

Resumo

Hidrogéis injectáveis iniciadores livres são muito importantes para aplicações na engenharia dos tecidos e medicina regenerativa, nomeadamente na entrega de drogas e/ou células, desde que eles possam ser administrados de um modo invasivo mínimo, sem recorrer a iniciadores químicos que poderiam ser prejudiciais. Os diferentes materiais utilizados nestas áreas são designados por biomateriais e poderão ser futuramente utilizados no tratamento clínico de danos em tecidos humanos, com o benefício de regenerar os defeitos do corpo pelo próprio tecido hospedeiro. Os biomateriais podem também servir como estruturas tridimensionais que suportam o crescimento celular.

O objectivo do presente trabalho de investigação foi avaliar a adesão e viabilidade celular em hidrogéis baseados no dextrano oxidado (dexOx) ligado com o ácido adípico dihidrazida (AAD) e/ou gelatina para futura aplicação destes biomateriais em substitutos de vasos sanguíneos. As placas de cultura contendo os biomateriais foram fornecidas pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra.

A construção eficiente de substitutos de vasos sanguíneos humanos é fortemente dependente do uso de células endoteliais viáveis e completamente funcionais. Inicialmente foram isoladas células endoteliais a partir das artérias do cordão umbilical humano, para se realizarem ensaios de biocompatibilidade nos biomateriais em estudo pelo método MTT. A presença das células endoteliais que expressam o factor *von Willebrande* e *CD144* foi confirmada por imunofluorescência.

Ao longo do presente projecto de investigação houve alguma dificuldade em isolar as células endoteliais humanas. Assim, e visto ser necessário um grande número de células para realizar os ensaios de biocompatibilidade, os ensaios MTT foram realizados com células endoteliais da córnea de coelho e com células de músculo liso humanas das artérias umbilicais.

As diferentes formulações do dexOx reticulados com AAD e/ou gelatina foram dissolvidas em PBS ou em meio de cultura apropriado para cada tipo de células usadas. Os grupos aldeído presentes no dextrano oxidado reagem com o grupo hidrazida do agente reticulante AAD, aumentando os grupos hidroxilo que vão facilitar a adesão celular ao dextrano. A gelatina foi usada como agente de estabilização dos biomateriais.

Os hidrogéis dissolvidos em meio de cultura e com baixo grau de oxidação promoveram adesão e crescimento celular. A viabilidade celular foi acima do controle positivo para todos os graus de oxidação do dextrano. Baseado nos resultados obtidos, estudos futuros serão realizados para estudar a aplicação do dextrano oxidado na preparação de substitutos de vasos sanguíneos.

Abstract

Initiator-free injectable hydrogels are very interesting for applications in tissue engineering and regenerative medicine, for drug and/or cell delivery applications, since they can be administered in a minimally invasive way, without recurring to chemical initiators that could be harmful. The different materials used in these areas are known as biomaterials and can be used, in a near future, in treatment of damage human tissues, and increase the regenerative of parts of the human body. Biomaterials can also be used as a scaffold that supports the cellular growth.

In the current work, we further characterized the oxidized dextran crosslinked with adipic acid dihydrazide hydrogels (AAD) and/or gelatine for future application of these biomaterials in substitutes of blood vessels. The plates of culture with the biomaterials were produced by Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra .

Construction of efficient substitutes of human blood vessels is strongly dependent on the use of viable and fully functional cultured endothelial cells. We started by isolating endothelial cells from human umbilical arteries, from studied assays of biocompatibility in the biomaterials from MTT assay. The presence of the endothelial cells that expressed the factor *von Willebrande e CD144* was confirmed by immunofluorescence.

During this project we had difficulties in isolating human endothelial cells. Like this, and seen to be necessary a great number of cells to accomplish the biocompatibility assays, the MTT assay were carried out through with corneal endothelial cells from rabbit and smooth muscle cells from human umbilical arteries.

The different samples of the oxidized dextran crosslinked with AAD and/or gelatin had been dissolved in PBS or appropriate culture medium to grow the different cell. The group aldehyde present in the oxidized dextran reacts with the hidrazid group of agent AAD, increasing the group hydroxyl that they go to facilitate the cellular adhesion to the dextran. The gelatine was used as agent of stabilization of the biomaterials.

Hydrogels dissolved in culture medium and from low oxidized dextrans were able to promote adhesion and cell growth. The cell viability was above the positive control for all the dextran oxidation degrees. Based on the results obtained, future studies will be performed to study the application oxidized dextran in the preparation of blood substitutes vessels.

Palavras – chave

Artéria do cordão umbilical, Biomateriais, Células do músculo liso, Células endoteliais, Cultura de células *in vitro*, Dextrano oxidado, Engenharia de tecidos, Imunofluorescência, Medicina Regenerativa, Método MTT.

Abreviaturas

AAD – ácido adípico dihidrazida

AB – antibióticos

CD144 – *VE-Cadherina*

CEC – células endoteliais da córnea de coelho

dexOx - dextrano oxidado

DMEM-F12 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium – F 12

DMSO – dimetilsulfóxido

ECs – células endoteliais

EGF – factor de crescimento epidermal

ECGF – factor de crescimento endotelial

ePTFE - politetrafluoretileno

FBS – soro fetal bovino

FGF – factor de crescimento de fibroblastos

gel 2% - gelatina 2%

hSMC - células de músculo liso humanas

HUAEC – células endoteliais das artérias do cordão umbilical humano

HUASMC – células do musculo liso das artérias do cordão umbilical humano

LDH – lactato desidrogenase

MEM – Minimum Essential medium Eagle

MTS – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H*

MTT – *3-4,5-dimethylthiazol 2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium*

NGF – factor de crescimento neural

PCL – policaprolactona

PHEMA – polihidroxietilmetacrilato

PBS – solução salina tampão

PGA – ácido poliglicólico

PLA – ácido poliláctico

PLGA – ácido poliláctico-co-glicólico

PMMA – polimetilmetacrilato

PSS – solução salina de fosfato

PVC – cloreto de polivinilo

PVS – polivinilo siloxano

SMC – células de músculo liso

SEM – Microscopia electrónica de varrimento

VEGF – factor de crescimento endotelial vascular

vW factor - factor *von Willebrand*