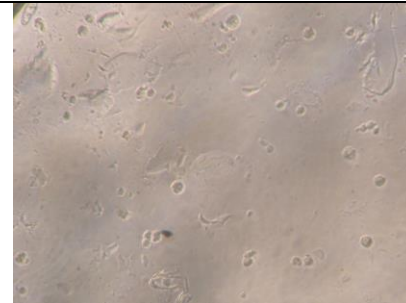
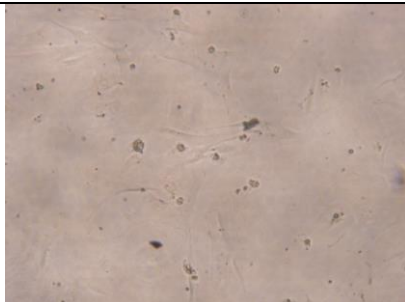
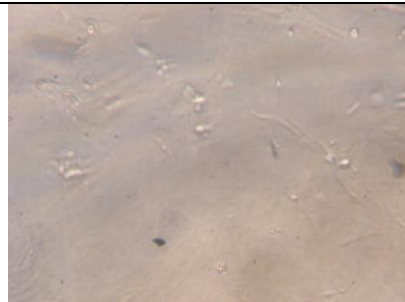
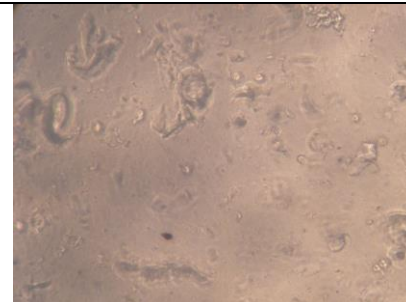
	dexOx 5%	dexOx 10%	dexOx 25%	dexOx 40%
AAD 5%				
AAD 10%				
AAD 20%	Não se forma			

Figura 32 – Fotos das HUASMCs após 24 horas na presença das diferentes formulações de dexOx. Materiais preparados por dissolução em PBS.

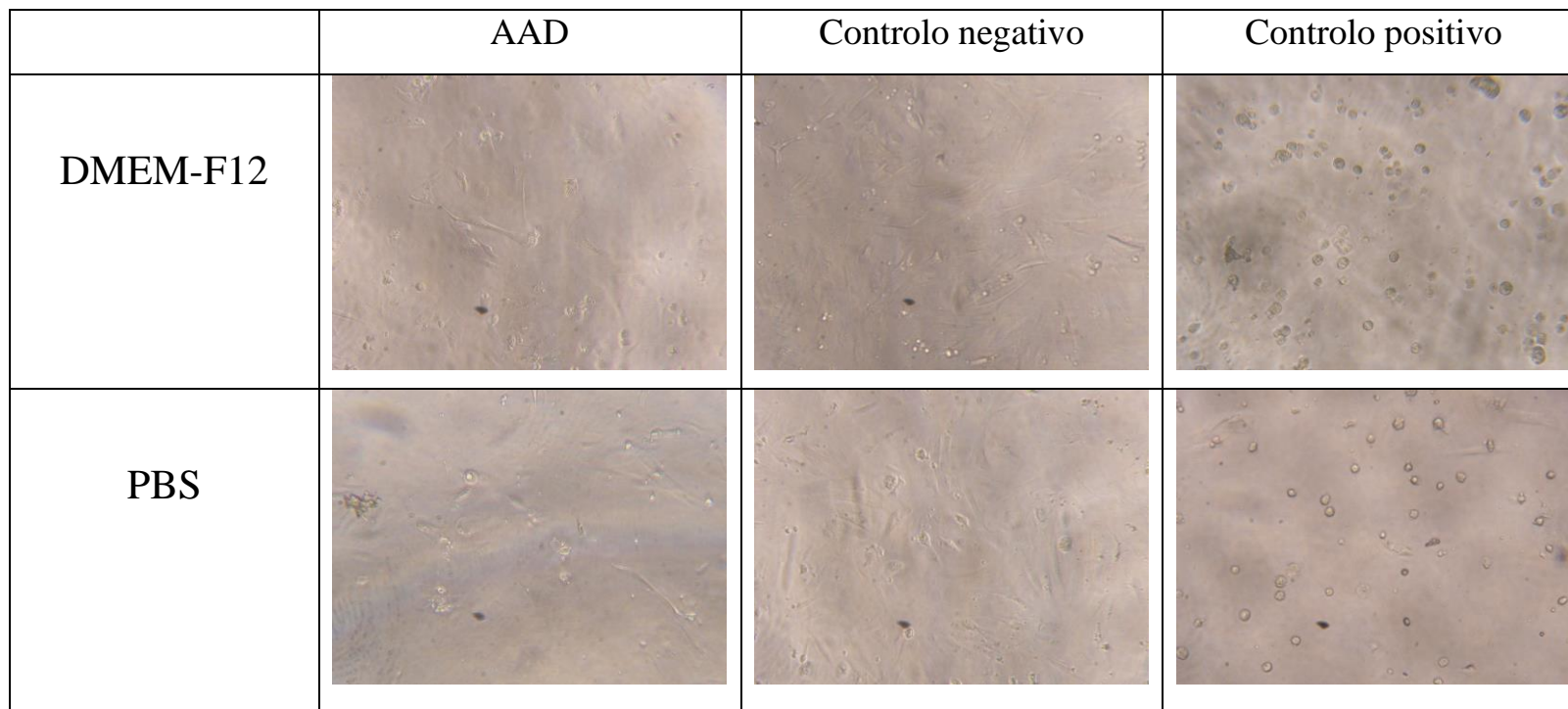


Figura 33 – Fotos das HUASMCs após 24 horas na presença de ADD, controlo negativo e controlo positivo com ampliação 100x. Materiais preparados por dissolução em DMEM-F12 e PBS.

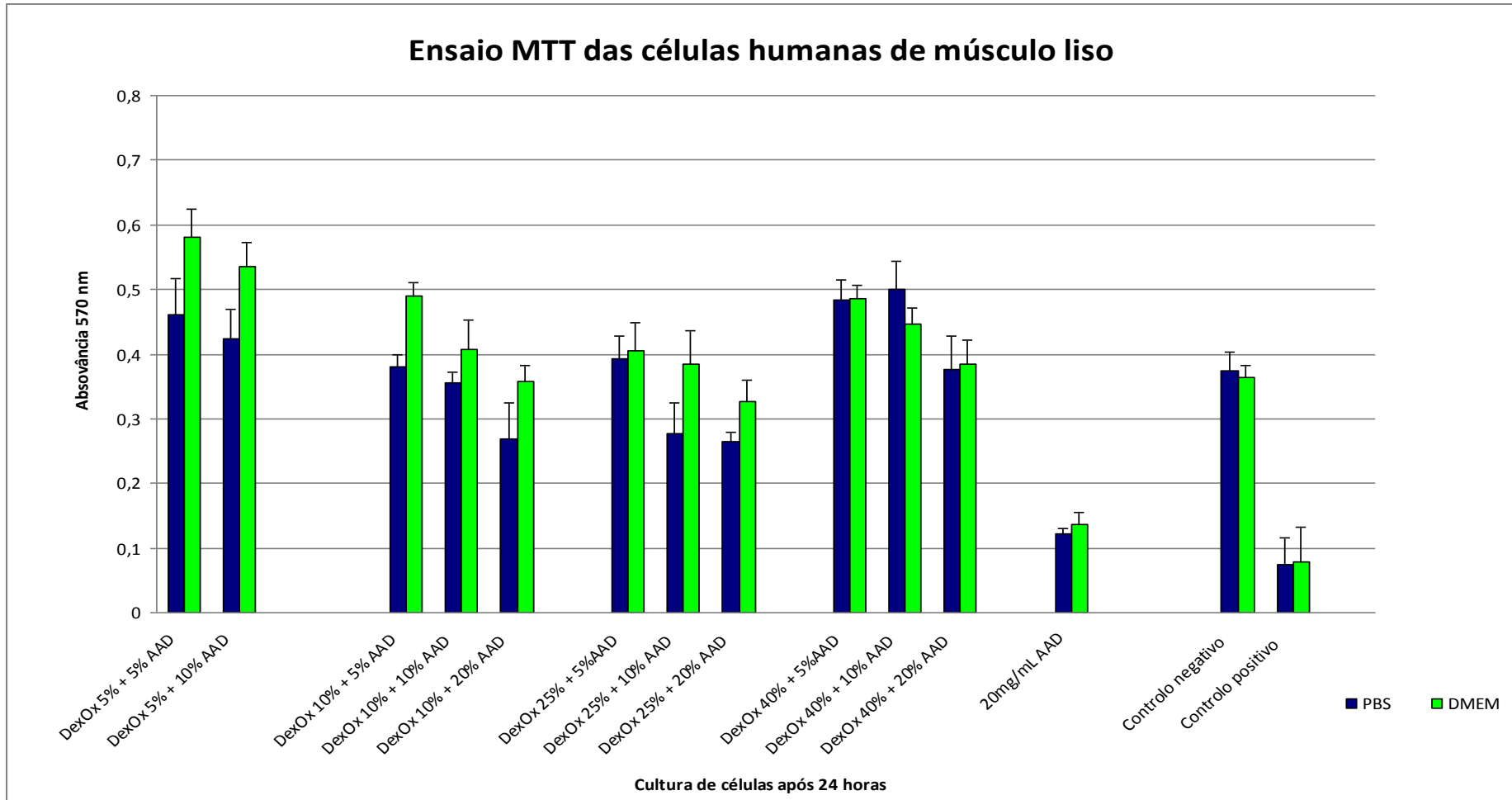
Tabela 3 – Determinação da adesão das HUASMCs no biomaterial dextrano oxidado.

Biomaterial	Adesão		Avaliação do crescimento		Confluência	
	MEM	PBS	MEM	PBS	MEM	PBS
DexOx 5% / AAD 5%	Sim	Sim	+	+	Não	Não
DexOx 5% / AAD 10%	Sim	Sim	+	+	Não	Não
DexOx 10% / AAD 5%	Sim	Sim	+	+	Não	Não
DexOx 10% / AAD 10%	Sim	Sim	+	+	Não	Não
DexOx10% / AAD 20%	Sim	Sim	+	+	Não	Não
DexOx 25% / AAD 5%	Sim	Não	+	-	Não	Não
DexOx 25% / AAD 10%	Sim	Não	+	-	Não	Não
DexOx25% / AAD 20%	Sim	Não	+	-	Não	Não
DexOx 40% / AAD 5%	Não*	Não*	-	-	Não	Não
DexOx 40% / AAD 10%	Não*	Não*	-	-	Não	Não
DexOx40% / AAD 20%	Não*	Não*	-	-	Não	Não

Tabela 3 continuação - Determinação da adesão das HUASMCs em AAD e nos controles preparados em MEM e PBS.

Biomaterial	Adesão		Avaliação do crescimento		Confluência	
	MEM	PBS	MEM	PBS	MEM	PBS
AAD 20 mg/mL	Sim		+		Não	
Controlo negativo	Sim		+		Sim	
Controlo positivo	Não		-		Não	
Legenda: + ; ++; +++ - crescente crescimento das células. * - hidrogel com aparência opaca						

Grafico 2 – Actividade redox mitocondrial das hSMC em hidrogéis de dextrano oxidado. As linhas por cima das barras correspondem ao desvio padrão.



V) Conclusão

Neste estudo pretendia-se avaliar a adesão e a viabilidade celular em hidrogéis baseados no dextrano oxidado, de forma a verificar se este biomaterial é biocompatível para criar por engenharia de tecidos substitutos de vasos sanguíneos.

Rodriguez-Morata e colaboradores apontam que a construção eficiente de vasos sanguíneos é fortemente dependente do uso de células endoteliais viáveis e completamente funcionais. Gao e colaboradores mencionam que 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. A trombose e a hiperplasia intimal são a principal causa do insucesso da substituição de pequenas e médias artérias. García-Honduvilla e colaboradores indicam que a hiperplasia intimal pode ser solucionada se o lúmen dos vasos artificiais fosse semeado com células endoteliais.

No presente trabalho, o isolamento de células endoteliais humanas efectuou-se a partir das artérias do cordão umbilical pelo método adaptado de Van Rigen et al, 1997. Após várias tentativas, e efectuando variações no método de isolamento das células (não se passar meio RPMI pelas artérias e diminuir o tempo de incubação em PBS para 15 minutos), foi possível obter células endoteliais humanas. Durante o presente trabalho, foram efectuados ensaios com anticorpos específicos, que reconhecem sequências específicas que existem nas células isoladas. A identidade do fenótipo das células endoteliais humanas na passagem 2 foi confirmada por imunofluorescência com marcadores específicos moleculares para a *VE-cadherin* e o factor *vW*. A contaminação da cultura por células de músculo liso foi confirmada pela expressão da actina observada por imunofluorescência. Conclui-se assim que o objectivo de obter uma cultura pura de células endoteliais isoladas a partir das artérias do cordão umbilical não foi conseguida. Assim, não foi possível avaliar a viabilidade celular pelo método MTT em células endoteliais humanas.

A avaliação da adesão e viabilidade celular em hidrogéis baseados no dextrano oxidado ligado com AAD e/ou gelatina dissolvidos em meio de cultura ou PBS foram determinadas com dois diferentes tipos de células: células endoteliais da córnea de coelho e células humanas de musculo liso obtidas a partir das artérias de cordões umbilicais.

De um modo geral, para ambos os tipos de células, conclui-se que a aderência e crescimento celular é maior em hidrogéis de dextrano com baixo grau de oxidação preparados em meio de cultura. O aumento do grau de oxidação do dextrano e o aumento da concentração de AAD levou a uma diminuição da adesão celular e consequentemente uma diminuição no seu crescimento. A percentagem máxima de oxidação de dextrano para a qual se observaram células aderidas foi de 10% para as células endoteliais da córnea e 25 % para as células humanas de músculo liso. A gelatina usada como agente de estabilização dos biomateriais, apesar de promover adesão e proliferação celular no ensaio com as CEC, visto ser de origem animal e aumentar o risco de várias doenças, evitou-se ser utilizada no ensaio com células humanas.

O parâmetro mais utilizado para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais é a viabilidade celular, que pode ser determinada pelo método MTT e MTS. Os testes *in vitro* de viabilidade celular e de citotoxicidade (método LDH) (ISO 10993-5) devem ser executados para determinar os efeitos biológicos adversos causados pelos materiais. No presente trabalho apenas otimizamos o método MTT visando agregar informação da biocompatibilidade do dextrano oxidado. Como perspectivas futuras pretende-se a optimização do método MTS e LDH para ensaios de biocompatibilidade nestes materiais.

Pelo método MTT, para ambos os tipos de células, conclui-se elevada viabilidade celular para baixos graus de oxidação.

Nos hidrogéis baseados no dextrano oxidado a reticulação com AAD levou a um aumento dos poros do dextrano oxidado e contribuiu para o crescimento das células no interior deste. O grau de oxidação do dextrano permitiu criar uma determinada percentagem de resíduos que serviram como pontos reactivos para as moléculas de AAD. Então, a quantidade de AAD usada é muito importante no período de dissolução do hidrogel e está dentro da mesma gama da quantidade de resíduos oxidados. Nestes hidrogéis 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.

Conclui-se assim, que os hidrogéis baseados em dextrano oxidado ligado com AAD e/ou gelatina são biocompatíveis e podem ser usados *in vivo* para futuras aplicações em medicina regenerativa em suportes para formar vasos sanguíneos substitutos ou para a entrega de células e /ou drogas injectáveis.

VI) Bibliografia

- Aird WC (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium, structure, function and mechanisms. *Circulation Research* 100: 158-173.
- Anderson JM, Analiz Rodriguez A & Chang DT (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology* 20: 86–100.
- Atala A (2007). Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 1(2):83-96.
- Baudin B, Bruneel A, Bosselut N & Vaubourdolle M (2007). A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature protocols* 2(3): 481-485.
- Bhatia SK & Yetter AB (2007a). Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. *Cell Biology and Toxicology* 24(4): 315-319.
- Bhatia SK, Arthur SD, Chenault HK & Kodokian GK (2007b). Interactions of polysaccharide-based tissue adhesives with clinically relevant fibroblast and macrophage cell lines. *Biotechnol Lett.* 29(11): 1645–1649.
- Bronzino JD (2006). The Biomedical Engineering Handbook: Tissue Engineering and Artificial Organs. 3rd ed. *Taylor & Francis, USA.*
- Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Dijkstra PJ, deVos RAI, Sterk LMT (2004). Tissue engineering of blood vessels: characterisation of smooth muscle cells for culturing on collagen and elastin based scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem.* 9(2):141–149.
- Buttafoco L, Engbers-Buijtenhuijs P, Poot AA, Dijkstra PJ, Vermes I, Feijen J (2006). Physical characterization of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials* 27(11):2380-2389.
- Cadée JA, van Luyn MJ, Brouwer LA, Plantinga JA, van Wachem PB, de Groot CJ, den Otter W & Hennink WE (2000). In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res.* 50(3): 397– 404.
- Cascone MG, Sim B & Downes S. (1995). Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. *Biomaterials* 16(7): 569-574.
- Crampton SP, Davis J & Hughes CW (2007). Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *Journal of Visualized Experiments* 1-2.
- Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W & Cao Y (2008). Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatr Res.* 63(5):492-496.
- Chandra R & Rustgi R (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* 23(7): 1273-1335.

- Cheung AL (2007). Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *Current Protocols in Microbiology* A.4B.1-A.4B.8.
- De Groot CJ, Van Luyn MJ, Van Dijk-Wolthuis WN, Cadée JA, Plantinga JA, Den Otter W & Hennink WE (2001). In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts. *Biomaterials* 22(11): 1197–1203.
- De Llano JJ, Fuertes G, García-Vicent C, Torró I, Fayos JL & Lurbe E (2007). Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord. *Translational Research* 149(1): 1-9.
- Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M & D'Addario V. (2001). Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 96(2): 150-157.
- Doyle A & Griffiths JB (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. *Wiley Publication*.
- Drury JL & Mooney DJ (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24(24): 4337–4351
- Dunzendorfer S, Bellmann R, Wiedermann CJ (1999). A simple way to obtain sufficient amounts of arterial endothelial cells from human umbilical cords. *Cell Biol Int.* 23(1): 89-90.
- Engbers-Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Dijkstra PJ, de Vos RA, Sterk LM, Geelkerken RH, Vermes I & Feijen J (2006). Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials* 27(11): 2390-2397.
- Ferreira L, Gil MH & Dordick JS (2002). Enzymatic synthesis of dextran containing hydrogels. *Biomaterials* 23(19): 3957–3967.
- Ferreira L, Rafael A, Lamghari M, Barbosa MA, Gil MH, Cabrita AM & Dordick JS (2004). Biocompatibility of chemoenzymatically derived dextran-acrylate hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 68(3): 584–96.
- Ferreira L, Gil MH, Cabrita AM & Dordick JS (2005). Biocatalytic synthesis of highly ordered degradable dextran-based hydrogels. *Biomaterials* 26(3): 4707–4716.
- Ferreira LS, Gerecht S, Fuller J, Shieh HF, Vunjak-Novakovic G & Langer R (2007). Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 28(17): 2706-2717.
- Freshney RI (1987). Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2nd ed. *New York: Wiley-Liss*: 397.
- Friess W (1998). Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45(2): 113-136.

- Gao J, Crapo P, Nerem R & Wang Y (2008). Co-expression of elastin and collagen leads to highly compliant engineered blood vessels. *J Biomed Mater Res A*. 85(4):1120-1128.
- Graça LM. & colaboradores (2000), *Medicine Materno Fetal* 1. 2ª edição, *Lidel*, Lisboa.
- Graaff V (2002). Human anatomy. 5th edition, *McGrawHill*, New York.
- Gimbrone MA, Cotran RS & Folkman J (1974). Human vascular endothelial cells in culture, growth and DNA synthesis. *The Journal of Cell Biology* 60: 673-684.
- Glowacki J & Mizuno S (2007). Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. *Biopolymers* 89(5): 338–344.
- García-Honduvilla N, Domínguez B, Pascual G, Escudero C, Minguela F, Bellón JM & Buján J (2008). Viability of Engineered Vessels as Arterial Substitutes. *Ann Vasc Surg*. 22(2): 255-265.
- Gray H (2001). Anatomy Of The Human Body. *The Bartleby.com*.
- Griffith LG (2000). Polymeric biomaterials. *Acta Materialia* 48(1): 263-277.
- Gunatillake PA & Adhikari R (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European cells and Materials* 5:1-16.
- Hench LL (1991). Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*. 74(7):1487-1510.
- Hench LL (1998). Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*. 41(4):511-518.
- Heydarkhan-Hagvall S, Esguerra M, Helenius G, Söderberg R, Johansson BR & Risberg B (2006). Production of Extracellular Matrix Components in Tissue-Engineered Blood Vessels. *Tissue Engineering* 12(4): 831-842.
- Hiemstra C, Zhong Z, van Steenbergen MJ, Hennink WE & Feijen J (2007). Release of model proteins and basic fibroblast growth factor from in situ forming degradable dextran hydrogels. *J Control Release*. 11;122(1):71-78.
- Hoenig MR, Campbell GR, Rolfe BE & Campbell JH (2005). Tissue-Engineering blood vessels, alternative to autologous grafts?. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 1128-1134,
- Hoffman AS (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(1):3-12.
- Huebsch ND & Mooney DJ (2007). Fluorescent resonance energy transfer: A tool for probing molecular cell–biomaterial interactions in three dimensions. *Biomaterials* 28(15): 2424-2437.

Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC & Lim TC. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med.* 1(14): 245–260.

Ito T, Yeo Y, Highley CB, Bellas E & Kohane DS (2007). Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions. *Biomaterials* 28(23): 3418–3426.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG & Minick CR (1973). Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. *The Journal of Clinical Investigation* 52(11): 2745-2756.

Jeong SI, Kim SY, Cho SK, Chong MS, Kim KS, Kim H, Lee SB & Lee YM (2007). Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors. *Biomaterials* 28(6):1115-1122.

Jorge-Herrero E (1997). Biological biomaterials. *Ann Quim Int.* 93: S32-S37.

Kim BS, Baez CE & Atala A (2000). Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol.* 18: 2-9.

Koblas T, Harman SM & Saudek F (2005). The Application of Cord Blood Cells in the Treatment of Diabetes Mellitus. *The Review of Diabetic Studies* 2 (4): 228-234.

Kohane DS & Langer R (2008). Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. *Pediatr Res.* 63(5): 487-491.

Larrivéé B & Karsan A (2004). Isolation and Culture of Primary Endothelial Cells. *Methods in Molecular Biology* 290: 315-329.

Lee J, Cuddihy MJ & Kotov NA (2008). Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Engineering: Part B* 14 (1): 61- 86.

Lévesque SG, Lim RM & Shoichet MS (2005). Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. *Biomaterials* 26(35): 7436–7446.

L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L & Auger FA (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J.* 12: 47-56.

Lin CC & Metters AT (2006). Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modelling. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58(12-13): 1379–1408.

Luo Y & Radice GL (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 169(1): 29–34.

Madeley CR & Peiris JSM (2002). Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *Journal of Clinical Virology*, 25(2):121–134.

- Maia J, Ferreira L, Carvalho R, Ramos MA & Gil MH (2005). Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. *Polymer*, 46 (23): 9604-9614.
- Ma Z, Mao Z & Gao C (2007). Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60(2): 137–157.
- Ma PX (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 6(2)184–198.
- Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NM & Reis RL (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc. Interface* 4(17): 999–1030.
- Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C & Bongrand P (2001). Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *Journal of Immunological Methods* 254(1-2):183–190.
- Martin I, Wendt D, Heberer M & (2004). The role of bioreactors in tissue Engineering”, *Trends in Biotechnology* 22(2): 80-86.
- Mather JP & Roberts PE (1998). Introduction to cell and tissue culture: Theory and Technique. *Plenum Press*, New York.
- Mehvar R (2000). Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Release*, 69(1): 1–25.
- Moore K & Daley (2001). Anatomia orientada para a clínica. 4th ed., *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro.
- Moore, Persaud & Shiota (1994), “Atlas de embriologia clínica”, *Editora medica panamericana*, Madrid.
- Morgan DML (1996). Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Methods in Molecular Medicine* 2: 101-109 .
- Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004). Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 86(A-7): 1541-1558.
- Myron (2006). Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss med wkly* 36(19) :293–301.
- Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, Vandamme EJ (2005). Leuconostoc dextranase and dextran: production, properties and applications. *J Chem Technol. Biotechnol* 80(8): 845–886.

Nerem RM. (2000). Tissue engineering a blood vessel substitute: the role of biomechanics. *Yonsei Medical Journal* 41(6): 735-739.

Nerem RM. & Ensley AE (2004). The tissue engineering of blood vessels and the heart. *American Journal of Transplantation* 4 (6): 36-42.

Owen GR, Meredith DO, ap Gwynn I, Richards RG (2005). Focal adhesion quantification – a new assay of material compatibility? Review. *European Cells and Materials* 9: 85-96.

Park J & Lakes RS (2007). Biomaterials: An Introduction. 3rd ed., *springer*.

Peppas NA, Bures P, Leobandung W & Ichikawa H (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50(1): 27-46.

Polak JM & Noorden SV (2003). Introduction to Immunocytochemistry. 3rd ed. *Bios Scientific Publishers*.

Priya SG, Jungvid H & Kumar A (2008). Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 4(1):105-118.

Racliffe A (2000). Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biology* 19(4): 353-357.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ & Lemons JE (1996). Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. 2nd ed. *Academic Press*.

Ravaglioli A & Krajewski A (1992). Bioceramics-Materials, Properties and Applications. *Chapman & Hall*: 422.

Rickert D, Lendlein A, Peters I, Moses MA, Franke RP (2006). Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: an overview. *Eu.r Arch. Otorhinolaryngol* 263(3): 215–222.

Rivitti EA, Oliveira ZNP, Díaz LA & Miyauchi LM (1990). As técnicas de imunofluorescências e sua contribuição ao estudo da patogenia dos pêfingos. *An. Brás. Dermatol.* 65(5a): 8S-12S.

Rehfeldt F, Engler AJ, Eckhardt A, Ahmed F, Discher DE (2007). Cell responses to the mechanochemical microenvironment—Implications for regenerative medicine and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(13): 1329–1339.

Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J & Campos A (2008). Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg.* 22(3): 440-448.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI & Cruz AS (2003). Teste in vitro de Citotoxicidade : estudos comparativos entre duas metodologias. *Materials Research* 6 (3): 317-320.

Román JS, (1997). Recent contributions of polymers to design of biomaterials for clinical and surgical applications. *Ann Quim Int* 93: S22-S31.

Rosso F, Giordano A, Barbarisi M & Barbarisi A (2004). From Cell–ECM Interactions to Tissue Engineering. *Journal of Cellular Physiology* 199(2):174–180.

Sachlos E & Czernuszka JT (2003a). 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.

Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka JT (2003b). Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials* 24(8): 1487-1497.

Saladin KS (2001). Anatomy & Physiology: the Unity of Form and Function. 2nd ed. *McGraw-Hill*, USA.

Sartri B & Scandola M (1995). Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly(vinyl alcohol) blends. *Biomaterials*, 16:785-792.

Seal BL, Otero TC & Panitch A (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering* 34(4): 147-230.

Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, Peña J, Rámila A, Izquierdo I & Portolés MT (2004). In vitro biocompatibility assessment of poly (ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblast. *Biomaterials* 25(25): 603-611.

Shaw AJ (1996). Epithelial Cell Culture: The practical approach series. *Series editors*.

Silva GA, Ducheyne P & Reis RL (2007). Materials in particulate form for tissue engineering. Basic concepts. *J Tissue Eng Regen Med*. 1(1): 4-24.

Snell RS (2003). Anatomia Clínica para estudantes de Medicina. 5th ed. Editora Guanabara Koogan S.A.: 7-18.

Solomon EP & Davis PW (1987). Understanding Human Anatomy and Physiology. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia

Spector DL, Goldman RD & Leinwand LA (1998). Cells: A laboratory manual, volume 1 – Culture and Biochemical Analysis of Cells. *CSHL Press*, USA.

Storch WB (2000). Immunofluorescence in Clinical Immunology: A Primer and Atlas. *Birkhäuser Verlag*, Basel.

Suh H (2000). Tissue Restoration, Tissue Engineering and Regenerative Medicine *Yonsei Medical Journal* 41 (6): 681-684.

Tsai SH, Liu YW, Tang WC, Zhou ZW, Hwang CY, Hwang GY, Ou BR, Hu CP, Yang VC & Chen JK (2007). Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.* 357(4): 984-990.

Weng L, Chen X & Chen W (2007). Rheological characterization of in situ crosslinkable hydrogels formulated from oxidized dextran and N-carboxyethyl chitosan. *Biomacromolecules* 8(4):1109-1115.

Weng L, Romanov A, Rooney J & Chen W (2008). Non-cytotoxic, in situ gelable hydrogels composed of N-carboxyethyl chitosan and oxidized dextran. *Biomaterials* 29(29):3905-3913.

Wielgus AR, Chignell CF, Miller DS, Van Houten B, Meyer J, Hu DN, Roberts JE (2007). Phototoxicity in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Promoted by Hypericin, a Component of St. John's Wort. *Photochem Photobiol* 83(3): 706-713.

Williams DF (1987). Definitions in biomaterials. *Elsevier*, 61.

Williams, DF (2003). Biomaterials and tissue engineering in reconstructive. *Sadhana* 28(3-4):563-574.

Williams DJ. & Sebastine IM (2005). Tissue engineering and regenerative medicine: manufacturing challenges. *IEE Proc Nanobiotechnol* 152(6): 207-210.

Vallet-Regí M(1997). Introduction to the word of biomaterials. *Ann Quim Int.* 93:S1-S6.

Van Tomme SR & Hennink WE (2007). Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Review of Medical Devices* 4(2):147-164.

Zhang S. (1999). An atlas of histology. *Springer*, New York.

Anexos

1) Anexo I – Preparação 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 ₂	0,4066		4,066	Sigma
NaHCO ₃	0,8401		8,401	Sigma
KH ₂ PO ₄	0,0680		0,680	Sigma
NaH ₂ PO ₄	0,0600		0,600	USB
Glicose	1,8016		18,016	Sigma
H ₂ 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 ₂	1 M	0,16	Sigma
H ₂ 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.

Solução	Quantidade (g)	Marca dos reagentes
NaCl	81,816	Panreac
KCl	2,013	Sigma
KH ₂ PO ₄	2,050	Sigma
Na ₂ HPO ₄	11,620	USB
H ₂ 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.

Reagente	Quantidade (g)	Marca dos reagentes
CaCl ₂	0,14	Sigma
KCl	0,4	Sigma
KH ₂ PO ₄	0,06	Sigma
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1	Sigma
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	Sigma
NaCl	8,0	Panreac
NaHCO ₃	0,35	Sigma
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,09	Sigma
D-glucose	1,0	Sigma
H ₂ 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.

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

Nota – É feita uma solução de 5 mL e aliquota-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)**.

Reagente	Quantidade	Marca dos reagentes
Penicilina	10000 U	Sigma
Estreptomicina	10 mg	Sigma
Anfotericina	25 µg	Sigma

Nota – A solução aliquota-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.

Reagente	Quantidade (g)	Marca dos reagentes
DMEM-F12 liofilizado	15,6	Sigma
L-ascórbico	0,02	Sigma
NaHCO ₃	1,2	Sigma
H ₂ 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.

Solução	Quantidade (mL)	Marca dos reagentes
DMEM-F12	180	-----
FBS	20	Biochrom-AG
Reagente	Quantidade (g)	
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 **MEM (Minimum Essential medium Eagle)** (para volume final de solução de 1 L).

Reagente	Quantidade (g)	Marca dos reagentes
MEM	15,6	Sigma
NaHCO ₃	1,2	Sigma
H ₂ O destilada	Perfazer até 1 L	
pH = 7,2		

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

Tabela 10 – Preparação da solução de cultura celular **MEM com soro 10 % de soro fetal bovino** e com **factores de crescimento** (para volume final de solução de 200 mL).

Solução	Concentração	Quantidade (mL)	Marca dos reagentes
MEM	-----	180	Sigma
FBS	10%	20	Biochrom-AG
Factores de crescimento		Quantidade (µL)	
FGF	5 ng/mL	1000	Sigma
EGF		50	
NGF		50	
pH = 7,4			

Tabela 11 – Preparação da solução de cultura celular **DMEM – F12 com 5 % de soro fetal bovino** para um volume final de 200 mL.

Solução	Quantidade (mL)	Marca dos reagentes
DMEM-F12	190	-----
FBS	10	Biochrom-AG
Reagente	Quantidade (g)	
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 12 – **Factores de crescimento** adicionados à solução de cultura celular **DMEM – F12 com 5 % de soro fetal bovino** para um volume final de 200 mL.

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

Tabela 13 – Preparação do **GSP (componentes de suplemento do crescimento)**, para um volume final de 10 mL.

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

Tabela 14 – Preparação da solução de cultura celular **RPMI 1640**, com glutamina e suplementado com 10 % de soro fetal bovino para um volume final de 50 mL.

Solução	Quantidade (mL)	Marca dos reagentes
RPMI 1640	45	GIBCO
FBS	5	Biochrom-AG
Reagente	Quantidade (g)	
NaHCO ₃	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 15 – 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.

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

Tabela 16 – Preparação dos frascos de transporte dos olhos de coelhos e cordões umbilicais.

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

Tabela 17 – Reagentes necessários na fixação de células e imunofluorescência.

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

Tabela 18 – Anticorpos primários e secundários usados na imunofluorescência.

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

2) Anexo II - Preparação das placas com biomateriais – hidrogeis baseados no dextrano oxidado.

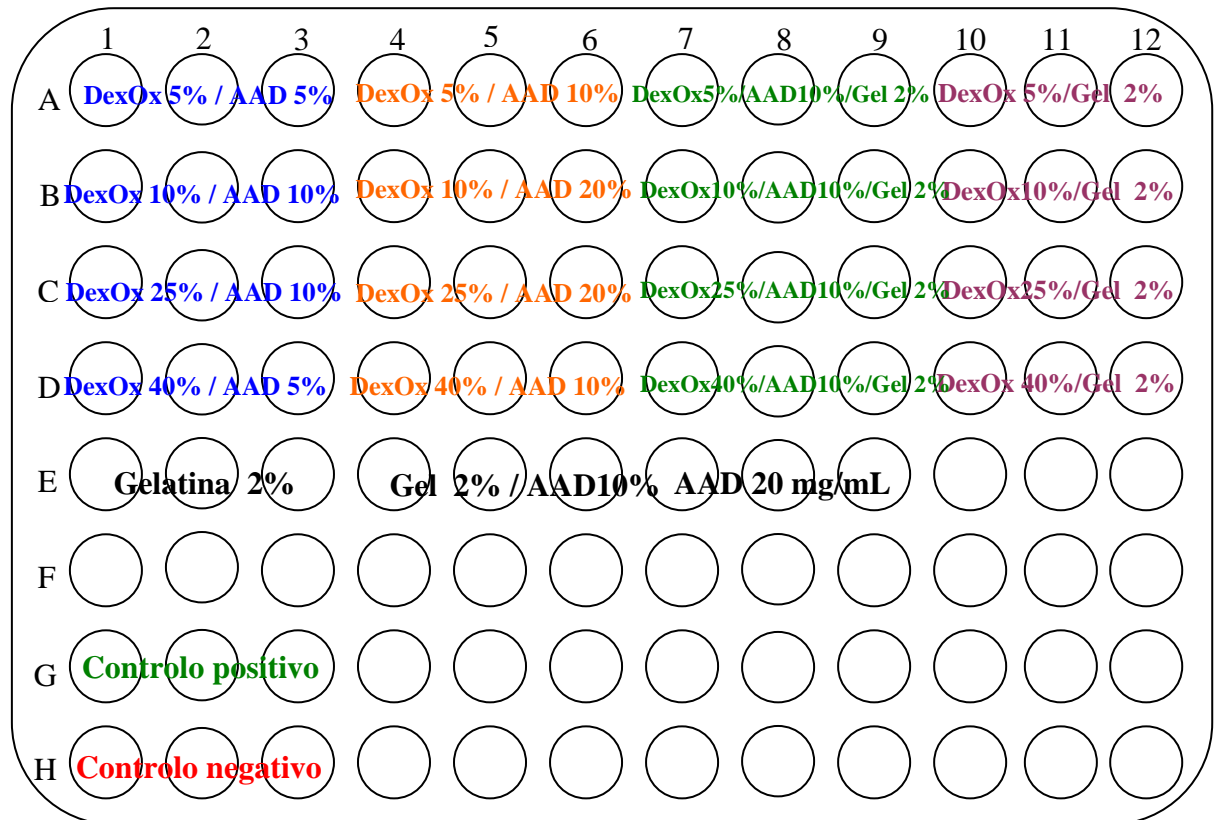


Figura 1 – Esquemas da placa com os biomateriais usadas para estudar a biocompatibilidade do dextrano nas células endoteliais da córnea.

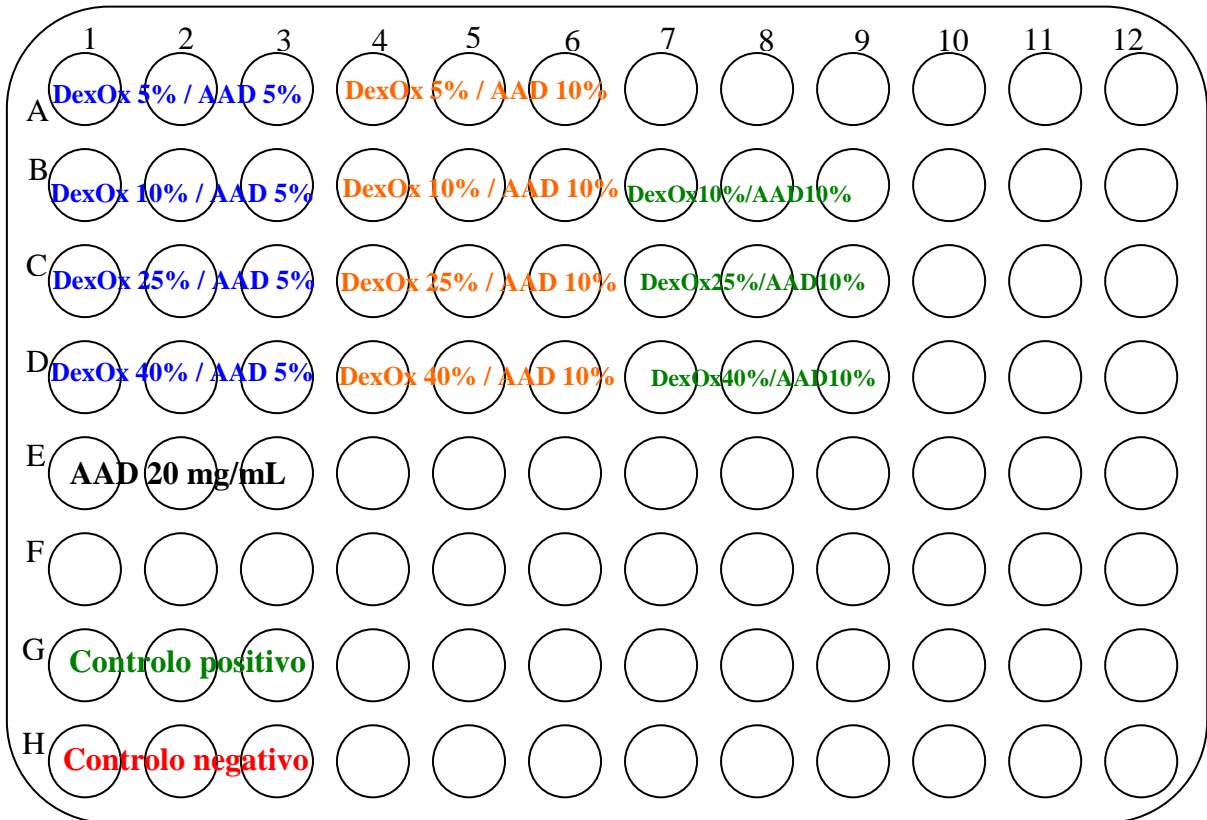


Figura 2 – Esquemas da placa com os biomateriais usadas para estudar a biocompatibilidade do dextrano nas células de músculo liso humanas.