



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Nova abordagem terapêutica para a regeneração do Osso

**Patrícia Sofia Pinhaños Batista**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em  
**Biomedicina**  
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Ilídio Joaquim Sobreira Correia  
Co-orientadora: Prof. Doutora Maria Helena Gil

**Covilhã, maio de 2013**



Trabalho financiado pela Fundação de Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/45511/2008) no âmbito do programa QREN - POPH - Tipo 4.1 - Formação Avançada, cofinanciado pelo Fundo Social Europeu e por Fundos Nacionais do MCTES.





# Agradecimentos

Cumpro-me expressar a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Ilídio Correia, pela sua orientação, sem a qual não poderia ter sido realizado este trabalho.

À Professora Doutora Maria Helena Gil, co-orientadora desta tese, o apoio científico, a disponibilidade e a análise rigorosa desta tese.

Agradeço ao Professor Doutor João Queiroz, atual Reitor desta Universidade, por ter aprovado a execução deste trabalho.

À Doutora Daniela Silva, pelos seus ensinamentos, apoio, disponibilidade e amizade.

À Professora Doutora Paula Chaves e Doutora Odette Almeida, pelo apoio prestado na interpretação dos dados histológicos. À Engenheira Paula, pela disponibilidade para a aquisição das imagens de SEM.

Gostaria também de agradecer, pelo seu companheirismo e ajuda, a todos os elementos do CICS, Técnicas de Laboratório e Biotério, Técnicos de Informática, Professores, Colegas, Alunos de Mestrado, que estiveram presentes ao longo destes anos de trabalho. Em particular apresento os meus agradecimentos à Catarina Ferreira, ao Miguel Rodrigues pela ajuda incondicional, e às minhas duas colegas e amigas de gabinete.

Apresento também os meus agradecimentos aos colegas da Universidade de Coimbra, do Instituto Superior Técnico (IDMEC), da empresa Ceramed e do Hospital Veterinário de S. Bento com quem estabelecemos parcerias.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento do presente trabalho através da Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/45511/2008.

Agradeço aos meus amigos que de alguma forma estiveram presentes ao longo deste percurso.

E por fim, agradeço às pessoas mais especiais para mim, aos meus pais e ao meu irmão, por terem estado sempre presentes, pelo apoio constante, pelo carinho, pela paciência... Obrigada, por tudo.



# Lista de Publicações

## Artigos incluídos na tese que resultaram do trabalho Doutoral

**I. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications.**

Coimbra P, Ferreira P, Sousa HC, Batista P, Rodrigues MA, Correia IJ, Gil MH  
International Journal of Biological Macromolecules (2011), 48, 112-8.

**II. Characterization of the mechanical and biological properties of a new alumina scaffold.**

Batista PS, Rodrigues MA, Silva DM, Morgado PI, Henriques JP, Almeida MO, Silva AP, Correia IJ  
Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials (2012), doi: 10.5301/JABFM.2012.9264.

**III. The role of biomaterials in Bone Regeneration (a review).**

Batista PS, Gil MH, Correia IJ

*Submitted for publication (2013).*

## Artigos não incluídos na tese

**I. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing.**

Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Batista PS, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges J, Pires E, Chaves P, Correia I

Wound Repair and Regeneration (2009), 17, 817-24.

**II. Novel Methodology Based on Biomimetic Superhydrophobic substrates to Immobilize Cells and Proteins in Hydrogel Spheres for Applications in Bone Regeneration.**

Lima AC, Batista PS, Valente TAM, Silva AS, Correia IJ, Mano J

*Tissue Engineering Part A (2013), 19, 1175-87.*

# Lista de Comunicações Científicas

## Comunicações Científicas Orais sobre o trabalho Doutoral

**I. New therapeutic approach for bone tissue regeneration.**

*IV Annual CICS Symposium (2009). Covilhã. 7 de julho*

**II. Desenvolvimento de Novas Terapias para a Regeneração de Tecido Ósseo.**

*XXIV Encontro Nacional Técnicos de Farmácia (2010). Guarda. 23 de outubro*

## **Apresentações no formato de Poster sobre o trabalho Doutoral**

### **I. Characterization of the mechanical and biological properties of a new alumina scaffold.**

Batista PS, Rodrigues MA, Silva DM, Morgado PI, Henriques JP, Almeida MO, Silva AP, Correia IJ  
Joint Meeting 2010, X International Symposium on Experimental Techniques, I Congress of the  
Medical Society of Investigation on Complementary Therapeutics (2010). Coimbra. 1 de outubro

### **II. Composite scaffolds for bone tissue regeneration.**

Prata S, Pires E, Ribeiro MP, Batista P, Correia IJ, Novo C, Borges J P.  
9th International Conference of the European Chitin Society (2009). Veneza, Itália. 23-26 de Maio

# Resumo

O tecido ósseo é um tecido bastante complexo, responsável por diversas funções no nosso organismo, destacando-se como principal, a função de sustentação. Este tecido tem a capacidade de regenerar por si próprio, contudo, quando os defeitos ósseos são extensos, devido à ocorrência de fraturas, perdas ósseas e a doenças associadas ao tecido ósseo (Artrite Reumatoide, Doença de Paget, Osteoartrose, Osteoma, Osteoporose, etc), é necessário efetuar tratamentos clínicos. Estas patologias do tecido ósseo afetam milhões de pessoas em todo o mundo, causando uma diminuição da mobilidade do paciente e conseqüentemente da sua qualidade de vida. Por outro lado, o tratamento destas doenças tem custos associados muito elevados.

Com o objetivo de tratar as lesões deste tecido tem sido usado um elevado número de implantes (auto, alo e xeno enxertos) e outros tratamentos (preenchimento de defeitos com hidrogéis, *scaffolds*, micropartículas, administração de fármacos, bem como, implantação de próteses) de forma a restabelecer as funções anteriormente desempenhadas por este tecido. A fixação de próteses não é um processo fácil, uma vez que pode ocorrer a rejeição ou incompatibilidade por parte dos tecidos circundantes. Nestas circunstâncias o paciente tem que ser submetido a nova cirurgia, para proceder à substituição das próteses. Este processo tem como conseqüência um aumento das dores para o paciente e dos custos associados ao tratamento.

A área da Engenharia de Tecido Ósseo tem procurado desenvolver metodologias que permitam a criação do substituto ósseo “ideal”, para posteriormente ser utilizado na prática clínica. O desenvolvimento de novos biomateriais tem possibilitado a produção de novos implantes para serem usados na regeneração óssea. Contudo, o ambiente natural do tecido ósseo é extremamente complexo de recriar e nenhum dos materiais até agora desenvolvidos reproduzem completamente a estrutura nativa do osso.

O presente trabalho de investigação teve como objetivo desenvolver biomateriais que futuramente possam ser usados na regeneração óssea. Neste estudo foram selecionados diferentes materiais (hidroxiapatite, fosfatos de cálcio, quitosano, pectina, alginato e alumina) tendo por base a informação disponível na literatura existente. Os materiais escolhidos foram primeiramente caracterizados ao nível das suas propriedades químicas e mecânicas. Seguidamente, foram efetuados testes *in vitro*, para avaliar a sua biocompatibilidade e efetuados testes *in vivo* para avaliar o seu potencial de osteocondução e osteoindução. Os resultados obtidos permitiram concluir que a alumina não desencadeou um processo inflamatório agudo; o cimento ósseo desenvolvido apresenta vantagens de ser um injetável e possui propriedades adequadas para a sua aplicação em preenchimentos ósseos; a combinação de polissacarídeos naturais permitiu a criação de estruturas porosas, biodegradáveis, biocompatíveis, com uma estrutura semelhante à matriz extracelular e com propriedades mecânicas adequadas à sua utilização na regeneração óssea.

Deste modo, existiu uma preocupação constante na seleção dos materiais que iriam ser utilizados, assim como nas técnicas de processamento. Estas são um instrumento fundamental para a engenharia de tecidos, uma vez que a estrutura física do biomaterial deve reproduzir a da matriz extracelular óssea, conferindo além de um suporte com resistência mecânica, uma elevada porosidade que permita a circulação de fluídos. Deste modo, neste trabalho os andaimes produzidos por impressão 3D reproduzem a estrutura nativa do osso e desta forma poderão ser usados num futuro próximo na regeneração óssea.

## Palavras-chave

Tecido ósseo, andaimes, materiais cerâmicos, quitosano, alumina, engenharia de tecido ósseo, biocompatibilidade, osteocondução

# Abstract

The bone tissue is quite complex and it plays different functions in our body, especially it serve as the body's supporting framework. This tissue has the ability to regenerate on its own, however, when bone lesions are severe, caused by fractures and diseases associated with bone tissue (osteoarthritis, rheumatoid arthritis, osteoporosis, osteome, Paget's disease, etc.) clinical treatments are needed. These pathologies affect millions of people worldwide every year. These illnesses are caused by aging, birth defects, disease, trauma and are associated with reduced ability of bone to regenerate spontaneously. The lesions of bone tissue diminish the patient's mobility and quality of life, and their treatment has a high cost associated.

A high number of implants (auto, allo and xeno implants) and other treatments (filling defects with hydrogels, *scaffolds*, microparticles, drug delivery, as well as prosthesis implantation) have been proposed for the treatment of bone injuries, in order to reestablish their native properties and functions. The prostheses implantation is not at all easy process and it may trigger immunne response by the surrounding tissues. In these situations the patient has to undergo another surgery for replacement of the prosthesis. This process results in increased pain for patient and increase the costs associated with treatment.

Thus, for Bone Tissue Engineering has been focused on the development of methodologies that allow the creation of a "perfect" bone substitute, to be used in clinical practice. The development of biomaterials contributed for the production of implants that in near future may be used for promoting. However, the natural bone tissue is very complex and none of the materials developed so far can completely reproduce the native structure of bone.

This research work aimed to develop biomaterials that can be used in bone regeneration. In this study we selected different materials (hydroxyapatite, calcium phosphates, chitosan, pectin, alginate and alumina) based on the information available in the literature. In the first stage of this study, the chemical and mechanical properties of the materials were characterized. Subsequently, *in vitro* assays were performed to evaluate the biocompatibility of biomaterials and its potential for osteoconduction and osteoinduction was tested under *in vivo* conditions. The results showed that the alumina did not trigger any severe immune response, bone cement developed was injectable and has the suitable properties for being used in bone regeneration; the combination of natural polysaccharides enables the creation of porous structures, with mechanical resistance.

Thus, there was a constant concern in the selection of materials that would be used and the processing techniques. These techniques are an essential tool for tissue engineering, since it is desirable that the produced scaffolds have a similar structure to that of extracellular matrix of bone, confers mechanical support, high porosity to allow the circulation of fluids. Thus, in this

study 3D printing was used for scaffolds production in order to mimic the bone native structure and allows its regeneration.

After analyzing the results obtained with the different biomaterials used during this PhD worplan, it was concluded that they are good candidates for being used in regenerative medicine. However, to produced the “perfect” bone substitute, more work needs to be done in order to fully characterized and also improve/the properties of the scaffolds used.

## **Keywords**

Bone tissue, scaffolds, ceramics, chitosan, alumin, bone tissue engineering, biocompatibility, osteoconduction

# Preâmbulo

Ao longo deste trabalho de investigação foram desenvolvidos e caracterizados diferentes biomateriais para posterior aplicação na Engenharia de Tecido Ósseo.

Este trabalho encontra-se dividido em sete capítulos.

O primeiro capítulo inclui o objetivo geral estabelecido para o desenvolvimento do presente estudo.

Subsequentemente, o segundo capítulo corresponde a uma revisão concisa da literatura relacionada com o conhecimento do tecido ósseo e a importância de biomateriais para aplicação na Engenharia de Tecido Ósseo, tendo em vista a melhoria da qualidade de vida de pacientes que sofrem de lesões deste tecido, causados por doença ou trauma.

O terceiro, quarto, quinto e sexto capítulos são dedicados à apresentação do trabalho experimental efetuado, resultados e discussão dos mesmos. Estes capítulos dizem respeito ao desenvolvimento e caracterização de diferentes biomateriais estudados. Cada um destes capítulos é iniciado por uma introdução teórica, onde são apresentados e discutidos alguns aspetos importantes diretamente relacionados com o trabalho experimental e posteriormente segue-se a descrição dos resultados e sua discussão.

Finalmente o sétimo capítulo sintetiza os resultados e conclusões obtidas ao longo das diferentes etapas do trabalho realizado. Por outro lado são apresentadas sugestões para estudos futuros.



# Índice

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Acrónimos	xxi
<b>Capítulo 1</b>	<b>1</b>
Objetivos Gerais	3
<b>Capítulo 2</b>	<b>5</b>
Introdução	7
1. Tecido Ósseo e Osteogénese	8
1.1 Constituição do Tecido Ósseo	8
1.2 Funções do Tecido Ósseo	11
1.3 Osteogénese	12
1.4 Regeneração Óssea	13
2. Engenharia de Tecidos aplicada à regeneração do Tecido Ósseo	16
3. Biomateriais	20
3.1 Propriedades dos Biomateriais	23
3.2 Classificação dos Materiais quanto à origem	25
4. Aplicação Clínica dos Biomateriais desenvolvidos pela Engenharia de Tecido Ósseo	33
5. Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	34
5.1 Caracterização da biocompatibilidade dos materiais <i>in vitro</i>	34
5.2 Caracterização da biocompatibilidade dos materiais <i>in vivo</i>	37
6. Referências Bibliográficas	39
<b>Capítulo 3</b>	<b>51</b>
Caracterização das propriedades mecânicas e biológicas do <i>scaffold</i> de Alumina	53
<b>Capítulo 4</b>	<b>67</b>
Caracterização Biológica do Complexo Polielectrolítico Pectina/Quitossano para uma possível aplicação na Engenharia de Tecido Ósseo	69
<b>Capítulo 5</b>	<b>79</b>
Caracterização de <i>scaffolds</i> de Hidroxiapatite produzidos por impressão 3D	81
<b>Capítulo 6</b>	<b>95</b>
Caracterização de um substituto ósseo injetável	97
<b>Capítulo 7</b>	<b>105</b>
Discussão, Conclusão e Perspetivas Futuras	107
<b>Anexo</b>	<b>111</b>



# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação da arquitetura geral de um osso longo. _____	9
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática dos elementos intervenientes na Engenharia de Tecido Ósseo. _____	17
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da variedade de biomateriais que podem ser usados na Engenharia de Tecido Ósseo. _____	20
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da evolução dos biomateriais nos últimos anos. _____	21
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do Colagénio. _____	25
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do Quitosano. _____	26
<b>Figura 7.</b> Estrutura química da Pectina. _____	28
<b>Figura 8.</b> Complexo polielectrolítico de pectina e quitosano. _____	28
<b>Figura 9.</b> Representação da estrutura química do Alginato. _____	29
<b>Figura 10.</b> Representação da estrutura química da hidroxiapatite com o cálcio como átomo central. _____	31
<b>Figura 11.</b> Estrutura química da Alumina. _____	32
<b>Figura 12.</b> Caracterização da estrutura macroscópica do <i>scaffold</i> de alumina. _____	58
<b>Figura 13.</b> Imagens de microscopia ótica de células CRL-11372 em contacto com o <i>scaffold</i> de alumina. _____	59
<b>Figura 14.</b> Imagem obtida de MEV, de um osteoblasto humano (CRL-11372) na superfície do <i>scaffold</i> , após 3 dias em cultura. _____	59
<b>Figura 15.</b> Imagens histológicas do tecido ósseo da calote de rato após 7 e 30 dias. _____	60
<b>Figura 16.</b> Representação esquemática da reação de complexação da pectina com o quitosano. _____	73
<b>Figura 17.</b> Imagens de MEV de osteoblastos humanos aderidos à superfície dos <i>scaffolds</i> . _____	74
<b>Figura 18.</b> Imagens de microscopia ótica de osteoblastos após terem sido semeados na superfície de <i>scaffolds</i> de pectina-quitosano após 24h. _____	74
<b>Figura 19.</b> Avaliação da viabilidade celular medida na presença de <i>scaffolds</i> Pectina/QT pelo ensaio de MTT. _____	75
<b>Figura 20.</b> Imagens dos <i>scaffolds</i> de hidroxiapatite produzidos por impressão 3D e sinterizados a diferentes temperaturas. _____	83

<b>Figura 21.</b> Imagens de microscopia ótica de osteoblastos semeados na superfície dos <i>scaffolds</i> e na ausência dos mesmos. _____	87 e 88
<b>Figura 22.</b> Avaliação da viabilidade celular CRL-11372 através do ensaio de MTS, após 24 e 72h, na presença dos diferentes <i>scaffolds</i> de hidroxiapatite. _____	89
<b>Figura 23.</b> Imagens de MEV de CRL-11372 na superfície dos <i>scaffolds</i> em estudo. _____	90 e 91
<b>Figura 24.</b> Avaliação da biocompatibilidade dos materiais através de ensaios <i>in vivo</i> . _____	91
<b>Figura 25.</b> Imagens histológicas do tecido ósseo da calote de rato após 10 e 60 dias. _____	92
<b>Figura 26.</b> Imagens macroscópicas e microscópicas do substituto ósseo injetável. _____	101
<b>Figura 27.</b> Imagens de microscopia ótica de células CRL-11372 em contacto com o substituto ósseo injetável e na ausência do <i>scaffold</i> (B e C). Avaliação da viabilidade celular na presença do substituto ósseo injectável. _____	101
<b>Figura 28.</b> Imagem obtida por MEV, onde se observa a presença CRL-11372 na superfície do <i>scaffold</i> ao fim de 3 dias. _____	102

# Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Propriedades mecânicas do osso compacto (cortical) e esponjoso (trabecular). \_\_\_\_\_ 9

**Tabela 2.** Classes de biomateriais utilizados como substitutos ósseos: principais propriedades e aplicações. \_\_\_\_\_ 34

**Tabela 3.** Propriedades dos *scaffolds* de alumina. \_\_\_\_\_ 58



# Lista de Acrónimos

ETO	Engenharia de Tecido Ósseo
3D	Tridimensional
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Fosfato
MEO	Matriz extracelular óssea
FCT-β	Fator de crescimento transformante β
FCI	Fator de crescimento tipo insulina
FCF	Fator de crescimento fibroblástico
bFCF	Fator de crescimento fibroblástico básico
aFCF	Fator de crescimento fibroblástico ácido
FCDP	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PMO	Proteínas morfogénicas ósseas
HA	Hidroxiapatite
FA	Fosfatase alcalina
ME	Matriz extracelular
HPT	Hormona da paratiróide
FCs	Fatores de crescimento
FCEV	Fator de crescimento endotelial vascular
PCL	Policaprolactona
APLG	Ácido Poli (láctico-co-glicólico)
QT	Quitossano
APG	Ácido Poliglicólico
APL	Ácido Poliláctido
CPhC	Cerâmicas de Fosfato de Cálcio
TCPH	Tricálcio fosfato
PhC	Fosfato de cálcio
RGD	Sequência peptídica (Arginina-Glicina-Aspartato)
PEG	Polietileno glicol
AlH <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Alumina
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide)
formazano	1-[4,5-dimetiltiazol2-yl]-3,5 difenilformazano
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-5-(3-carboxymetyhoxyphenyl)-2(4-sulfofenil)-2H tetrazólio)
LDH	Lactato desidrogenase
PMS	Fenazina metosulfato
HCl	Ácido clorídrico
MO	Microscópio Ótico
MEV	Microscópio Eletrónico de Varrimento
DGAV	Direcção Geral de Alimentação e Veterinária
CRL - 11372	Linhagem celular de osteoblastos
DMEM-F12	Meio de cultura celular Dulbecco's modified Eagle's medium
EtOH	Etanol
PBS	Solução salina de fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
SFB	Soro Fetal Bovino

T-flasks	Frasco de cultura celular
AES	Área específica de superfície
MOR	Módulo de rutura
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CPEs	Complexo polielectrólito
CICS	Centro de Investigação de Ciências da Saúde
IDMEC	Centro de Tecnologia Mecânica e Gestão Industrial - Instituto Superior Técnico
PR	Prototipagem rápida
I3D	Impressão a três dimensões
MIT	Instituto de Tecnologia Massachusetts

# Capítulo 1



## Objetivos Gerais

O objetivo principal do plano de trabalhos de doutoramento consistiu no desenvolvimento de biomateriais para aplicação na medicina regenerativa, mais propriamente na reparação/regeneração do tecido ósseo. Deste modo, o estudo incidiu sobre o desenvolvimento e caracterização das propriedades biológicas dos diferentes biomateriais.

De acordo com estes objetivos globais, o trabalho foi desenvolvido respeitando as seguintes etapas:

1. Desenvolvimento de biomateriais.
2. Caracterização dos biomateriais, ao nível das propriedades químicas e mecânicas.
3. Avaliação das suas propriedades biológicas através de estudos *in vitro* e *in vivo*.



## Capítulo 2



# Introdução

O crescente envelhecimento da população mundial e o aumento da prática de desportos radicais têm contribuído para o aumento do número de pacientes afetados por doenças relacionadas com o tecido ósseo. Diferentes patologias como sejam a Osteoartrose, Artrite Reumatoide, Osteomalacia, Osteoporose, Osteopetrose, Osteoma, Doença de Paget, provocam a degradação e desgaste do tecido ósseo e afetam indivíduos de todas as faixas etárias. Com o intuito de tratar estas e outras patologias, todos os anos, milhões de pacientes em todo o mundo são submetidos a enxertos ósseos, para reparar defeitos ósseos (Bohner, 2010). A perda óssea ocorrer devido a um processo inflamatório intenso, a uma má nutrição do indivíduo, da imobilidade, ou mesmo do efeito de tratamentos (especialmente glicocorticóides). Por outro lado, as lacunas ósseas podem ser causadas por traumatismos, afetando indivíduos de todas as idades. Habitualmente as reparações ósseas envolvem períodos de tempo longo e na grande maioria dos casos, quando apresentam dimensões consideráveis não conseguem ser reparadas pelo próprio tecido, necessitando de intervenção cirúrgica. Deste modo, é de salientar que o transplante ósseo é o segundo maior transplante presentemente efetuado no ser humano (Ben-David *et al.*, 2011). Devido a este facto, nas últimas quatro décadas, tem aumentado o interesse no desenvolvimento e produção de novos biomateriais para serem usados no desenvolvimento de dispositivos médicos, com o intuito de reparar/regenerar este tecido, de forma a restaurar as suas funções nativas (Venkatesana *et al.*, 2011).

Na prática clínica, o procedimento mais utilizado é um transplante proveniente do próprio indivíduo (auto-enxerto), podendo eventualmente serem efetuados transplantes de outros indivíduos (alo-enxerto) ou de outras espécies (xeno-enxerto) (Mahendra e Maclean, 2007; Miranda *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2010; Zaborowska *et al.*, 2010; Beswick e Blom, 2011; Hannink e Arts, 2011). O osso autólogo é o material de enxerto ósseo mais conveniente para o tratamento de doenças que afectam este tecido (Dimitriou *et al.*, 2011). Contudo, a consolidação do enxerto é um processo biológico complexo, que depende da formação de vasos sanguíneos na área da lesão (Pérez-Sánchez *et al.*, 2010). No entanto, este tipo de enxertos (autólogos), podem apresentar complicações na recolha de tecido ósseo, tais como: limitações na área doadora, necessidade de uma cirurgia adicional, transmissão de doenças/agentes patogénicos, rejeições imunogénicas, hemorragia, hematoma, infeção, dor crónica, custos associados elevados. Tais situações revelam a necessidade premente de se desenvolverem alternativas viáveis (Eniwumide *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Swetha *et al.*, 2010; Glotzbach *et al.*, 2011; O'Brien, 2011; Venkatesana *et al.*, 2011). Os alo-enxertos ou xeno-enxertos não são tão usados devido a uma maior incidência de rejeições imunogénicas, infeções, transmissão de doenças/agentes patogénicos e mesmo devido a questões éticas (Zhang *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a Engenharia de Tecido Ósseo (ETO), tem permitido o desenvolvimento de novos biomateriais para serem usados na regeneração óssea, tendo em conta, a compreensão dos processos biológicos (nomeadamente do metabolismo ósseo), a projeção e funcionalização de matrizes de suporte (“*scaffolds*”). O desenvolvimento de estruturas tridimensionais (3D) permitem auxiliar/substituir o tecido ósseo lesado e recriar um microambiente celular que permita regular as

funções celulares essenciais (tais como, adesão, proliferação e diferenciação. A regulação destes mecanismos é fundamental para o processo de regeneração óssea.

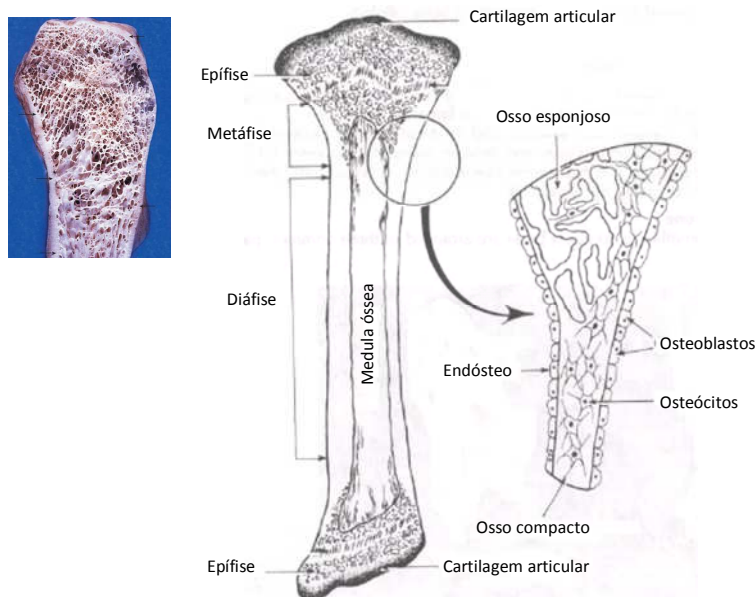
Deste modo, a seleção de diferentes tipos de materiais (sintéticos, naturais ou ambos), a produção (estrutura, design e organização) e o estudo da adesão celular à superfície dos materiais são fundamentais para a ETO. O desenvolvimento de novos substitutos é crucial para melhorar a sua eficácia em meio clínico, assim como permitir a substituição dos implantes autólogos, ou dos alo ou xeno enxertos atualmente usados (Griffith e Naughton, 2002; Ma, 2004; Healy e Guldberg, 2007; Hutmacher *et al.*, 2007; Belluci *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2011; Ben-David *et al.*, 2011; Glotzbach *et al.*, 2011; Monaco *et al.*, 2011). Do mesmo modo, esta estratégia permitirá solucionar a maioria dos problemas adjacentes à implantação de próteses, quer ao nível da rejeição ou incompatibilidade com tecidos circundantes, quer ao nível da redução de custos e melhoria da qualidade de vida do paciente, que muitas vezes é sujeito a várias cirurgias para extração ou substituição destes dispositivos.

# 1. Tecido Ósseo e Osteogénese

## 1.1 Constituição do Tecido Ósseo

O tecido ósseo pode ser classificado de acordo com as suas características macroscópicas em compacto (cortical) e esponjoso (trabecular) (Arellano, 2006; Kierszenbaum, 2008; Muhonen, 2008). É de salientar que o osso compacto, se encontra nas diáfises dos ossos longos e na zona externa da maioria dos ossos (Cabrita, 1993; Carrascal, 2001; Kierszenbaum, 2008; Muhonen, 2008; Vallet-Regí e Ruiz-Hernández, 2011). Por sua vez, o osso esponjoso encontra-se localizado na zona interna da maioria dos ossos, ao nível das metáfises e epífises dos ossos longos e na região central da maioria dos ossos planos e irregulares, formando uma rede de trabéculas ósseas (Cabrita, 1993; Carrascal, 2001; Kierszenbaum, 2008; Muhonen, 2008; Vallet-Regí e Ruiz-Hernández, 2011). Os ossos longos encontram-se subdivididos em três zonas (Figura 1): (i) epífises, que são as extremidades dos ossos longos, constituídas por tecido ósseo esponjoso rodeado por uma fina camada de tecido ósseo compacto, normalmente revestido por cartilagem articular; (ii) metáfises, que se encontram entre estas e a zona intermédia, sendo constituídas por abundante tecido ósseo esponjoso rodeado por tecido ósseo compacto (durante a fase de crescimento encontram-se separadas das epífises pela placa epifisária de crescimento); (iii) diáfise, uma estrutura cilíndrica, onde o córtex é constituído por tecido ósseo compacto e a cavidade medular central por medula óssea e algum tecido ósseo esponjoso (Dias, 2004; Arellano, 2006).

O osso compacto é formado por uma estrutura densa com elevada resistência mecânica, conferindo-lhe funções mecânicas e de proteção, enquanto que, o osso esponjoso é menos denso e apresenta menor resistência mecânica (em comparação com o osso compacto). Este tecido possui uma estrutura porosa e desempenha funções metabólicas (nomeadamente na homeostase dos iões de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ) e de suporte (Figura 1, Tabela 1).



**Figura 1.** Representação da arquitetura geral de um osso longo (adaptado de Johnson *et al.*, 1991 e Ross *et al.*, 2011).

**Tabela 1.** Propriedades mecânicas do osso compacto (cortical) e esponjoso (trabecular) (Hench e Wilson, 1993; Laurencin e Nair, 2008).

<b>Propriedades</b>	<b>Osso Compacto</b>	<b>Osso Esponjoso</b>
<b>Resistência à compressão [MPa]</b>	170-193	7-10
<b>Resistência à tração e flexão [MPa]</b>	50-150	10-20
<b>Limite de fratura</b>	1-3	5-7
<b>Modulo de Young's [GPa]</b>	14-20	0,05-0,5

A superfície externa do osso é revestida por uma camada fibrocelular denominada perióstio, apresentando a sua superfície interna uma estrutura semelhante, denominada endóstio. O perióstio é formado por uma membrana de tecido conjuntivo vascularizada que apresenta uma camada externa fibrosa (que desempenha uma função de suporte e aporte sanguíneo e nervoso à superfície do tecido ósseo compacto) e uma camada interna osteogénica, formada por células osteoprogenitoras (que desempenham um papel fundamental no crescimento e regeneração óssea). O endóstio é considerado como uma camada periférica condensada do estroma da medula óssea. Tal como o perióstio também possui células osteoprogenitoras e o seu próprio sistema vascular, apresenta um potencial osteogénico e hematopoiético. O endóstio encontra-se envolvido na regeneração, sendo uma fonte de células osteoprogenitoras capazes de se diferenciarem em osteoblastos e tem ainda a função de restabelecer o suprimento sanguíneo à área em regeneração (Dias, 2004).

A principal função do endóstio e do perióstio é a nutrição do tecido ósseo, contribuindo também as células presentes no seu interior no processo regenerativo e de remodelação óssea (Afonso, 1998; Junqueira e Carneiro, 1999; Kierszenbaum, 2008).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado que é constituído por células e por uma matriz orgânica firme, constituída por depósitos de sais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , com a característica exclusiva de mineralizar (Kierszenbaum, 2008). O osso é composto aproximadamente por 70% de minerais, 22% de proteínas e 8% de água (Muhonen, 2008). Este tecido apresenta um

grande volume de matriz extracelular óssea (MEO) para o número de células que o constitui (Cabrita, 1993). A MEO constitui cerca de 90% do peso total do osso compacto e é formada por matéria orgânica (35%) e matéria inorgânica (65%) (Martin *et al.*, 1988; Eurel e Van Sickle, 1998; Kierszenbaum, 2008; Muhonen, 2008). A matriz apresenta como constituintes orgânicos principais: 90% de colagénio (tipo I (95%) e tipo V (5%)), proteoglicanos (ricos em sulfato de condroitina, sulfato de queratina e ácido hialurónico), proteínas não colagénicas da matriz (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, glicoproteínas, proteoglicanos, fator de crescimento transformante  $\beta$  (FCT- $\beta$ ), fator de crescimento tipo insulina (FCI), fator de crescimento fibroblástico (FCF), fator de crescimento derivado das plaquetas (FCDP) e as várias proteínas morfogenéticas ósseas (PMOs) e como constituintes inorgânicos: os compostos de  $\text{Ca}^{2+}$  e de  $\text{PO}_4^{3-}$  que se depositam sob a forma de cristais de hidroxiapatite (HA), e de compostos amorfos de fosfato de cálcio (hidrogenofosfato de cálcio) (Parfitt, 1993; Puzas, 1993; Fernandes, 1998; Dias, 2004; Kierszenbaum, 2008; Muhonen, 2008; Mateus, 2010).

A população celular ativa presente neste tecido tem como função regular o metabolismo ósseo, assim como, promover a remodelação contínua do tecido. Existem quatro tipos de células fundamentais neste tecido: osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos.

Os osteoblastos, osteócitos e células de revestimento encontram-se localizados a nível da camada interna do perióstio e da medula óssea (Figura 1). Estas células são responsáveis pela formação do tecido ósseo, durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, remodelação, reparação da lesão (Cabral, 2004). Os osteoblastos estão envolvidos na síntese da matriz orgânica descalcificada, principalmente constituída por colagénio do tipo I, chamado osteóide. Neste processo, produz-se grande quantidade de fosfatase alcalina (FA), enzima necessária para que ocorra o processo da mineralização óssea (Kierszenbaum, 2008).

Os osteócitos derivam dos osteoblastos e estão rodeados pela matriz óssea, ocupando pequenos espaços no interior do osso, designados por lacunas. Estas células ligam-se às células adjacentes por prolongamentos citoplasmáticos através da matriz mineralizada (Kierszenbaum, 2008). Os osteócitos são responsáveis pela síntese e manutenção da matriz do osso; efetuam trocas metabólicas e regulam a homeostase de cálcio no sangue (Ross, 2011).

Por sua vez, as células de revestimento ósseo, que permanecem ao longo da vida pós-natal, têm um papel importante na diferenciação de células mesenquimais, na regulação da homeostasia mineral e segundo alguns autores, podem produzir colagenase (enzima com capacidade de digerir a matriz extracelular (ME)) e preparar a reabsorção osteoclástica (Martin *et al.*, 1993; Halsey *et al.*, 1997).

Os osteoclastos são células que produzem enzimas (tais como a fosfatase ácida) que são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, contudo, também participam na manutenção a longo prazo da homeostasia do cálcio sanguíneo (Fernandes, 1998; Junqueira e Carneiro, 1999).

Deste modo, o tecido ósseo é mantido através da atividade conjunta das células que formam o osso e as que o reabsorvem. Pode dizer-se que o tecido ósseo está continuamente num processo de remodelação, adaptando-se e criando uma estrutura otimizada de forma a suportar as cargas habituais a que se encontra sujeito ou a reparar lesões que possam surgir. Assim, qualquer desregulação da atividade do tecido, como por exemplo uma reabsorção excessiva, pode levar ao aparecimento de patologias (osteoporose, osteoartrites, periodontites, osteossarcomas, etc.).

O tecido ósseo está ainda envolvido na produção de células hematopoiéticas e de células do sistema imunitário.

## 1.2 Funções do Tecido Ósseo

O tecido ósseo apresenta várias funções de extrema importância no corpo humano, tais como:

- Sustentação e proteção - constitui o esqueleto que serve de apoio às partes moles e órgãos internos vitais e é onde se inserem os músculos, ligamentos e tendões necessários à locomoção (Cabrita, 1993). Por outro lado, este tecido está também envolvido na proteção do sistema nervoso central e medula óssea. Esta função torna-se possível devido à existência de uma ME mineralizada, que lhe confere dureza e resistência necessárias, bem como, elasticidade, uma vez que permite suportar até certo ponto forças de compressão e tração sem sofrer lesão (Batista, 2009).

- Constitui uma reserva de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  sendo que a concentração destes íons é fundamental nas reações fisiológicas que ocorrem no organismo vivo (Cabrita, 1993). A homeostase do cálcio é controlada através do intercâmbio constante entre o cálcio do plasma sanguíneo e os ossos (Noronha, 2005). O íon cálcio desempenha um papel fundamental na contração muscular, na transmissão dos impulsos nervosos e em toda a cascata de coagulação sanguínea (Batista, 2009). No caso do tecido ósseo onde estes íons são acumulados em grandes quantidades, é fundamental referir a importância da hormona da paratiróide (HPT) como mediadora da remodelação óssea, uma vez que permite manter os níveis de cálcio, estimulando tanto a reabsorção, como a formação óssea (Noronha, 2005). A HPT aumenta ainda a reabsorção tubular de cálcio ao nível dos rins, ao mesmo tempo que diminui a reabsorção de fosfato. Esta função é fundamental para evitar a perda contínua de cálcio na urina. Tal situação, levaria eventualmente à diminuição deste mineral no tecido ósseo. Contudo, uma produção excessiva desta hormona provoca intensa reabsorção óssea, aumento da concentração de cálcio no sangue e deposição anormal deste mineral em vários órgãos, principalmente rins e parede das artérias. Deste modo, em situações patológicas os sais de cálcio podem precipitar em outros tecidos, para além do osso.

É deste modo importante, salientar o efeito permutável do cálcio, de modo a evitar que a concentração destes íons nos líquidos extracelulares seja elevada ou diminua abruptamente, em condições transitórias de excesso ou de menor disponibilidade de cálcio. A mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo tecido ósseo funciona, assim, como um tampão homeostático, uma vez que o aporte do cálcio pode variar com a dieta ou por influência exercida pelo estado hormonal do organismo (Dias, 2004). A carência alimentar deste mineral e a alteração hormonal que mulheres sofrem na menopausa causam a descalcificação óssea. Esta descalcificação óssea aumenta a fragilidade óssea e a propensão a fraturas. Assim, variações acentuadas (aumento ou carência) de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  podem causar efeitos extremos e imediatos, diminuindo acentuadamente a mineralização e/ou a deposição de cálcio em excesso noutros tecidos.

- Este tecido está também envolvido na hematopoiese, que permite a formação, desenvolvimento e maturação das células do sangue na medula óssea. Nos adultos, a hematopoiese ocorre no tecido ósseo esponjoso, por exemplo na crista ilíaca, no fémur proximal e nas vertebrae. Estes ossos apresentam também uma renovação óssea rápida e devido à sua extensa área de

superfície desempenham um importante papel no controlo a longo prazo do teor de cálcio (Mateus, 2010).

- Locomoção - O esqueleto é constituído por tecido ósseo e em conjunto com o tecido muscular envolvente permite o controlo e a orientação dos movimentos (Mateus, 2010).

- O tecido ósseo atua também no tamponamento do sangue aquando de alterações abruptas de pH, mediante absorção ou libertação de iões. Além disso, o tecido ósseo pode armazenar metais pesados que são retirados do sangue, para posteriormente serem excretados, reduzindo assim o seu efeito sobre outros tecidos (Mateus, 2010).

### 1.3 Osteogénese

A formação do tecido ósseo (osteogénese ou ossificação) ocorre durante a fase fetal, através de dois processos de formação: ossificação intramembranosa, na qual o tecido ósseo é depositado diretamente sobre o tecido conjuntivo primitivo ou mesênquima e a ossificação endocondral, na qual o tecido ósseo substitui uma cartilagem hialina pré-existente, sendo esta, o molde ou primórdio do futuro osso (Kierszenbaum, 2008; Batista, 2009; Fontes, 2010; Mateus, 2010; Lienemann *et al.*, 2012). Tanto na ossificação intramembranosa como na endocondral, o primeiro tecido ósseo formado é do tipo primário ou imaturo. Este tecido é posteriormente substituído pelo tecido secundário (também designado de maduro ou lamelar). Estes tecidos têm a mesma composição (as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz), apenas diferem na distribuição das fibras de colagénio, que no tecido primário se encontram dispostas irregularmente, sem orientação definida, ao contrário da sua disposição no tecido secundário. Deste modo, durante o crescimento ósseo podem ser observadas áreas de tecido primário, áreas de reabsorção óssea e áreas de tecido secundário. Assim, uma combinação de formação e remoção de tecido ocorre durante o crescimento do osso.

A ossificação intramembranosa ocorre nos ossos chatos do crânio e alguns dos ossos irregulares (Kierszenbaum, 2008; Mateus, 2010, Ross, 2011). Como o próprio nome indica, este processo de ossificação tem início no interior das membranas do tecido conjuntivo, onde as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Estes sintetizam o osteóide (matriz não mineralizada) que vai mineralizar e formar os osteócitos. Deste modo, são formados vários grupos no centro de ossificação, havendo confluência de trabéculas ósseas e o osso fica com um aspeto esponjoso. Entre as trabéculas formam-se cavidades onde existem vasos sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas, que irão dar origem à medula óssea. Os centros de ossificação crescem radialmente acabando por substituir a membrana conjuntiva pré-existente. A membrana conjuntiva que não sofre ossificação, passa a constituir o endóstio e o perióstio (Junqueira e Carneiro, 1999; Katja e Marieb, 2007; Mateus, 2010).

Na ossificação endocondral, ocorre aquando da formação dos ossos curtos e longos, através da substituição da cartilagem hialina por tecido ósseo. No caso dos ossos curtos, primeiro a cartilagem hialina sofre modificações, sendo as cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos invadidas por vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras vindas do tecido conjuntivo adjacente. Estas células diferenciam-se em osteoblastos que vão depositar matriz óssea. Os novos ossos são formados tendo por base os modelos de cartilagem hialina. No caso dos ossos longos, o molde

cartilágneo possui uma parte média estreita e duas extremidades dilatadas (correspondendo respetivamente à diáfise e às epífises do futuro osso). Posteriormente, forma-se o pericôndrio (membrana de tecido conjuntivo fibroso) que envolve as cartilagens hialinas. Quando a cartilagem amadurece, ela sofre de hipertrofia. Depois de mineralizar é invadida por vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos e formam a matriz osteóide. Surgem mudanças no periósteo, uma vez que os osteoblastos formam um colar de osso compacto em torno da diáfise e da cartilagem, começando a haver desintegração no centro da diáfise. Depois, os osteoblastos penetram na cartilagem desintegrada para substituir o osso esponjoso, formando desta forma o centro de ossificação primária que é contínua a partir desse centro. Consecutivamente, o osso esponjoso é formado na diáfise. A matriz óssea inicial, na maior parte do tecido ósseo, é removida por osteoclastos e é substituída por osso lamelar, tornando-se uma matriz muito organizada, formando predominantemente o osso saudável presente no indivíduo adulto (Mateus, 2010). Logo após o nascimento a cartilagem nas epífises continua a crescer, aumentando em comprimento e o centro secundário de ossificação das epífises. Quando a ossificação secundária é concluída, a cartilagem hialina é totalmente substituída por osso, exceto em duas áreas: na superfície da epífise e entre a epífise e a diáfise, nestes locais o osso pode continuar a crescer até aos cerca de 20 anos, sofrendo à *posterior* apenas processos de remodelação (Kierszenbaum, 2008; Mateus, 2010).

## 1.4 Regeneração Óssea

A regeneração óssea, desde a fase da lesão à remodelação final, envolve uma série de processos: migração, diferenciação, proliferação celular e síntese da MEO (Fischer *et al.*, 2011). Tanto a regeneração óssea, como a remodelação óssea, são processos altamente dinâmicos, regidos por complexos mecanismos celulares e moleculares.

O processo de remodelação óssea vai ocorrendo ao longo da vida de forma gradual e mantendo a homeostase. Contudo, com a idade a perda da densidade óssea vai-se agravando devido ao número de osteoclastos aumentar, fruto de uma alteração hormonal. Assim, o tecido lesado tem dificuldades em se restituir começando a surgir doenças ósseas, tais como a osteoporose. Do mesmo modo, quando ocorre uma lesão do tecido, resultante de trauma ou doença (Osteoartrose, Artrite Reumatoide, Osteomalacia, Osteopetrose, Osteoma, Doença de Paget, etc.), o processo de reparação torna-se mais complexo e é necessário o recurso à prática cirúrgica ou efetuar tratamentos específicos.

Deste modo, para a execução dos processos de regeneração/reparação/remodelação do tecido lesado é fundamental a presença de moléculas bioativas, de forma a possibilitarem a articulação entre os processos de reabsorção e a formação do novo tecido ósseo. A terapia proteica tem vindo a mostrar-se promissora na prática clínica (Khojasteh *et al.*, 2012a). Assim, tem vindo a ser aprofundado o conhecimento dos fatores de crescimento (FCs), uma vez que, estes péptidos ou glicoproteínas intervêm nos processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação, crescimento, proliferação, síntese de proteínas em culturas osteoblásticas e produção de MEO pelas células (Solheim, 1998; Suárez-González *et al.*, 2012). Os FCs desempenham um papel fundamental na formação do tecido ósseo e podem ser usados para promover ativamente a formação/reparação óssea (Solheim, 1998; Suárez-González *et al.*, 2012). Estas biomoléculas

podem atuar como fatores endócrinos, parácrinos ou autócrinos de forma a ativar recetores específicos da superfície celular e estimular a atividade celular (Herndon *et al.*, 1992).

As proteínas morfogenéticas ósseas (PMOs), fator de crescimento transformante beta (FCT- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (FCI-I e FCI-II), fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), fator de crescimento fibroblástico básico e ácido (bFCF e aFCF) e fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) constituem exemplos de factores de crescimento que podem ser usados na regeneração óssea (Puppi *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Suárez-González *et al.*, 2012, Tsuzuki *et al.*, 2012; Vo *et al.*, 2012).

As PMOs são importantes no desenvolvimento embrionário e na formação óssea precoce, no processo de cicatrização de fraturas, estimulam a maturação dos osteoblastos, induzem a proliferação e diferenciação de células precursoras em osteoblastos promovendo a formação/regeneração óssea. Devido a estas propriedades, as PMOs têm sido amplamente utilizados na prática clínica para o tratamento de fraturas e defeitos ósseos. Estudos anteriores, permitiram verificar que as PMOs podem induzir alterações no metabolismo celular, atuando ao nível dos recetores celulares de superfície, ao nível da ME, ativando redes de sinalização intracelulares (Pratap *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). Os resultados do estudo de Wu e a sua equipa (2011) demonstraram que este FCs pode aumentar não só a densidade mineral óssea, mas também outras propriedades mecânicas, uma vez que a arquitetura trabecular foi melhorada ao nível do volume e estrutura óssea, sendo uma potencial solução para os tratamentos locais de osteoporose (Wu *et al.*, 2011).

As PMOs-2, -4, -6, -7 e -9 são conhecidas por induzir uma morfogénese óssea mais completa e são consideradas muito osteogénicas (Yilgor *et al.*, 2012). As PMO-2 e PMO-7 apresentam uma grande capacidade para estimular a formação óssea, facilitam/estimulam a regeneração do tecido ósseo, uma vez que ativam um conjunto de eventos celulares, incluindo a quimiotaxia, reabsorção óssea, diferenciação celular, manutenção do fenótipo e apoptose (Calori *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Yilgor *et al.*, 2011, 2012; Lienemann *et al.*, 2012; Tsuzuki *et al.*, 2012; Vo *et al.*, 2012). No processo de cicatrização das fraturas, as PMOs estão sempre presentes desde a fase inicial, difundindo-se na MEO reabsorvida e induzindo a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, sendo desta forma consideradas moléculas osteoindutoras (Fisher *et al.*, 2006; Khojasteh *et al.*, 2012a).

Para além das PMOs, os FCT também são utilizados nos modelos de regeneração óssea. Estes FCs apresentam várias isoformas, que são produzidas por diferentes linhas celulares. A principal isoforma presente no tecido ósseo é o FCT- $\beta$ 1, que é sintetizado por osteoblastos (Solheim, 1998). É de salientar que no tecido ósseo, o FCT- $\beta$  estimula a síntese de MEO, promove a proliferação de células precursoras mesenquimais e de osteoblastos em fraturas, estimula a diferenciação de células precursoras mesenquimais, aumenta a expressão dos marcadores de diferenciação osteoblástica (tais como a FA, colagénio tipo I e osteonectina), intervêm no processo de ossificação endocondral e na angiogénese, estimula a síntese de colagénio e tem uma potente ação de quimiotaxia. Contudo, ao contrário das PMOs, o FGF- $\beta$  só induz a formação de tecido ósseo quando injetado na proximidade do tecido ósseo (Dias, 2004; Kim *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2006; Verron *et al.*, 2010; Vo *et al.*, 2012). Deste modo, o FCT tem sido utilizado em sistemas de

entrega, apresentando efeitos positivos ao nível da cicatrização de defeitos ósseos em humanos ou em animais (Khojasteh *et al.*, 2012a).

Para além dos FCs apresentados é de salientar que a formação óssea está dependente da angiogénese e da vascularização. Deste modo, tem vindo a ser estudada a importância dos FCs angiogénicos (FCEV, FCF, FCI e FCDP) para a regeneração óssea. O FCEV contribui fundamentalmente para a angiogénese durante o processo de regeneração óssea, pois promove a vascularização do tecido no local onde o biomaterial é implantado, aumenta a formação do tecido ósseo e melhora a sua cicatrização (Wernike *et al.*, 2010; Vo *et al.*, 2012).

Os FCFs podem induzir ou inibir a cicatrização do tecido ósseo dependendo da dose utilizada. Existem nove estruturas diferentes dos FCFs, sendo os mais abundantes no homem o FCF ácido (aFCF) e o FCF básico (bFCF). O bFCF é produzido por osteoblastos e armazenado em tecidos esqueléticos, promovendo a cicatrização óssea, enquanto que o aFCF está associado à proliferação de condrócitos, mostrando-se também eficaz na restauração da microarquitetura do osso (Fisher *et al.*, 2006). Os FCFs regulam o crescimento, diferenciação e a cicatrização óssea, a produção de protease e a manutenção celular (Solheim, 1998; Fisher *et al.*, 2006). Estudos recentes mostraram que quando os FCs forem adicionados localmente aos defeitos ósseos, estes contribuíram para aumentar a formação e a densidade óssea (Fisher *et al.*, 2006; Khojasteh *et al.*, 2012a).

O FCDP, que é um dímero de dois péptidos (A e B) pode intervir na diferenciação dos osteoblastos, aumentando o número de células progenitoras mesenquimais que podem progredir para linhagem osteoblástica e expressar o fenótipo osteoblástico, devido ao seu papel ativo no processo mitótico; pode interferir na angiogénese e ainda aumentar a síntese de colagénio e estimular a proliferação de celular (Fisher *et al.*, 2006). Os FCDP-A e B atuam sob genes reguladores do crescimento celular, intervindo deste modo, na cicatrização de feridas e reparação de fraturas. É de salientar que num ser humano saudável as células ósseas expressam apenas o gene FCDP-A, enquanto que, as células de um osteossarcoma expressam os dois genes FCDP-A e FCDP-B (Solheim, 1998).

Os FCIs (FCI-I e FCI-II) são exemplos de outros FCs angiogénicos que intervêm de forma positiva na consolidação de fraturas (Solheim, 1998; Fisher *et al.*, 2006). Estas proteínas são produzidas por diferentes tipos de células, incluindo osteoblastos e intervêm na regulação celular, na proliferação e migração de células mesenquimais, na mineralização óssea, no desenvolvimento da cartilagem e homeostase. O FCI-II encontra-se na matriz óssea, aumenta a síntese de colagénio e previne a sua degradação. Por outro lado, estimula a proliferação dos osteoblastos (Solheim, 1998). O FCI-I estimula o DNA ósseo, aumenta a síntese de colagénio do osso, de proteínas não colagénicas e ativa a expressão da osteocalcina.

Assim, devido às características apresentadas os FCs são moléculas fundamentais no processo de remodelação e regeneração óssea (Puppi *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Khojasteh *et al.*, 2012a; Suárez-González *et al.*, 2012; Tsuzuki *et al.*, 2012; Vo *et al.*, 2012). A consolidação de um defeito ósseo envolve a combinação dos processos fisiológicos em termos de proliferação, envolvimento de condroblastos e osteoblastos do perióstio (fonte principal), endóstio, vasos sanguíneos, fibroblastos e FCs.

Após ocorrer uma fratura óssea, ocorrem três fases na cicatrização deste tecido.

a) Cura reativa

A fase de inflamação começa com uma hemorragia a partir das extremidades do osso danificado e associado ao tecido mole, forma-se um coágulo - hematoma da fratura (Mateus, 2010; Lienemann *et al.*, 2012). Numa situação de inflamação aguda, os macrófagos são atraídos para a fratura e são libertadas citocinas e FCs. As partes moles da região mostram as alterações habituais de inflamação aguda, tais como: vasodilatação e extravasamento de plasma e leucócitos. Esta atividade é vista pela primeira vez no perióstio e nos tecidos circundantes, contudo, prolonga-se através de todo o tecido lesado. *À posteriori*, esta atividade fica confinada à área imediatamente adjacente à fratura (Mateus, 2010).

b) Cura reparativa

Dias após a fratura, as células do perióstio replicam-se e transformam-se em condroblastos formando a cartilagem hialina. As células do perióstio distais junto à fratura, originam osteoblastos e formam o tecido ósseo. Seguidamente o tecido torna-se em grande parte condroide através da ossificação endocondral. O novo tecido cresce em tamanho até que se une aos homólogos de outras partes da fratura, formando o calo da fratura. No desenrolar do processo é necessário o fornecimento de sangue a partir do tecido circundante, como fonte de oxigénio para o local da fratura. Este é um dos fatores principais que influenciam a união bem sucedida do osso. No final a fratura é considerada consolidada, após análise radiológica (Mateus, 2010).

c) Remodelação

A remodelação óssea (fase final) é iniciada com a ação dos osteoblastos que vão converter este tecido em osso lamelar, sendo o tecido ósseo não desejado removido por ação dos osteoclastos. Deste modo, é restaurada a estrutura nativa ao nível das propriedades biológicas e mecânicas (Mateus, 2010).

É de salientar que no caso de doenças ósseas, a grande maioria das vezes não ocorre o processo inflamatório, estando a regeneração óssea restringida ao processo reparativo e à remodelação.

## 2. Engenharia de Tecidos aplicada à regeneração do Tecido Ósseo

A engenharia de tecidos é uma ciência interdisciplinar que combina conhecimentos de diferentes áreas: ciências biológicas, medicina, química, física, em interligação com a engenharia (de materiais, biológica, biomédica, genética, química, física, eletrotécnica) (Lo *et al.*, 2012; Petrovic *et al.*, 2012). Esta área do conhecimento é um campo emergente, multidisciplinar, propenso a revolucionar a forma de melhorar a qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo; restaurando, mantendo ou melhorando a função de órgãos e tecidos. A engenharia de tecidos preocupa-se em estudar uma grande variedade de estratégias que envolvam células, biomateriais, moléculas bioativas, manipulação genética com o intuito de regenerar ou produzir tecidos (*in vitro* ou *in vivo*) (Spector, 2006; Petrovic *et al.*, 2012). Deste modo, os investigadores

têm vindo a desenvolver tecnologias para acelerar a regeneração de tecidos, abrindo caminho para a prática cirúrgica, nomeadamente ao nível da ortopedia, estomatologia e cirurgia maxilo-facial (Petrovic *et al.*, 2012). Assim a engenharia de tecidos aplicada à regeneração óssea designa-se por Engenharia do Tecido Ósseo (ETO) (Figura 2).

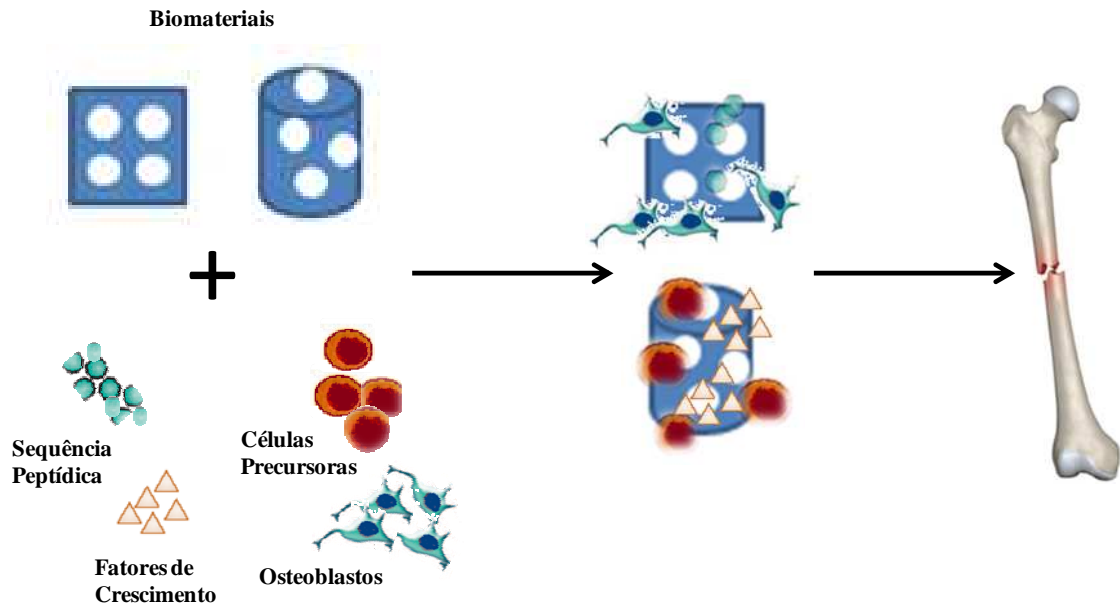


Figura 2. Representação esquemática dos elementos intervenientes na Engenharia de Tecido Ósseo.

Embora a reparação óssea seja geralmente um processo eficiente, em determinadas circunstâncias, quando o defeito ósseo é extenso a capacidade que o tecido apresenta para suprimir a lesão é diminuta. Deste modo, muitas vezes é necessário o recurso à utilização de materiais temporários e/ou definitivos para preenchimento do defeito ósseo. Historicamente, este tipo de defeitos ósseos (pós-traumáticos grandes) resultava na amputação do membro lesado. Nas últimas décadas, auto-enxertos de osso esponjoso, enxertos vascularizados, enxertos combinados com implantes metálicos têm constituído uma alternativa à amputação, mas ainda assim, muitas vezes envolvem tratamentos muito prolongados, várias cirurgias e uma diminuição da qualidade de vida do paciente. Atualmente, o tratamento padrão de defeitos ósseos de tamanho crítico (defeitos que não são regenerados por si só) é o enxerto ósseo autógeno (Mehta *et al.*, 2012). Neste tratamento, o osso é removido de outro local do hospedeiro (tipicamente a partir da crista ilíaca ou pélvis) e posteriormente é usado para encher o defeito ósseo (Mehta *et al.*, 2012). No entanto, a taxa de complicações associadas a este tipo de enxertos ósseos ainda é muito elevada e pode incluir morbilidade na área doadora, dor, paralisia, hospitalização prolongada e reabilitação, aumento do risco de infeção profunda, inflamação e disponibilidade limitada. Outra opção é o uso de aloenxertos ósseos (tipicamente derivados de cadáveres humanos). O sucesso tanto destes enxertos ósseos (auto e alo) é atribuído à semelhança física e biológica entre o tecido doador e o tecido de acolhimento (Mehta *et al.*, 2012). No entanto, os aloenxertos ortopédicos apresentam um maior risco de infeção para o dador e receptor, pois podem induzir a transmissão de doença e a resposta imune do hospedeiro. Um outro recurso para a reparação óssea consiste na utilização de xenoenxertos, contudo, após décadas de investigação, pesquisa e realização de ensaios clínicos,

este tipo de enxertos são atualmente considerados inadequadas para transplante devido ao risco de transmissão de doenças, de vírus, desencadear a infecção, toxicidade associada com a esterilização, imunogenicidade e, finalmente, rejeição do hospedeiro (Mehta *et al.*, 2012). Assim, a ETO tem surgido como uma alternativa promissora na superação de problemas de perda óssea, rejeição e escassez de doadores para obtenção de transplantes (alo-transplantes e xeno-transplantes). Deste modo, hoje em dia, é notória a crescente evolução no desenvolvimento de substitutos ósseos, uma vez que ainda não foi atingida a eficácia clínica para o tratamento dos problemas que afetam o tecido ósseo. Para a ETO os biomateriais são um componente fundamental, uma vez que, são importantes nas interações celulares, na formação e/ou reconstrução de um defeito, fornecendo um suporte para o tecido recém-formado. Os biomateriais para poderem ser usados em ETO necessitam possuir várias propriedades, que serão abordadas ainda neste capítulo.

Os biomateriais que têm vindo a ser utilizados na prática clínica são diversos. Estes podem ser classificados tendo em conta a sua origem, como sintéticos, naturais ou híbridos. São exemplos de materiais naturais o quitosano, alginato, colagénio (Kim *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2011). Como materiais sintéticos temos por exemplo as ligas metálicas e as cerâmicas (Bansiddhi *et al.*, 2008; Tripathi e Basu, 2012). Contudo, a aposta crescente tem vindo a ser a combinação de vários materiais (polímeros e cerâmicos; materiais sintéticos e naturais), uma vez que se tem mostrado uma estratégia vantajosa devido à combinação de propriedades químicas e físicas que permitam o desenvolvimento de estruturas com uma composição e propriedades semelhantes, desenvolvendo um biomaterial com características “perfeitas” para restaurar as funções nativas do tecido lesado (Hutmacher *et al.*, 2007; Swetha *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Reves *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013).

Os biomateriais podem ainda ser classificados tendo em conta a sua degradabilidade, em biomateriais permanentes, como é o caso das próteses fixas de titânio ou cerâmicas, ou os biomateriais biodegradáveis, tais como: *scaffolds* de hidroxiapatite, hidrogéis injetáveis de quitosano e hidroxiapatite, esponjas de quitosano e pectina, fibras de quitosano, microesferas de colagénio, membranas de colagénio e sílica (Cui *et al.*, 2010; Coimbra *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Tripathi e Basu, 2012; Chang *et al.*, 2013). É de salientar, que as próteses de titânio ou cerâmicas são ainda hoje muito utilizadas, contudo, problemas associados com a sua rejeição requerem nova cirurgia para extração ou substituição das próteses. Esta situação aumenta o custo associado e afeta o bem-estar do paciente. Para tentar ultrapassar estes problemas, novos biomateriais têm vindo a ser desenvolvidos. Materiais estes que após implantados num local de defeito ósseo sejam capazes de promover a regeneração óssea, restabelecendo as funções e a estrutura do osso nativo.

Assim, devido à panóplia de materiais existente, a sua escolha tem de obedecer a vários fatores tais como, a função que se pretende que o implante desempenhe no organismo, a idade e o metabolismo do paciente. Deste modo, diversas técnicas têm sido desenvolvidas para produzir *scaffolds* adequados às mais variadas aplicações. São utilizados materiais diversos, desde naturais a sintéticos, ou combinações dos dois e as características físicas destes *scaffolds* vão sendo modificadas de forma a maximizar a resposta celular e do tecido, estando disponíveis em diferentes formas (grânulos, blocos e injetáveis) (Lanza, 2007).

Desde meados dos anos 70, as estruturas tridimensionais foram uma importante componente do desenvolvimento da engenharia de tecidos (Lanza, 2007). No entanto, por vezes surgem dificuldades com a aplicação clínica de *scaffolds* pré-formados, o que tem levado ao aperfeiçoamento de técnicas de moldagem, por exemplo a prototipagem rápida, que permite o desenvolvimento de um *scaffold* por medida, com uma forma exterior bem definida e uma arquitetura interior controlada (Schieker *et al.*, 2006; Fisher, 2007). Contudo, nos últimos anos, tem ocorrido um rápido desenvolvimento no campo dos materiais injetáveis. O desenvolvimento de cimentos à base de fosfato de cálcio tornaram-se injetáveis indicados para reparar e regenerar o tecido ósseo, uma vez que após implantação eram rapidamente integrados na estrutura óssea (Muzzarelli, 2011). No entanto, o interesse em hidrogéis como biomateriais tem vindo a aumentar devido a possuírem características adequadas para aplicações de engenharia de tecidos.

A utilização de injetáveis (materiais líquidos, altamente viscosos, ou nanopartículas) para aplicações na ETO pode oferecer vantagens em relação à abordagem do *scaffold* sólido pré-formado, nomeadamente ao nível da osteointegração (Lanza, 2007; Puppis *et al.*, 2010; Muzzarelli, 2011). Em primeiro lugar, podem ser entregues por via de injeção, sendo mais fácil de aplicar, permitindo uma moldabilidade favorável do biomaterial no local de defeito, resultando num contacto imediato, independentemente da forma do defeito (Fisher, 2007; Puppis, 2010; Rorke, 2010). O injetável pode ser reticulado *in situ* com um controlo temporal e espacial exato e de uma forma minimamente invasiva, sendo evitada uma cirurgia aberta para posterior colocação do *scaffold* (Fisher, 2007; Stevens, 2007).

Em segundo lugar, se necessário, alguns hidrogéis podem ser facilmente modificados com a adição de grupos bioativos e terapêuticos para reforçar as interações celulares (Lanza, 2007; Stevens, 2007; Puppis, 2010). Estas modificações incluem também a adição de péptidos proteoliticamente degradáveis para melhorar a biodegradabilidade e aumentar a fixação (Lanza, 2007). Do mesmo modo, propriedades tais como: a viscosidade, a hidrofobicidade, o tempo de configuração dos injetáveis apresentam-se como potenciadores do seu sucesso (Stevens, 2007; Puppis, 2010).

Com este intuito vários biomateriais injetáveis têm sido desenvolvidos, utilizando variados materiais tais como: alginatos, colagénio, dextrano, quitosano, óxido de polietileno, ácido hialurónico e cola de fibrina (Lanza, 2007; Puppis, 2010). Por exemplo, uma solução de poli (fumarato de propileno) pode ser injetada e polimerizada num local de defeito ósseo para preencher qualquer defeito (Stevens, 2007). Do mesmo modo, um composto de fosfato de cálcio e quitosano também se apresenta como um bom material injetável, facilmente reabsorvível e com maior resistência devido à incorporação do quitosano (Stevens, 2007). Um outro injetável à base de ácido hialurónico misturado com FCF no local de uma fratura óssea mostrou aumento da formação óssea e boa resistência mecânica num curto período de tempo (Stevens, 2007).

Os injetáveis também têm sido utilizados como veículos de transporte de microesferas ou micropartículas, fármacos ou fatores de crescimento (Tan *et al.*, 2010; Verma e Kumar, 2010; Larsson e Hannink, 2011). Verma e Kumar (2010) desenvolveram um injetável com microesfera de PLGA que mostrou ser um biomaterial não invasivo para aplicações na ETO. Também Tan e seus colaboradores (2010) desenvolveram um composto ósseo injetável utilizando um hidrogel de

alginate de cálcio para transportar nanopartículas de hidroxiapatite/colagénio, apresentando bons resultados ao nível da degradabilidade e biocompatibilidade.

Contudo, a aplicação destes injectáveis é limitada devido à falta de integridade mecânica, à dificuldade de esterilização e manuseio, ao controle da cinética de gelificação do material e à cinética de degradação da composição (Puppis, 2010).

Deste modo a ETO, tem vindo a proporcionar o desenvolvimento de variadíssimos biomateriais que em conjunto com células e outras moléculas bioativas têm melhorado o processo de regeneração óssea (Figura 2 e 3) (Jimi *et al.*, 2012; Khojasteh *et al.*, 2012a; Mehta *et al.*, 2012). Contudo, é necessário aprofundar os conhecimentos sobre interações célula-biomaterial-moléculas bioativas que ocorrem à nanoescala (Laurencin e Nair, 2008; Vallet-Regi e Ruiz-Hernández, 2011). Estes processos são complexos e como tal, têm vindo a ser objeto de constante de análise pela ETO, com o intuito de se poder recriar as interações presentes no tecido ósseo nativo (Dimitriou *et al.*, 2011).

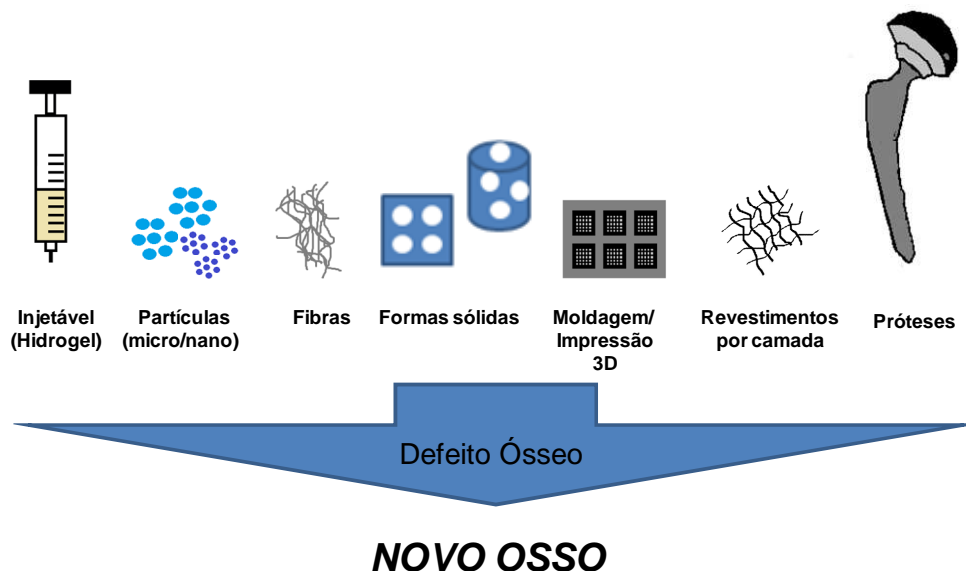


Figura 3. Representação esquemática da variedade de biomateriais que podem ser usados na ETO.

### 3. Biomateriais

Em 1976 na primeira Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais, o termo biomaterial foi definido como sendo um material não viável utilizado em dispositivos médicos, destinado a interagir com os sistemas biológicos. No entanto, a definição atual proposta pela mesma Sociedade Europeia de Biomateriais é diferente (O'Brien, 2011). Atualmente, um biomaterial é definido como um material que irá estabelecer interfaces com os sistemas biológicos, com o intuito de tratar ou restabelecer as funções de um tecido ou órgão do organismo (O'Brien, 2011). Esta mudança verificada na definição traduz a evolução que vem sendo notória neste campo dos biomateriais. No entanto, num estudo mais recente foi publicada uma outra definição de biomateriais em que este foi definido como sendo uma substância desenvolvida para recriar uma estrutura por si só, ou para formar um sistema complexo, que posteriormente possa

ser usada em processos de diagnóstico ou terapêutico, em medicina humana ou veterinária (Williams, 2009; Vallet-Regí e Ruiz-Hernández, 2011).

Ao longo de várias décadas, os biomateriais têm vindo a ser utilizados pela engenharia de tecidos para o fabrico de matrizes de suporte (*scaffolds*) que proporcionem um suporte estrutural para células específicas. Após a adesão celular podem ser desencadeados processos diversos tais como, migração, proliferação e diferenciação, pretendendo deste modo reproduzir a estrutura nativa do tecido (Pielichowska, 2008). Assim, a seleção do biomaterial mais adequado para a aplicação na ETO é um passo determinante, uma vez que as suas propriedades são essenciais para o sucesso do biomaterial quando implantado no tecido lesado.

A evolução dos biomateriais tem contemplado diferentes fases que têm contribuído para o desenvolvimento dos materiais, procurando reproduzir as condições nativas do tecido onde o material vai ser implantado (Figura 4).

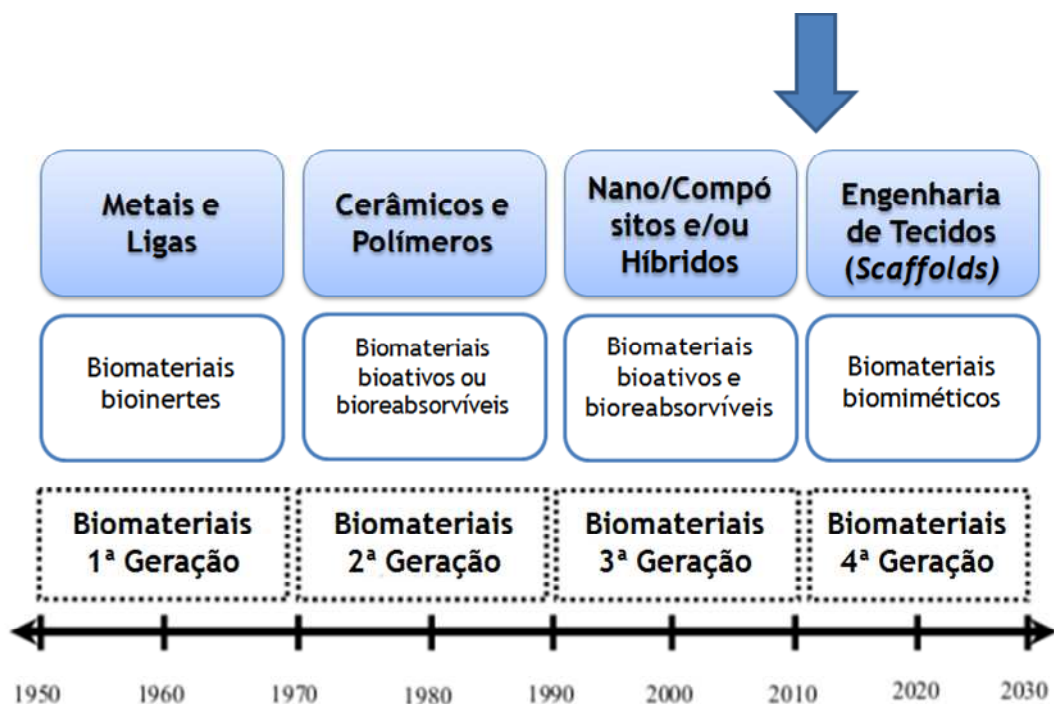


Figura 4. Representação esquemática da evolução dos biomateriais nos últimos anos (adaptado de Allo *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de biomateriais tendo em conta as suas propriedades sob o ambiente fisiológico, foi dividido em três ou quatro gerações dependendo dos autores (ainda existe uma certa controvérsia na separação entre a terceira e a quarta geração de materiais).

A primeira geração de biomateriais incluiu essencialmente, o aço inoxidável, o cobalto e o titânio. Estes materiais tiveram uma grande importância ao longo da história, especialmente ao nível de aplicações de carga em cirurgias ortopédicas e odontológicas. A primeira geração era constituída por materiais bioinertes que pretendiam atuar como substitutos do tecido lesado. O sucesso destes materiais deve-se à sua resistência à corrosão, contudo a elevada força de resistência dos metais pode criar tensões em torno do implante. Para além disso, estes materiais não eram biodegradáveis ou bioativos. Estas características impulsionaram o desenvolvimento de novos materiais, surgindo a segunda geração, que pretendia reparar o tecido lesado ao contrário

da geração anterior, que apenas tinha como objetivo substituir o tecido danificado. A segunda geração de biomateriais englobava cerâmicas e polímeros. Cerâmicas como a hidroxiapatite (HA), fosfatos de cálcio e os vidros bioativos, têm atraído especial atenção, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biatividade, no entanto, estes materiais são frágeis e têm baixa estabilidade mecânica, o que os torna pouco adequados para aplicações de suporte de carga. Os polímeros, tais como o poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) e os seus copolímeros são materiais que devido à sua composição, estrutura e, conseqüentemente, as suas propriedades podem ser adaptadas às necessidades específicas. Por exemplo, a sua biodegradabilidade pode ser controlada e a resistência mecânica de compressão pode aproximar-se à do osso cortical. Relativamente aos polímeros sintéticos, a policaprolactona (PCL) tem recebido atenção especial nos últimos anos, o que contribuiu para um grande aumento na sua aplicação. Contudo, os polímeros sintéticos também apresentam desvantagens, tais como: a alteração das suas propriedades, mesmo para a mesma composição, ao nível da função de produção, da temperatura de esterilização do ambiente local, e da geometria do desenho. Além disso, eles apresentam baixa rigidez e osteocondutividade. Contudo, se um *scaffold* de base polimérica tiver quantidade suficiente de materiais bioativos, tais como biocerâmicas, pode melhorar estas propriedades. Os materiais de terceira geração têm por base estes *scaffolds* compósitos polímero/biocerâmicos, representam uma alternativa conveniente para aplicações na regeneração de tecido ósseo, devido à possibilidade de se adaptarem a várias propriedades, dependendo das necessidades específicas. Assim, os compósitos têm demonstrado ser mais eficazes para melhorar as propriedades mecânicas e de bioatividade, em comparação com as cerâmicas e os polímeros isolados. Estes materiais também têm vindo a ser desenvolvidos à nanoescala, uma vez que é a esse nível que se processam as reações biológicas.

Com o evoluir da ciência, as novas tecnologias desenvolvidas na área de ETO têm permitido aprofundar os conhecimentos ao nível da biologia molecular, com o intuito de se desenvolverem materiais inteligentes ou biomiméticos, cujo desafio na sua conceção é reproduzir o grau de complexidade necessário para imitar a ME do tecido natural (Holzapfel *et al.*, 2012). Esta grande variedade de biomateriais que hoje existe é de extrema importância, no sentido de abranger uma grande variedade de aplicações ortopédicas e estomatológicas. Contudo, um longo caminho há a percorrer, a biodegradabilidade, a competência mecânica, a indução da vascularização são temáticas que ainda necessitam de ser trabalhadas antes da aplicação clínica destes materiais. O desenvolvimento de *scaffolds* 3D com potencial osteogénico e angiogénico continuam a ser um grande desafio. Uma das alternativas para melhorar o seu potencial é a incorporação de moléculas bioativas, tais como os FCs (Khojasteh *et al.*, 2012a). Por exemplo, as modificações da superfície dos nanocompósitos através da alteração de grupos funcionais na sua superfície pode proporcionar locais para ligações celulares, melhorando o interface célula-biomaterial e desta forma permitir a regeneração óssea. No entanto continua a existir um conhecimento limitado acerca dos mecanismos de degradação, cinética de libertação de iões e o estímulo angiogénico destes sistemas altamente porosos. Uma outra alternativa para a obtenção de um biomaterial ideal para a regeneração óssea, tem sido a incorporação de células precursoras nos *scaffolds*, células estas que são capazes de se diferenciarem no fenótipo pretendido e

possibilitar a regeneração do tecido lesado (Ben-David *et al.*, 2011; Khojasteh *et al.*, 2012b; Ko *et al.*, 2012).

### 3.1 Propriedade dos Biomateriais

A produção do biomaterial ideal para a regeneração óssea é um processo complexo uma vez que tem de atender a requisitos específicos, tais como:

- Biocompatibilidade - é o termo mais comumente usado para descrever a compatibilidade ou a harmonia dos biomateriais com os sistemas vivos, é a capacidade de existir um contacto com os tecidos do organismo sem causar danos para o mesmo, não causando efeitos adversos num sistema biológico (Anderson, 2012; Patel e Gohil, 2012). A adesão celular, o restabelecimento normal das funções celulares, a migração das células para a superfície do biomaterial e a proliferação celular são indicadores da biocompatibilidade de um biomaterial (Anderson, 2012). Após a implantação, um biomaterial biocompatível deve ser capaz de promover a adesão celular, não desencadeando nenhuma resposta alérgica, inflamatória ou tóxica, que possa reduzir a cicatrização, regeneração ou ainda causar rejeição (Orive *et al.*, 2009; Belluci *et al.*, 2010; O'Brien, 2011; Vallet-Regí e Ruiz-Hernández, 2011).

- Bioativo - O biomaterial deve ser capaz de permitir uma interação física, entre o tecido e o material, ou seja, induzir uma atividade biológica específica (Belluci *et al.*, 2010; Bose e Tarafter, 2012). Numa perspectiva celular, a bioatividade de um material reflete a adesão e a diferenciação celular sobre a superfície do material sem formação de uma cápsula fibrosa (Hannink e Arts, 2011; Vallet-Regí e Ruiz-Hernández, 2011).

- Biodegradável - O biomaterial deve ser estruturalmente estável por tempo suficiente para permitir a regeneração do tecido. A velocidade de degradação do biomaterial deve ser semelhante à da regeneração do tecido. Os produtos resultantes da degradação do biomaterial não devem ser tóxicos e devem ser capazes de ser eliminados do organismo sem lesarem outros órgãos (Orive *et al.*, 2009; Belluci *et al.*, 2010; Bose e Tarafter, 2012).

- Propriedades mecânicas - As propriedades mecânicas dos biomateriais devem ser adequadas à função que os mesmos vão desempenhar no organismo. O biomaterial deve possuir uma resistência mecânica similar à do tecido nativo. Esta propriedade reveste-se de grande importância, tendo-se mostrado um grande desafio para a ETO, uma vez que o biomaterial tem de ter uma integridade mecânica suficiente para garantir o processo de remodelação do tecido lesado e/ou servir de suporte (no caso da aplicação de uma prótese). A resistência mecânica dos biomateriais é imprescindível para a formação da matriz, para o desenvolvimento de uma estrutura de suporte, de forma a suportar a carga, ao mesmo tempo que deve apresentar porosidade suficiente para o crescimento celular e para a remodelação da homeostase (Salgado *et al.*, 2004; Hutmacher *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010). Os materiais devem ser selecionados de modo a permitirem o suporte da estrutura óssea até à formação do novo tecido, ou seja, até que haja remodelação do tecido do hospedeiro, capaz de suportar cargas, tensões e poder assegurar o seu papel estrutural (Hollister, 2005; Butscher, 2011). Nos últimos anos têm sido desenvolvidos muitos materiais que apresentam boas propriedades mecânicas, contudo isso deve-se ao facto de apresentarem uma fraca porosidade, o que vai também condicionar a aplicabilidade do biomaterial

*in vivo*, pois reduz a adesão e a proliferação celular e não permite uma vascularização adequada. Deste modo, é necessário existir um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a porosidade.

- Porosidade - A porosidade reveste-se de uma importância fulcral nos biomateriais implantados no tecido ósseo, uma vez que, uma arquitetura suficientemente porosa e interligada permite assegurar a infiltração de células e FCs, adesão e proliferação celular, uma adequada difusão do oxigênio, nutrientes, para a construção de uma nova matriz celular, bem como permitir a difusão dos produtos de degradação e metabolitos para fora do organismo, sem a interferência de outros órgãos ou tecidos e ainda a vascularização do tecido que se pretende regenerar. O tamanho dos poros também é muito importante, uma vez que as células interagem com os biomateriais através dos grupos químicos (ligantes) que se encontram na sua superfície. Deste modo, o biomaterial deve apresentar uma estrutura porosa interconectada (mais de 90% e tamanhos de poros entre 100-350µm).

- Propriedades de superfície dos biomateriais - Para além da porosidade, outras propriedades de superfície devem ser tidas em conta na construção de um *scaffold*, afim de, promover a proliferação, adesão e diferenciação das células. A morfologia, a hidrofiliabilidade e a carga de superfície são fatores de controlo, *in vitro*, da adesão celular, migração, crescimento, propagação e sinalização intracelular. *In vivo* as propriedades de superfície dos biomateriais contribuem para o recrutamento de células e para o interface tecido-*scaffold* (Puppi *et al.*, 2010). Ou seja, aquando da inserção do *scaffold* no local de defeito, este vai contactar com o ambiente fisiológico circundante e vai sofrer um reconhecimento biomolecular por parte das células (Puppi *et al.*, 2010). Este reconhecimento deve permitir a integração biológica do *scaffold* no meio envolvente de forma a proporcionar uma formação/reparação óssea eficaz. A incorporação de ligantes bioativos nos *scaffolds* tais como: peptídeos e polissacarídeos (fibronectina, laminina e vitronectina) têm favorecido a sua integração no organismo. Recentemente, têm sido incorporadas nos *scaffolds* sequências curtas de peptídeos derivados de proteínas da ME (por exemplo: Glu7-Pro-Arg -Gly-Asp-Thr, Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg (SVVYGLR); peptídeos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD)). Estas sequências vão ser reconhecidas pelas membranas das células, que desta forma através respostas celulares específicas vão promover a adesão celular e conseqüentemente a regeneração óssea (Fujisawa *et al.*, 1997; Egusa *et al.*, 2009; Puppi *et al.*, 2010; Wojtowicz *et al.*, 2010).

- Arquitetura/Design do *scaffold* - Aquando do desenvolvimento de um *scaffold* é importante a projeção de uma determinada arquitetura. Os *scaffolds* devem possuir uma estrutura porosa interconectada com elevada porosidade para permitir a penetração celular e a difusão de nutrientes e metabolitos celulares para a ME. A porosidade também é importante para garantir a vascularização do tecido. Contudo, a porosidade deve ser adequada de forma a que o *scaffold* possua resistência mecânica e ao mesmo tempo reproduzir a estrutura óssea nativa. A arquitetura do *scaffold* deve ter em conta o local onde este vai ser aplicado e a extensão da lesão.

- Tecnologia de fabrico - Por fim, para que um biomaterial possa ser usado em meio clínico tem de se ter em conta o seu processamento de fabrico, as tecnologias/métodos utilizados e os custos associados. Desta forma, o desenvolvimento de um biomaterial para além da seleção do material, deve também ter em conta a tecnologia de processamento mais adequada.

## 3.2 Classificação dos Materiais quanto à origem

Na ETO os materiais utilizados podem ser classificados tendo em conta a sua origem, em materiais naturais, sintéticos e biocompósitos.

### 3.2.1 Materias Naturais

Na ETO são utilizados vários materiais naturais, tais como: polissacarídeos (amido, alginato, quitina/quitosano, celulose, derivados do ácido hialurónico), proteínas (colagénio, fibrina, seda), biofibras (lignoceluloses) e outros (Malafaya *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2010; Kolambkar *et al.*, 2011; Muzzarelli, 2011). Os polímeros naturais são uma das opções mais atraentes, principalmente devido às suas semelhanças com a ME, versatilidade química, promovem interações celulares, são biocompatíveis e biodegradáveis (Swetha *et al.*, 2010).

#### 3.2.1.1 Polímeros proteicos

##### Colagénio

O colagénio (Figura 5) é considerado por muitos investigadores como um biomaterial ideal para a engenharia de tecidos, porque é o principal componente da ME. Esta proteína confere suporte aos tecidos conectivos, como a pele, tendões, ossos, cartilagem, vasos sanguíneos e ligamentos. Por outro lado, intervem na regulação, proliferação e diferenciação celular (Malafaya *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011). Nos seres vivos existem diferentes tipos de colagénio, embora, o colagénio tipo I seja o mais abundante. Devido a este facto este tipo de colagénio tem sido o mais investigado para aplicações biomédicas, uma vez que apresenta várias características, tais como: alta resistência mecânica, é biocompatível e biodegradável, apresenta baixa antigenicidade e pode ser modificado através de vários processos químicos (para se tornar biocompatível) (Chen *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).

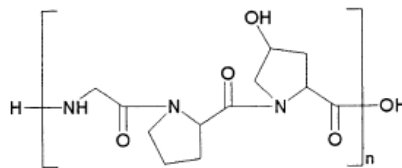


Figura 5. Estrutura química do Colagénio (adaptado de Seal *et al.*, 2001).

O colagénio é isolado principalmente a partir de tecidos animais, o que levanta questões de segurança relativamente à sua utilização, pois pode atuar como vetor para a transmissão viral e de príões (Malafaya *et al.*, 2007). Contudo, têm sido desenvolvidas novas técnicas de purificação, de modo a que o colagénio derivado de tecidos animais possa vir a ser utilizado em seres humanos (Malafaya *et al.*, 2007), apesar deste, ter um custo elevado.

O colagénio é comercializado sob diferentes formas estruturais, tais como: esponjas, géis e nanofibras (Xiao *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Malafaya *et al.*, 2007). Esta proteína tem sido combinada com diferentes biomateriais, tais como: quitosano (Arpornmaeklong *et al.*, 2008), ácido Poli (láctico-co-glicólico) (APLG) (Kuo e Yeh, 2011; Mou *et*

*al.*, 2011), fosfato de cálcio, hidroxiapatite (Wang *et al.*, 2009; Zhou e Lee, 2011; Lee *et al.*, 2012), glicosaminoglicanos (Tierney *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2010) e vidros bioativos (Xu *et al.*, 2011), a fim de promover a regeneração óssea. Deste modo, as suas propriedades biológicas, físicas e químicas são melhoradas em comparação com biomateriais com um só componente. Por outro lado a combinação de diferentes materiais com o colagénio aumenta a sua biocompatibilidade, permite regular a sua taxa de degradação e ainda obter estruturas 3D com uma arquitetura semelhante ao tecido nativo (Lee *et al.*, 2012).

Um estudo recente revelou que a combinação do colagénio tipo I com o tipo III permite o desenvolvimento de um biomaterial promissor para aplicações de ETO, uma vez que estas proteínas existem em abundância no osso e apresentam propriedades osteoindutoras (Schneider *et al.*, 2010). As fibras de colagénio I, amplamente utilizadas na ETO, apresentam uma grande resistência à tração, e o colagénio III aumenta a estabilidade estrutural e a taxa de reabsorção. Deste modo, a sua combinação permitiu a produção de um compósito estável, com propriedades mecânicas e osteoindutoras adequadas.

### 3.2.1.2 Polímeros de Polissacarídeos

Os polissacarídeos são uma classe de biopolímeros constituídos por monómeros de açúcares simples (Malafaya *et al.*, 2007). Os monómeros (monossacarídeos) estão ligados entre si por ligações O-glicosídicas, conferindo aos polissacarídeos a capacidade de formar polímeros lineares e ramificados. Estes polímeros podem ser obtidos de diferentes fontes: microbiana, animal e de plantas (Mano *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos têm propriedades que são muito atraentes para aplicações na ETO, principalmente devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, semelhança com a ME, permitem a adesão celular, propriedades estas que potenciam a regeneração óssea. Estas biomoléculas possibilitam ainda a formação hidrogéis e apresentam no geral, baixos custos de aquisição (Mano *et al.*, 2007; Osório, 2007; Martins *et al.*, 2010).

#### Quitosano

Na última década, os biomateriais à base de quitosano (QT) têm sido intensamente investigados para serem aplicados na ETO (Martins *et al.*, 2009; 2010). O QT é produzido pela desacetilação da quitina e é constituído por copolímeros de  $\beta(1\rightarrow4)$ -glucosamina e N-acetil-D-glucosamina (Figura 6). Este polímero é obtido principalmente na casca de crustáceos, cutículas de insetos e paredes celulares de fungos (Thein-Han e Misra, 2009; Miranda *et al.*, 2011).

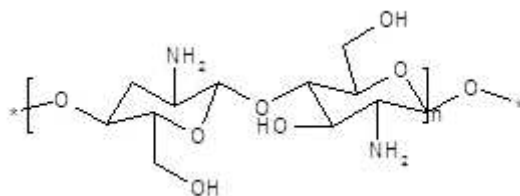


Figura 6. Estrutura química do Quitosano (adaptado de Tuzlakoglu, 2007).

Este polímero apresenta propriedades muito atrativas para a ETO, uma vez que é biologicamente renovável, biodegradável, biocompatível, não-antigénico, biofuncional, tem

propriedades antibacterianas e antimicóticas, é acessível e pode ser produzido com diferentes formas (Khor e Lim, 2003; Malafaya *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2010; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2010; Pinto, 2010; Miranda *et al.*, 2011).

O QT tem vindo a ser usado para produzir membranas, esponjas, hidrogéis, matrizes 3D, micro e nano partículas, microesferas, fibras, malhas de fibras 3D, nanofibras (Duarte *et al.*, 2010a, b; Jayakumar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Pinto, 2010; Shalumon *et al.*, 2010). Estas estruturas (dispositivos) têm sido utilizadas como sistemas capazes de transportar biomoléculas (FCs e agentes farmacêuticos), com efeito benéfico para acelerar o processo de regeneração óssea (Malafaya *et al.*, 2007; Osorio, 2007; Duarte *et al.*, 2010a, b; Jayakumar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2010; Pinto, 2010; Shalumon *et al.*, 2010).

O QT pode ser processado através de diferentes metodologias. Correlo e seus colaboradores (2009) produziram fibras de QT por processamento de fusão-sem solventes (“melt processing”) (Correlo *et al.*, 2009). Este processamento não altera as suas características, incluindo a rugosidade da superfície e o volume dos microporos (Correlo *et al.*, 2009). A inversão de fase assistida (“assisted phase inversion”) também é uma metodologia usada para produzir *scaffolds* 3D de quitosano, com potenciais aplicações na ETO (Temtem *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010c). Temtem e os seus colegas (2009) demonstraram que o dióxido de carbono em condições supercríticas pode ser usado para produzir diferentes *scaffolds* de QT, que podem vir a ser utilizados como sistemas de entrega de fármacos e/ou como matrizes para sustentar *in vitro* a adesão celular e promover a proliferação celular, eventos que são fundamentais para aplicação destas estruturas em ETO e medicina regenerativa (Temtem *et al.*, 2009). A utilização de condições supercríticas pode ser usada para controlar a morfologia, densidades e porosidade. Além disso, o dióxido de carbono sendo um gás, pode ser facilmente utilizado para criar os poros, o que se torna importante na produção de *scaffolds* porosos, sem deixar qualquer vestígio de resíduo, uma vantagem para o ambiente celular envolvente (Temtem *et al.*, 2009).

Contudo e apesar da variedade de metodologias apresentadas, a liofilização continua a ser a técnica mais utilizada para produzir *scaffolds* 3D, porosos e homogêneos de QT (Yang *et al.*, 2010). Além disso, as propriedades dos *scaffolds* de QT, tais como, estrutura, cristalinidade e resistência mecânica podem ser moduladas através da utilização de diferentes concentrações de QT, peso molecular e desacetilação do QT, tornando-o deste modo, mais atrativo para ser aplicado na regeneração do tecido ósseo (Yang *et al.*, 2010).

Para além disso, o QT também tem sido utilizado em aplicações clínicas ósseas, combinado com uma variedade de materiais, tais como: alginato, HA, fosfatos de cálcio, poli (metilmetacrilato), ácido poli (L-láctico) e ácido hialurónico (Malafaya *et al.*, 2005; Muzzarelli, 2009; Thein-Han e Misra, 2009; Kievit *et al.*, 2010). O QT tem vindo a ser combinado com sais 2-glicerofosfato e nanopartículas produzidas com vidros bioativos, com o objetivo de serem preparados novos hidrogéis injetáveis, para aplicações ortopédicas, devido a apresentarem boas propriedades de osteointegração (Muzzarelli, 2011). Num outro estudo, o QT foi utilizado para aumentar a biocompatibilidade de revestimentos de apatite depositados na superfície de ligas de titânio, para aumentar a adesão celular (Pang e Zhitomirsky, 2007). Estas modificações das superfícies de titânio tendem a melhorar a sua integração no tecido (Muzzarelli, 2011).

Muitas vezes é realizado o encapsulamento de FCs (PMOs por exemplo, uma vez que promovem o processo de regeneração óssea) em matrizes de suporte de QT, que permitem manter a bioatividade do agente e prolongar a sua presença no local do defeito (Yilgor *et al.*, 2009). A incorporação de PMOs promove ainda a adesão celular, a atividade da FA e a deposição de cálcio mineral (Muzzarelli, 2011).

Num estudo recente o QT foi conjugado com a pectina (família de D-ácido galacturónico ligado covalentemente a polissacarídeos, presentes nas paredes celulares primárias das plantas) (Figura 7), com o intuito de criar um biomaterial poroso e biodegradável (Coimbra *et al.*, 2011). Este estudo teve como objetivo acoplar a biocompatibilidade do QT com as propriedades de gelificação, espessamento (que a pectina apresenta) e anti-inflamatórias.

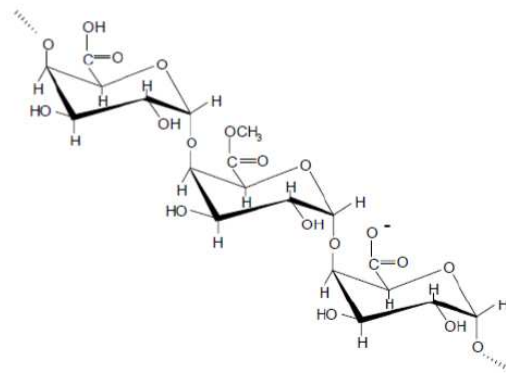


Figura 7. Estrutura química da Pectina (adaptado de Fonseca, 2011).

A pectina tem sido objeto de estudo, na preparação de sistemas de entrega de fármacos, devido à facilidade com que pode sofrer degradação enzimática (Coimbra *et al.*, 2010). Deste modo, esta vantagem também se mostrou interessante para a aplicação em implantes ósseos, uma vez que podem ser direcionados fármacos para um local de defeito ósseo, com o objetivo de promover a osteointegração e osteoindução. Além disso, a pectina tem também sido investigada no tratamento de superfícies de dispositivos médicos e na produção de implantes ósseos revestidos com nanopartículas (Coimbra *et al.*, 2011).

A união destes dois compostos resultou na criação de um complexo polielectrolítico pectina/quitosano (Figura 8).

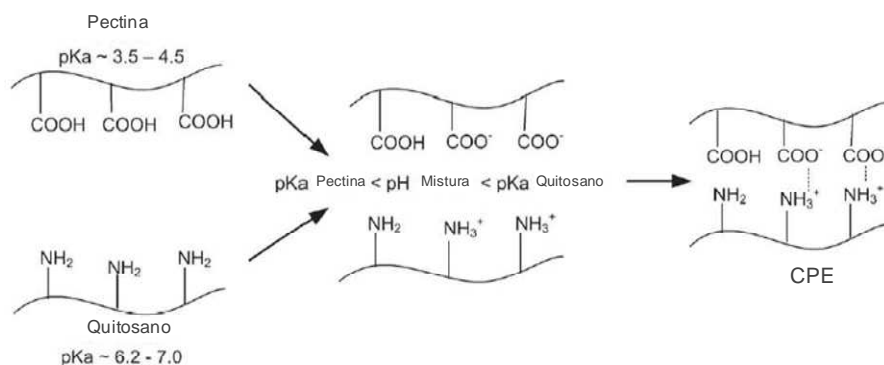


Figura 8. Complexo polielectrolítico de pectina e quitosano (adaptado de Fonseca, 2011).

Estas duas estruturas supramoleculares de cargas opostas, foram investigadas para aplicações ao nível do tecido ósseo e entrega de fármacos. O complexo mostrou-se biocompatível e os subprodutos de degradação não citotóxicos, comprovando que o *scaffold* de estrutura porosa e irregular poderia vir a ser aplicado na regeneração do tecido ósseo. Este *scaffold* apresenta como vantagem a combinação de propriedades dos dois materiais permitindo a osteointegração do *scaffold*, quando aplicado no local de defeito ósseo.

### Alginato

O alginato é um polissacarídeo constituído por  $\beta$ -1,4 ácido D-manurónico (M) e  $\alpha$ -1,4 ácido L-gulurónico (G) (Figura 9) (Chen *et al.*, 2011).

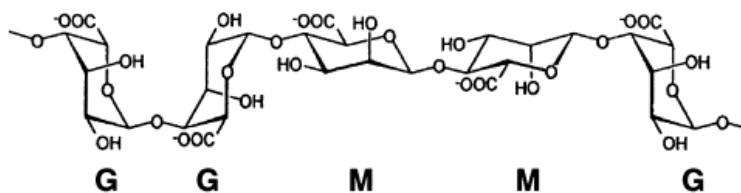


Figura 9. Representação da estrutura química do Alginato (adaptado de Steinbüchel e Rhee, 2005).

Este polímero é um composto muito abundante na natureza e é encontrado em algas marinhas castanhas e em algumas bactérias do solo (Malafaya *et al.*, 2007). É um dos polímeros mais estudados e aplicados na ETO, devido às propriedades que apresenta, como sejam: a biodegradabilidade, baixa imunogenicidade, biocompatibilidade, hidrofiliabilidade e baixo custo (Chen *et al.*, 2011; Kolambkar *et al.*, 2011).

Recentemente, alginatos modificados têm sido propostos para diferentes aplicações como sejam o encapsulamento de células ou proteínas, com o objetivo de promover a mineralização do tecido ósseo (Grellier *et al.*, 2009). A imobilização de células dentro de microesferas de alginato, oferece um ambiente altamente hidratado, semelhante ao tecido nativo, que é fundamental para a manutenção da viabilidade celular e para a regeneração do tecido ósseo, uma vez que as células vão promover a osteoindução (Connelly *et al.*, 2007; Grellier *et al.*, 2009; Re'em *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012).

Kolambkar e seus colaboradores (2011) apresentaram um sistema de entrega de FCs, que consiste numa malha de nanofibras produzidas por electrospinning, combinadas com um hidrogel de alginato. No interior deste hidrogel injetável existem FCs que são libertados, de forma sustentada, para orientar a regeneração óssea (Kolambkar *et al.*, 2011). Os resultados obtidos neste estudo revelaram que o sistema de entrega colocado nos defeitos ósseos, permitiu uma formação óssea consistente, resultando numa reparação funcional deste tecido (Kolambkar *et al.*, 2011).

A biodegradabilidade dos hidrogéis de alginato é uma característica vantajosa para a sua utilização na ETO, uma vez que apresentam um perfil de degradação que pode ser ajustado (Lee *et al.*, 2010a). A degradação do alginato pode ser explicada pela desintegração da cadeia de ligação cruzada causada pela substituição dos catiões de cálcio (responsáveis pela reticulação) por catiões monovalentes de sódio, potássio ou fosfato presentes no meio extracelular (Hunt *et al.*,

2010). A degradação dos hidrogéis de alginato permite a libertação das células que anteriormente tenham sido encapsuladas no seu interior, tornando a regeneração óssea mais eficaz. É ainda de salientar, que a taxa de degradação destes hidrogéis pode ser incrementada através de radiação gama, resultando em polímeros com peso molecular inferior, mais adequados para aplicações na ETO, que permitem um crescimento celular mais rápido (Kolambkar *et al.*, 2011).

### **3.2.2 Materias Sintéticos**

Os materiais sintéticos incluem metais (tântalo, titânio, ferro ou magnésio), polímeros (poliláctidos, poliglicólidos, poliuretanos ou policaprolactona) e cerâmicas (silicato de vidro, sulfatos e fosfatos de cálcio) (Bohner, 2010). Entre estes materiais, os fosfatos de cálcio destacam-se pelas suas excelentes propriedades ao nível da biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução, promovendo deste modo a regeneração óssea (Bohner, 2010).

Os polímeros sintéticos podem ser produzidos sob condições controladas e reprodutíveis, o que permite a produção de materiais com resistência à tração, elásticos e com uma taxa de degradação adequada para aplicações biomédicas (Bohner, 2010).

#### **3.2.2.1 Metais**

Ao longo da história, já foram introduzidos diferentes substitutos ósseos metálicos (Oliveira, 2007). O zircónio, o titânio e o aço inoxidável apresentam uma alta resistência à degradação e após a implantação no corpo humano não sofrem alterações significativas na sua superfície (Dubruille *et al.*, 1999; Geetha *et al.*, 2009; Mendonça *et al.*, 2009). Contudo, os implantes metálicos têm problemas de fixação, o que coloca em causa a sua resistência a longo prazo (Fu *et al.*, 2011). Devido a este facto surgiu a necessidade de se desenvolverem novas metodologias para induzir a capacidade de ligação do implante ao osso e, portanto, criar interfaces mais estáveis (Oliveira, 2007). A maioria dos implantes para a substituição óssea ou reparação de fraturas são produzidos com materiais que apresentam elevada resistência mecânica, tais como o titânio, que são selecionados para proporcionar um suporte mecânico. Estes metais são normalmente utilizados na construção de próteses ortopédicas, locais de ancoragem e implantes dentários (Coelho, 2001). Geralmente as ligas de titânio são utilizadas em implantes do joelho, e as placas e os parafusos são utilizados para reparar fraturas nos ossos longos e/ou da região craniofacial. Contudo, estes implantes metálicos apesar de apresentarem uma elevada rigidez, podem ter uma certa toxicidade devida à libertação de iões. Esta situação pode desencadear respostas por parte do hospedeiro tais como: metaloses, reações inflamatórias, encapsulação fibrosa e formação de biofilmes (Rodrigues, 2010). Deste modo, por vezes é necessária uma segunda intervenção cirúrgica para a remoção ou substituição do implante, devido a rejeição ou incompatibilidade com os tecidos circundantes, o que pode por em causa a integridade física do paciente (Lichte *et al.*, 2011).

#### **3.2.2.2 Polímeros Sintéticos**

Os polímeros sintéticos apresentam grande estabilidade e afinidade com os componentes celulares e ainda uma elevada resistência mecânica. Estes polímeros exibem propriedades que podem ser reproduzidas ao nível químico e físico e a sua taxa de degradação pode ser alterada,

para atender a requisitos específicos de aplicações diferentes (Shalumon *et al.*, 2011). Contudo, têm como principal desvantagem a falta de biocompatibilidade, na maioria dos casos (Osorio, 2007). Atualmente, na ETO os polímeros sintéticos mais utilizados são o ácido poliláctico, o ácido poliglicólico homo/heterodímero (APG), o polietileno glicol e os poliésteres biodegradáveis, tais como, o ácido poliláctido (APL), a PCL ou seus copolímeros (Osorio, 2007; Shalumon *et al.*, 2011). Estes polímeros são utilizados na preparação de membranas bioabsorvíveis, que são usados na regeneração de tecidos em periodontia; no desenvolvimento de microsferas para aplicações de preenchimento ósseo, potenciando a adesão e proliferação celular, assim como, a formação de uma matriz mineralizada e a expressão de colagénio tipo I (Verma e Kumar, 2010; Gentile *et al.*, 2011). É de salientar que a maioria destes polímeros, são conjugados com outros materiais (HA, vidros bioativos, colagénio, etc.) de forma a melhorar as suas propriedades mecânicas e biológicas, aumentando assim a sua biocompatibilidade e bioatividade (Huang *et al.*, 2010; Gaharwar *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2012).

### 3.2.2.3 Cerâmicas

As cerâmicas apresentam-se como sólidos não-metálicos, inorgânicos, preparados por tratamento térmico seguido de arrefecimento (Calori *et al.*, 2011). Os materiais cerâmicos são muito estáveis, constituem bons isolantes térmicos e elétricos, são duros e resistentes ao desgaste, não reativos, mas são frágeis partem com facilidade (Fullana *et al.*, 2010; Verron *et al.*, 2010; Van der Stok *et al.*, 2011).

As cerâmicas de fosfato de cálcio (CPhCs) foram introduzidas há já 40 anos e têm sido usadas com materiais de substituição óssea (Verron *et al.*, 2010; Van der Stok *et al.*, 2011). Estes materiais têm sido usados em aplicações médicas ortopédicas e maxilofaciais, sobretudo em aplicações ao nível das articulações (devido às elevadas forças de desgaste) em aplicações ósseas, revestimento de próteses ou para o preenchimento de grandes defeitos ósseos, em aplicações dentárias (sobretudo ao nível do revestimento de implantes) devido à sua semelhança com a parte mineral do osso. Por outro lado, a sua reconhecida biocompatibilidade, bioatividade, biodegradação e osteocondução contribuem para a sua utilização nesta aplicação biomédica (Fullana *et al.*, 2010; Verron *et al.*, 2010; Lichte *et al.*, 2011; Van der Stok *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2012).

Ao longo do tempo, vários tipos de materiais cerâmicos têm sido investigados incluindo HA (Figura 10), Tricálcio fosfato (TCP), bem como, compósitos como os fosfatos de cálcio (PhCs) bifásicos.

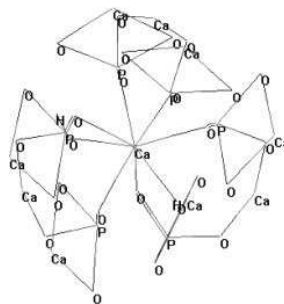


Figura 10. Representação da estrutura química da Hidroxiapatite, tendo o cálcio como átomo central (adaptado de Gutowska *et al.*, 2005).

Estes materiais representam as alternativas mais recentes para enxertos ósseos e existem em diferentes formas, tais como, grânulos, cerâmicas e cimentos (Verron *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2012). Estes materiais podem ser adaptados à forma do defeito ósseo e são rapidamente integrados na estrutura óssea, devido à ação dos osteoblastos, responsáveis pela remodelação óssea local (Fullana *et al.*, 2010; Verron *et al.*, 2010). Os implantes maxilofaciais, ortopédicos e dentários são, hoje em dia, revestidos por HA, com o objetivo de melhorar a fixação entre o implante e os tecidos ósseos vizinhos (Narayan, 2010). A HA é o principal constituinte inorgânico do osso humano e é a CPhC mais utilizada na ETO. Este material é utilizado na produção de partículas, filmes e *scaffolds* porosos que apresentam elevada biocompatibilidade e são amplamente utilizados em aplicações biomédicas na área do tecido ósseo (Chen *et al.*, 2011).

Contudo, as CPhCs também apresentam desvantagens tais como: fraca resistência mecânica e tenacidade sob estados de tensão complexos e apresentam uma biodegradação lenta *in vivo* (Fullana *et al.*, 2010; Verron *et al.*, 2010; Van der Stok *et al.*, 2011). Após a implantação dos CPhCs nos locais de defeito ósseo estes permanecem densos e com escassez de macroporosidade o que permitirá a colonização e o crescimento celular. Na tentativa de superar algumas destas limitações, a incorporação de micropartículas poliméricas degradáveis e/ou moléculas orgânicas têm uma grande importância para induzir a formação de macroporosidade que irá favorecer a adesão e proliferação celular, e a angiogênese, processos estes fundamentais para o crescimento ósseo (Fullana *et al.*, 2010; Verron *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2012). A incorporação de moléculas orgânicas também auxilia as CPhCs no controle da libertação de agentes terapêuticos/moléculas, uma vez que permitem acelerar a taxa de reabsorção e melhorar a colonização celular (Fullana *et al.*, 2010).

Uma outra cerâmica que tem vindo a ser utilizada, apesar de não ser tão usual como as anteriores citadas, é a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (Figura 11). Esta cerâmica devido à sua elevada dureza e resistência ao desgaste pode ser aplicada na área da regeneração óssea, tal como sugerem alguns estudos (Yoon *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2012). O óxido presente na superfície torna a alumina quimicamente inerte em ambiente biológicos. Este material tem também sido conjugado com outras cerâmicas, tais como a HA ou utilizado no revestimento de implantes de titânio (através do desenvolvimento de nanopartículas de alumina), melhorando o interface osso-implante e desta forma contribuir para a reparação óssea (Yoon *et al.*, 2008; Rodrigues, 2010; Batista *et al.*, 2012).

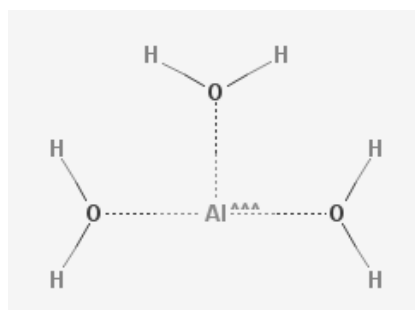


Figura 11. Estrutura química da Alumina (adaptado de PubChem).

A alumina tem sido utilizada como suporte de carga em próteses do quadril, implantes dentários e no revestimento de próteses (Lee e Shin, 2007; Costa *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2008;

Rodrigues, 2010; Batista *et al.*, 2012). As suas propriedades mecânicas semelhantes às do osso tornam a alumina um potencial candidato para ser usado em regeneração óssea.

### 3.2.3 Materiais Biocompósitos

Recentemente, têm sido desenvolvidos materiais poliméricos baseados em combinações de materiais naturais ou sintéticos (Sionkowska, 2011). A conjugação de materiais apresenta vantagens, uma vez que a combinação de propriedades (mecânicas e físico-químicas) vai potenciar o desenvolvimento de biomateriais mais eficazes na regeneração do tecido ósseo. Os biocompósitos são sintetizados de forma a criar um biomaterial que possua propriedades que os componentes isolados não possuem individualmente (Swetha *et al.*, 2010).

A combinação de cerâmicas bioativas (como os PhCs) com polímeros, proporcionam melhores propriedades mecânicas aos *scaffolds*. Fu e a sua equipa (2012) prepararam um hidrogel constituído por um copolímero de PEG-PCL-PEG, colagénio e nano-HA. Este biomaterial após implantação em defeitos ósseos craniais de coelhos, revelou possuir uma boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e promover a regeneração óssea (Fu *et al.*, 2012). Este biocompósito apresentou vantagens relativamente ao anteriormente produzido pela mesma equipa de investigação mas que não possuía colagénio e HA. A adição destes dois constituintes permitiu melhorar as propriedades físicas e químicas do biomaterial (Fu *et al.*, 2012).

A interação entre vários materiais torna-se mais vantajosa, porque há uma interligação de propriedades mecânicas, biológicas, físicas e químicas, que resultam num biomaterial mais eficaz. Por exemplo embora a utilização de polímeros naturais (qitosano, colagénio, etc.) seja bastante favorável devido ao facto de serem biocompatíveis e biodegradáveis, estes materiais quando utilizados isoladamente apresentam pouca resistência mecânica. Contudo, a combinação destes materiais com outros, como por exemplo a HA, permite a melhoria das propriedades mecânicas do biocompósito desenvolvido. A interação entre as propriedades de materiais diferentes, resulta num biomaterial mais completo, capaz de se assemelhar com o tecido ósseo nativo, apresentando resultados mais promissores para a regeneração óssea. Hoje em dia, estudos efetuados à nanoescala, têm apresentado resultados ainda mais promissores no que diz respeito à regeneração óssea (Swetha *et al.*, 2010).

## 4. Aplicação Clínica dos Biomateriais desenvolvidos pela Engenharia de Tecido Ósseo

A panóplia de biomateriais existentes na atualidade tem como objetivo suprimir a lesão e regenerar o tecido lesado. A diversidade de biomateriais que existem atualmente estão relacionados com o objetivo de produzir substitutos ósseos que reproduzam a 100% a estrutura nativa do osso, tendo em conta o local da lesão. A ETO tem procurado desenvolver metodologias que permitam a criação do substituto ósseo “ideal”, para posteriormente ser utilizado pela medicina, na área da ortopedia, cirurgia maxilo-facial, estética e medicina dentária (Dimitriou *et al.*, 2011).

Apesar da matriz óssea natural ser um compósito de cerâmicos (hidroxiapatite) e polímeros (colagénio) é difícil mimetizar a sua estrutura. Assim, os investigadores têm procurado desenvolver um biomaterial que promova ligações físico-químicas com o tecido ósseo e desta forma reproduzir a estrutura óssea. A ETO tem permitido o desenvolvimento de novos materiais.

Na tabela 2 apresentam-se algumas classes de biomateriais utilizados com substitutos ósseos em meio clínico.

**Tabela 2.** Exemplos de biomateriais utilizados como substitutos ósseos (adaptado de Bohner, 2010; Narayan, 2010; Rodrigues, 2010; Fonseca, 2011).

<b>Biomateriais</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Aguns exemplos</b>
<b>Metais</b>	Resistente, dúctil	Denso, pode corroer	Placas ósseas, implantes de osso sujeito a carga, locais de ancoragem, aparelhos dentários	Titânio, aço
<b>Cerâmicos</b>	Bioativo, reabsorvível, alta resistência ao desgaste	Frágil, tração pobre, baixa resistência	Reconstrução maxilo-facial, revestimento de próteses e implantes dentários, preenchimento ósseo,	Alumina, hidroxiapatite, vidros bioativos, Fosfatos de cálcio
<b>Polímeros</b>	Fléxivel, moldável	Frágil (não tanto como os cerâmicos), alguns produtos de degradação podem ser tóxicos	Preenchimento ósseo e dentário, como sistema de entrega de fármacos	APL, APLG, PCL, colagénio, gelatina, quitosano, alginato
<b>Biocompósitos</b>	Forte, flexibilidade de design nanocompósitos	As propriedades podem ser alteradas consoante a metodologia de fabrico	Substitutos ósseos, sistemas de entrega de fármacos	HA/colagénio, HA/gelatina, HA/quitosano, HA/alginato HA/APLG

## 5. Ensaio *in vitro* e *in vivo*

Um dos objetivos fulcrais do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade de diferentes tipos de biomateriais.

Os testes de biocompatibilidade pretendem avaliar as interações entre o biomaterial e o local da implantação (tecidos, órgãos em estudo e envolventes). Estes testes podem ser avaliados *in vitro* e *in vivo*, através da resposta celular e sistémica à presença dos materiais (Osorio, 2007).

### 5.1 Caracterização da biocompatibilidade dos materiais *in vitro*

Os testes de citotoxicidade são usados para realizar uma triagem confiável e imprescindível para detetar, numa fase inicial, se um determinado biomaterial induz morte celular ou outros efeitos negativos sobre as funções celulares (Gomes *et al.*, 2001; Osorio, 2007).

O termo citotoxicidade pretende designar os efeitos tóxicos (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática, etc.) que vão ocorrer ao nível celular (Osorio, 2007). Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são referenciados pelas normas nacionais e

internacionais (US Food and Drug Administration and International Standards Organization Guidelines) (ISO 10993-5) (Northup, 1996, 1999; Osorio, 2007).

Para realizar os ensaios de citotoxicidade *in vitro* é necessária a utilização de uma cultura celular, que obedeça a cuidados específicos durante a sua manipulação. Deste modo, é importante a seleção de um meio de cultura apropriado com antimicóticos e antibióticos, em quantidades apropriadas para o crescimento celular e são necessárias condições próprias para a sua manipulação, tais como: condições de assépsia, mudança de meio de dois em dois dias, análise por microscópica ótica e quando os biomateriais são colocados em contacto com as células, estes devem estar estéreis para evitar possíveis contaminações (ISO 10993-5).

A realização dos testes de citotoxicidade (métodos diretos e indiretos) vai variar consoante as características do material, o local de aplicação e a natureza da utilização (ISO 10993-5). Esta escolha determina toda a preparação das amostras, bem como a preparação das culturas celulares. Os numerosos métodos utilizados na determinação da citotoxicidade podem ser agrupados em categorias, consoante o tipo de avaliação: avaliação das lesões celulares ao nível morfológico, avaliação da medição das lesões celulares, avaliação da medição do crescimento celular e avaliação de medidas específicas do metabolismo celular (ISO 10993-5).

No caso da utilização de métodos diretos, o material que se pretende analisar é colocado em meio de cultura, em contacto direto com uma monocamada de células, enquanto que, no método indireto o material não é diretamente colocado em contacto com as células (o material é colocado num meio de cultura, sendo *à posteriori* esse meio retirado e colocado em contacto com as células) (ISO 10993-5).

A principal vantagem da realização dos testes de citotoxicidade/biocompatibilidade *in vitro*, é devido a apresentarem uma elevada sensibilidade, permitem claramente identificar materiais potencialmente citotóxicos numa fase inicial. A sua velocidade de resposta e eficácia em termos económicos, tornam-nos particularmente adequados para o rastreio de um grande número de potenciais biomateriais para aplicação na ETO. Posteriormente, se os resultados obtidos *in vitro* forem positivos (biocompatíveis), proceder-se-à numa fase seguinte, a realização dos ensaios *in vivo*. Após a realização dos ensaios *in vitro*, são efectuados ensaios com animais. No entanto, o número de animais que é necessário usar será menor.

Os testes de citotoxicidade/biocompatibilidade *in vitro*, utilizados no presente trabalho foram dois: o ensaio de MTT e de MTS, existindo outros como ensaio de LDH (lactato desidrogenase), método de difusão em agar e método de diluição.

### 5.1.1 Ensaios de MTT

O ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) ajuda-nos a quantificar a morte celular numa determinada amostra de células através de um ensaio colorimétrico. Ou seja, este método permite avaliar a toxicidade de um determinado biomaterial.

Quando se coloca o reagente de MTT, corante amarelo, em contacto com as células viáveis (que possuem a enzima mitocondrial funcional, a *succinato desidrogenase*) ocorre a redução do reagente MTT, num composto, 1-[4,5-dimetiltiazol2-yl]-3,5 difenilformazano (formazano), com cor violeta, através de uma reação de oxidação-redução mitocondrial. O produto resultante é acumulado dentro da célula e é extraído através da adição de um solvente apropriado

(isopropanol/ácido clorídrico (HCl)). Os cristais formados são posteriormente dissolvidos com dimetilsulfóxido ou isopropanol/HCl, resultando numa solução com uma absorvância que irá ser lida num leitor ELISA a 570 nm. A quantidade de cristais de formazano formados no interior das células é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Ribeiro, 2009; Rodrigues, 2010).

Assim, este método permite uma avaliação quantitativa da citotoxicidade de um determinado biomaterial, através da medição do parâmetro morte celular, inibição do crescimento celular, quantidade de proteína libertada (ISO 10993-5).

### 5.1.2 Ensaio de MTS

O reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H - tetrazólio (MTS) em conjunto com a fenazina metossulfato (PMS), vai ser reduzido por ação da enzima desidrogenase (encontrada em células metabolicamente ativas), resultando num produto de cor castanha, formazano. O PMS é um acoplador de eletrões que é utilizado em reações de desidrogenase e apresenta a vantagem de produzir reações coloridas decorrentes da formação de formazano.

A intensidade da cor está diretamente relacionada com o número de células viáveis *in vitro*, ou seja, numa situação de grande proliferação celular a quantidade de formazano formado será elevada.

Os testes de citotoxicidade/biocompatibilidade *in vitro* apresentados, MTT e MTS, apresentam alguma similaridade. Contudo, enquanto que o ensaio MTT é utilizado pontualmente num determinado momento, uma vez que os reagentes utilizados (dimetilsulfóxido ou isopropanol, dissolvem os cristais formados) lesionam a célula, não sendo possível repetir o ensaio *à posteriori*; os reagentes utilizados no ensaio de MTS não provocam lesão celular e como tal este ensaio pode ser realizado ao longo do tempo, permitindo um acompanhamento da proliferação celular.

### 5.1.3 Avaliação qualitativa (Microscópio Ótico e Microscópio Eletrónico de Varrimento)

Durante os estudos *in vitro*, as culturas celulares devem ser cuidadosamente acompanhadas e observadas ao microscópio ótico (MO) e ao microscópio eletrónico de varrimento (MEV), uma vez que, a avaliação da sua morfologia e do seu comportamento de adesão são indicadores da biocompatibilidade do biomaterial (ISO 10993-5). Estes dois microscópios têm características diferentes e como tal o MO permite a observação das células e da sua morfologia, enquanto que o MEV permite observar a adesão celular ao biomaterial, para além de uma observação muito mais ampliada da célula e da sua interação com a superfície do biomaterial.

As propriedades físico-químicas do biomaterial vão condicionar a reação das células com este. Deste modo, se a célula aderir ao biomaterial quer dizer que este é biocompatível. Este fenómeno biológico pode ser observado pormenorizadamente através do MEV, uma vez que este microscópio permite observar com um elevado poder de ampliação e resolução a superfície dos materiais, sendo facilmente observada a interação célula-biomaterial através da visualização de prolongamentos citoplasmáticos (filopodia) emitidos pela célula em contacto com o biomaterial.

É de salientar que a ausência de adesão celular pode não estar relacionada com o efeito tóxico do biomaterial, mas apenas, com as propriedades de superfície do biomaterial. Deste modo, a realização dos testes de citotoxicidade deve ser complementada com uma análise microscópica, para se efetuar uma avaliação cuidadosa do biomaterial em estudo.

## 5.2 Caracterização da biocompatibilidade dos materiais *in vivo*

Apesar do progresso considerável e do esforço dispensado na realização dos ensaios *in vitro*, uma análise dos resultados obtidos sugere que a realização de apenas testes *in vitro* não é suficiente, no sentido de eliminar os ensaios *in vivo*. A utilização de estudos preliminares *in vitro* é encorajada para fins de rastreio, antes da realização de testes *in vivo*, a fim de reduzir o número de animais utilizados (ISO 10993).

Após se ter verificado nos ensaios *in vitro* que o biomaterial em estudo é biocompatível, deve ser efetuada a avaliação da biocompatibilidade do biomaterial *in vivo*, num modelo animal relevante (Pinto, 2010). Ou seja, o biomaterial testado deve ser implantado num modelo animal para ser avaliada a sua biocompatibilidade num organismo vivo, para ajudar a prever a resposta humana. Normalmente, os investigadores iniciam os testes com um modelo de pequenas dimensões (o rato Wistar é comumente utilizado), devido quer aos custos envolvidos, quer à maior facilidade em comparar resultados com a grande variedade de experiências relatadas na literatura. Numa fase seguinte, utilizam-se animais de grande porte (coelho, ovelha, cabra, porco e cão). Animais como o coelho, a ovelha e cabra apresentam um metabolismo e uma taxa de remodelação óssea semelhante à apresentada pelo ser humano e como tal faz todo o sentido a sua avaliação numa pré-fase (Pinto, 2010). Numa fase posterior, se for caso disso, serão realizados os ensaios pré-clínicos em humanos.

Os testes *in vivo* têm início com a seleção do modelo animal que melhor se adapta aos objetivos específicos da experiência e o número de animais que deve ser utilizado, uma vez que a manutenção dos animais, após a intervenção cirúrgica é dispendiosa, e por este motivo e por questões éticas é necessário garantir que o modelo escolhido é o mais adequado, o número de animais envolvidos é estritamente o necessário e a duração pretendida dos testes, seguindo deste modo, as diretrizes estabelecidas pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), da União Europeia Diretiva 86/609/CEE e da ISO 10993-2. Deste modo, o investigador deve pedir autorização à DGAV a permissão para a execução da experiência preenchendo um formulário detalhado da realização da mesma.

Depois de analisada a espécie e o número de animais necessários para experiência, realizam-se dois grupos de animais, os animais que servirão como controlo da experiência (grupo controlo) e os animais onde será implantado o biomaterial (grupo teste). O procedimento cirúrgico será realizado da mesma forma nos dois grupos (ISO 10993-6).

O biomaterial que irá ser implantado no grupo teste, deve encontrar-se descontaminado e esterilizado. A sua implantação deve obedecer a cuidados de assépsia de tal forma que o biomaterial não seja danificado ou contaminado, antes ou durante a implantação. Posteriormente, os biomateriais devem ser implantados no tecido mais relevante para uso clínico. No caso do nosso estudo, o biomaterial será numa primeira fase implantado no tecido cutâneo (modelo ectópico) e *à posteriori* numa fase seguinte será implantado no tecido ósseo (ISO 10993-6). Na

primeira fase utiliza-se um modelo ectópico, com o intuito de se determinar se o biomaterial tem propriedades adequadas nomeadamente a porosidade e interconectividade, para permitir o crescimento interno de tecido e verificar se ocorre a neovascularização (Pinto, 2010). Desta forma, poderemos ajuizar sobre a capacidade dos biomateriais utilizados pela ETO formarem osso ectópico e também verificar a sua osteoindutividade, isto é, a capacidade do biomaterial induzir a proliferação celular, bem como a diferenciação celular em células da linhagem osteogénica (Pinto, 2010).

É de realçar que no caso de se utilizarem materiais degradáveis, devem ser considerados os estudos de degradação *in vitro* (ISO 10993-6) e avaliar a biodegradação do biomaterial implantado, em termos de produtos de degradação e a resposta do sistema imunitário do hospedeiro.

Após a implantação do biomaterial no tecido, a resposta ao implante vai ser comparada no grupo teste e no grupo controlo (ISO 10993-6).

Posteriormente, devem ser efetuados novos ensaios, uma vez que a abordagem *in vivo* deve reproduzir as condições fisiológicas do ser humano. No novo ensaio deve ser criado um defeito ósseo no animal que não cure espontaneamente durante o tempo de vida do animal (defeito crítico). O tamanho mínimo considerado para um defeito crítico ainda não é absolutamente claro (entre 2 a 4,5 mm) (ISO 10993-6) (Patel *et al.*, 2008; Sawyer *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010b). O defeito ósseo pode ser efetuado nos ossos do crânio ou num segmento parcial do osso cortical e/ou esponjoso (ISO 10993-6). Este osso apresenta um tamanho adequado para o procedimento cirúrgico e a intervenção cirúrgica é mais acessível. A dura-máter e a pele sobrejacente proporcionam uma boa fixação do implante. Este modelo tem sido sistematicamente estudado e está muito bem estabelecido (Patel *et al.*, 2008; Sawyer *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010b; Batista *et al.*, 2012).

Deste modo, os ensaios *in vivo* têm como objetivo avaliar a biocompatibilidade do biomaterial, através do estudo detalhado das interações deste com o tecido onde é implantado e com as reações que ocorrem a nível sistémico, uma vez que os materiais permanecem no organismo durante algum tempo. Os produtos de degradação, a sua concentração, as variações ocorridas nos materiais, a alteração da sua forma, podem induzir interações entre os locais adjacentes e os materiais, assim como afetar os sistemas vivos. A avaliação do tipo e da extensão da resposta na presença de um biomaterial por parte do hospedeiro, baseia-se na observação macroscópica e na resposta histopatológica (ISO 10993-6) obtida através da análise histológica dos tecidos que envolvem o implante e dos tecidos vitais no geral (coração, cérebro, fígado, baço, pâncreas e rins), uma vez que há constantemente uma interligação entre os tecidos e os órgãos através do sangue, do sistema linfático e dos fluídos intersticiais (ISO 10993-6). As avaliações histológicas das áreas afetadas incluem parâmetros tais como: extensão de uma cápsula fibrosa ou inflamação; alteração morfológica devido à degradação; número e distribuição das células intervenientes no processo inflamatório em virtude do interface material-tecido; a presença, extensão e tipo de necrose, qualidade e quantidade do crescimento do tecido e outras alterações (vascularização, formação de granuloma ou formação óssea) (ISO 10993-6).

Deste modo, a toxicidade do biomaterial pode ser detetada não só no tecido onde foi implantado como ao nível dos órgãos vitais que podem ficar lesionados.

## 6. Referências Bibliográficas

Afonso AS. Interação entre Biomateriais e Tecido Osseo. *Faculdade de Medicina Dentária*. ed. Porto: Universidade do Porto 1998.

Allo BA, Costa DO, Dixon SJ, Mequanint K, Rizkalla AS. Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials* 2012, 3: 432-463.

Anderson JM. Biocompatibility. In: Editors-in-Chief: Krzysztof M, Martin M eds., *Polymer Science: A Comprehensive Reference* Amsterdam: Elsevier 2012: 363-383.

Arellano JLP. Fisiopatologia del tejido óseo. *Manual de Patología General*. 6 ed. Barcelona: Masson 2006: 716-724.

Arpornmaeklong P, Pripatnanont P, Suwatwirote N. Properties of chitosan-collagen sponges and osteogenic differentiation of rat-bone-marrow stromal cells. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008, 37: 357-366.

Bansiddhi A, Sargeant TD, Stupp SI, Dunand DC. Porous NiTi for bone implants: A review. *Acta Biomaterialia* 2008, 4: 773-782.

Batista PSP. Diferenciação Osteoblástica de Células Mesenquimatosas do Tecido Adiposo de Rato na presença de Purmorfamina. *Faculdade de Medicina*. ed. Coimbra: Universidade de Coimbra 2009.

Batista P, Rodrigues M, Silva D, Morgado P, Henriques J, Almeida M, Silva A, Correia IJ. Characterization of the mechanical and biological properties of a new alumina scaffold. *J Appl Biomater Function Mater* 2012, doi: 10.5301/JABFM.2012.9264.

Bellucci D, Cannillo V, Sola A. Shell Scaffolds: A new approach towards high strength bioceramic scaffolds for bone regeneration. *Materials Letters* 2010, 64: 203-206.

Ben-David D, Kizhner TA, Kohler T, Müller R, Livne E, Srouji S. Cell-scaffold transplant of hydrogel seeded with rat bone marrow progenitors for bone regeneration. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2011, 39: 364-371.

Beswick A, Blom AW. Bone graft substitutes in hip revision surgery: A comprehensive overview. *Injury* 2011, 42, Supplement 2: S40-S46.

Bohner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Materials Today* 2010, 13: 24-30.

Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomaterialia* 2012, 8: 1401-1421.

Butscher A, Bohner M, Hofmann S, Gauckler L, Müller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 907-920.

Cabral M. Estudo do tecido ósseo relacionado com patologias dos maxilares e influência de materiais exógenos. *Faculdade de Medicina Dentária*. ed. Porto: Universidade do Porto 2004.

Cabrita AMS. Tecido ósseo - Alguns aspectos morfológicos e funcionais. *Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia* 1993, 1: 102-108.

Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury* 2009, 40, Supplement 3: S67-S76.

Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury* 2011, 42, Supplement 2: S56-S63.

Carrascal E. *Histologia Humana I*. Salamanca: Libreria Cervantes 2001: 345-360.

Chang C, Peng N, He M, Teramoto Y, Nishio Y, Zhang L. Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nano-materials. *Carbohydrate Polymers* 2013, 91: 7-13.

Chen F-M, Zhao Y-M, Zhang R, Jin T, Sun H-H, Wu Z-F, Jin Y. Periodontal regeneration using novel glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin scaffolds containing microspheres loaded with bone morphogenetic proteins. *Journal of Controlled Release* 2007, 121: 81-90.

Chen C-HD, Chen C-C, Shie M-Y, Huang C-H, Ding S-J. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate/alginate bone cement. *Materials Science and Engineering C* 2011, 31: 334-341.

Cheng H-w, Luk KDK, Cheung KMC, Chan BP. In vitro generation of an osteochondral interface from mesenchymal stem cell-collagen microspheres. *Biomaterials* 2011, 32(6): 1526-1535.

Coelho MJR. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Faculdade de Medicina Dentária*. ed. Porto: Universidade do Porto 2001.

Coimbra PMA. Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. *Faculdade de Ciências e Tecnologia*. ed. Coimbra: Universidade de Coimbra 2010.

Coimbra P, Ferreira P, Sousa H, Batista P, Rodrigues M, Correia I, Gil M. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011, 48: 112-118.

Connelly JT, García AJ, Levenston ME. Inhibition of in vitro chondrogenesis in RGD-modified three-dimensional alginate gels. *Biomaterials* 2007, 28(6): 1071-1083.

Correlo VM, Boesel LF, Pinho E, Costa-Pinto AR, Alves da Silva ML, Bhattacharya M, Mano JF, *et al.* Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: Morphology and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009, 91A: 489-504.

Costa HS, Mansur AAP, Barbosa-Stancioli EF, Pereira MM, Mansur HS. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA. *Journal of Materials Science* 2008, 43: 510-524.

Cui W, Li X, Xie C, Chen J, Zou J, Zhou S, Weng J. Controllable growth of hydroxyapatite on electrospun poly(dl-lactide) fibers grafted with chitosan as potential tissue engineering scaffolds. *Polymer* 2010, 51: 2320-2328.

Dias MIR. Regeneração Óssea - Efeito do volume ou da associação ao plasma enriquecido em plaquetas nas propriedades osteogénicas do enxerto de osso esponjoso autólogo. Estudo dos marcadores bioquímicos de formação óssea durante o processo de cicatrização das fracturas ósseas. ed. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro 2004.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 2011, 9: 2-10.

Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Novel 3D scaffolds of chitosan-PLLA blends for tissue engineering applications: Preparation and characterization. *The Journal of Supercritical Fluids* 2010 (a), 54: 282-289.

- Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Preparation of Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering using Supercritical Fluid Technology. *Materials Science Forum* 2010 (b), 636-637: 22-25.
- Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. The role of organic solvent on the preparation of chitosan scaffolds by supercritical assisted phase inversion. *The Journal of Supercritical Fluids* 2010 (c).
- Dubruille J-H, Viguier E, Naour GL, Dubruille M-T, Auriol M, Charpentier YL. Evaluation of Combinations of Titanium, Zirconia, and Alumina Implants with 2 Bone Fillers in the Dog. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1999: 271-277.
- Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y, Hamada Y, Matsumoto T, Saeki M, Thakor DK, Tabata Y, Matsuura N, Yatani H. Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. *Biomaterials* 2009, 30(27): 4676-4686.
- Eniwumide JO, Yuan H, Cartmell SH, Meijer GJ, Buijn JDd. Ectopic Bone Formation In Bone Marrow Stem Cell Seeded Calcium Phosphate Scaffolds As Compared To Autograft And (Cell Seeded) Allograft. *European Cells and Materials* 2007, 14: 30-39.
- Eurell JC, Van Sickle DC. Connective and support tissue. In *Textbook of Veterinary Histology*. 5<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1998.
- Fernandes MHR. Mecanismos de regulação do metabolismo ósseo. *Acta Médica Portuguesa* 1998, 11: 41-52.
- Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C, Smeets R. Future of local bone regeneration e Protein versus gene therapy. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2011, 39: 54-64.
- Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD. *Tissue Engineering*. CRC Press 2007.
- Fonseca I Ad. *Modificação Superficial de Ossos para Aplicações em Ortopedia Faculdade de Ciências e Tecnologia*. ed. Coimbra: Universidade de Coimbra 2011.
- Fonseca KB, Bidarra SJ, Oliveira MJ, Granja PL, Barrias CC. Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments. *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 1674-1682.
- Fu Q, Saiz E, Tomsia AP. Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration. *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 3547-3554.
- Fu S, Ni P, Wang B, Chu B, Zheng L, Luo F, Luo J, Qian ZH. Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration. *Biomaterials* 2012, 33(19): 4801-4809.
- Fujisawa R, Mizuno M, Nodasaka Y, Yoshinori K. Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein. *Matrix Biology* 1997, 16: 21-28.
- Fullana SG, Ternet H, Freche M, Lacout JL, Rodriguez F. Controlled release properties and final macroporosity of a pectin microspheres-calcium phosphate composite bone cement. *Acta Biomaterialia* 2010, 6: 2294-2300.
- Gaharwar AK, Schexnailder PJ, Kline BP, Schmidt G. Assessment of using Laponite® cross-linked poly(ethylene oxide) for controlled cell adhesion and mineralization. *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 568-577.
- Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Progress in Materials Science* 2009, 54: 397-425.

Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnology Journal* 2011, 6: 1187-1197.

Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Regenerative Medicine. *Current Problems in Surgery* 2011, 48: 148-212.

Gomes ME, Reis RL, Cunha AM, Blitterswijk CA, Bruijn JDd. Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: effect of several additives and processing conditions. *Biomaterials* 2001, 22(13): 1911-1917.

Grellier M, Granja PL, Fricain J-C, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, Bourget C, Amédée J, Barbosa MA. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* 2009, 30(19): 3271-3278.

Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002, 295: 1009-1014.

Gutowska I, Machoy Z, Machaliński B. The role of bivalent metals in hydroxyapatite structures as revealed by molecular modeling with the HyperChem software. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2005, 75A: 788-793.

Halsey MF, McLeod K, Rubin C. The Biology of Bone. In: Dee R, Hurst LC, Gruber MA, Kottmeier SA eds., *Principles of Orthopaedic Practice* New York: The McGraw-Hill Companies 1997: 17-36.

Hannink G, Arts JJC. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury, International Journal of the Care Injured* 2011, 42: S22-S25.

Healy KE, Guldberg RE. Bone tissue engineering. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions* 2007, 7: 328-330.

Hench LL, Wilson J. *An Introduction to Bioceramics*. 1<sup>st</sup> ed. London: Word Scientific 1993, 1.

Herndon DN, Hayward PG, Rutan RL, Barrow RE. Growth hormones and factors in surgical patients. *Advances in Surgery* 1992, 25: 65-97.

Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials* 2005, 4: 518-524.

Holzappel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012.

Huang W, Shi X, Rena L, Du C, Wang Y. PHBV microspheres - PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010, 31(15): 4278-4285.

Hunt N, Smith A, Gbureck U, Shelton R, Grover L. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomaterialia* 2010, 6: 3649-3656.

Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2007, 1: 245-260.

Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review. *Carbohydrate Polymers* 2010, 82: 227-232.

Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects-Review Article. *International Journal of Dentistry* 2012, Article ID 148261: 7 pages.

- Johnson KE. Histology and Cell Biology. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1991.
- Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J eds., *Histologia Básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1999: 111-128.
- Katja H, Marieb E. Human anatomy & physiology. 7 ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings 2007.
- Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N, Esmaeelinejad M, Alikhassy Z, Stevens M. Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 2012 (a).
- Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Stevens M. Current Trends in Mesenchymal Stem Cell Application in Bone Augmentation: A Review of the Literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012 (b), 70(4): 972-982.
- Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003, 24(13): 2339-2349.
- Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2008: 131-164.
- Kievit FM, Florczyk SJ, Leung MC, Veisheh O, Park JO, Disis ML, Zhang M. Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. *Biomaterials* 2010, 31(22): 5903-5910.
- Kim IY, Kim MM, Kim S-J. Transforming growth factor-beta: biology and clinical relevance. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2005, 38(1): 1-8.
- Kim I-Y, Seo S-J, Moon H-S, Yoo M-K, Park I-Y, Kim B-C, Cho C-S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications - Research review paper. *Biotechnology Advances* 2008, 26: 1-21.
- Kim SE, Song S-H, Yun YP, Choi B-J, Kwon IK, Bae MS, Moon H-J, Kwon Y-D. The effect of immobilization of heparin and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. *Biomaterials* 2011, 32(2): 366-373.
- Ko J, Kolehmainen K, Ahmed F, Jun MBG, Willerth SM. Towards high throughput tissue engineering: development of chitosan-calcium phosphate scaffolds for engineering bone tissue from embryonic stem cells. *American Journal of Stem Cell* 2012, 1: 81-89.
- Kolambkar YM, Dupont KM, Boerckel JD, Huebsch N, Mooney DJ, Hutmacher DW, Guldberg RE. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 2011, 32(1): 65-74.
- Kuo Y-C, Yeh C-F. Effect of surface-modified collagen on the adhesion, biocompatibility and differentiation of bone marrow stromal cells in poly(lactide-co-glycolide)/chitosan scaffolds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011, 82(2): 624-631.
- Laurencin CT, Nair LS. *Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group 2008.
- Larsson S, Hannink G. Injectable bone-graft substitutes: Current products, their characteristics and indications, and new developments. *Injury* 2011, 42: S30-S34.
- Lee CSD, Moyer HR, I. RAG, Williams JK, Boskey AL, Boyan BD, Schwartz Z. Regulating in vivo calcification of alginate microbeads. *Biomaterials* 2010 (a), 31(18): 4926-4934.

- Lee E-J, Jun S-H, Kim H-E, Koh Y-H. Collagen-silica xerogel nanohybrid membrane for guided bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2012, 100A: 841-847.
- Lee J-H, Kim C-S, Choi K-H, Jung U-W, Yun J-H, Choi S-H, Cho K-S. The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*. *Biomaterials* 2010 (b), 31(13): 3512-3519.
- Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59: 339-359.
- Lei B, Shin K-H, Noh D-Y, Koh Y-H, Choi W-Y, Kim H-E. Bioactive glass microspheres as reinforcement for improving the mechanical properties and biological performance of poly( $\epsilon$ -caprolactone) polymer for bone tissue regeneration. *Society for Biomaterials* 2012: 967-975.
- Li J, Zhu D, Yin J, Liu Y, Yao F, Yao K. Formation of nano-hydroxyapatite crystal in situ in chitosan-pectin polyelectrolyte complex network. *Materials Science and Engineering: C* 2010, 30: 795-803.
- Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury* 2011, 42: 569-573.
- Lienemann PS, Lutolf MP, Ehrbar M. Biomimetic hydrogels for controlled biomolecule delivery to augment bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, 64(12): 1078-1089.
- Lima AC, Batista PS, Valente TAM, Silva AS, Correia IJ, Mano J. Novel Methodology Based on Biomimetic Superhydrophobic substrates to Immobilize Cells and Proteins in Hydrogel Spheres for Applications in Bone Regeneration. *Tissue Engineering* 2012, 19(9-10): 1175-1187.
- Lo KWH, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, 64: 1277-1291.
- Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today* 2004, 7(5): 30-40.
- Mahendra A, Maclean AD. Available biological treatments for complex non-unions Injury, *International Journal of the Care Injured* 2007, 38S4: S7-S12.
- Malafaya P, Pedro A, Peterbauer A, Gabriel C, Redl H, Reis R. Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2005, 16: 1077-1085.
- Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59: 207-233.
- Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, *et al.* Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of The Royal Society Interface* 2007, 4: 999-1030.
- Martin TJ, Findlay DM, Herth JK, Ng KW. Osteoblasts: Differentiation and Function. In: Mundy GR, Martin TJ eds., *Handbook of Experimental Pharmacology* Berlin: Springer-Verlag 1993: 149-183.
- Martin TJ, Ng KW, Nicholson GC. Cell biology in bone. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism* 1988, 2: 1-29.
- Martins AM, Alves CM, Kurtis Kasper F, Mikos AG, Reis RL. Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade. *Journal of Materials Chemistry* 2010, 20: 1638-1645.

- Martins AM, Pereira RC, Leonor IB, Azevedo HS, Reis RL. Chitosan scaffolds incorporating lysozyme into CaP coatings produced by a biomimetic route: A novel concept for tissue engineering combining a self-regulated degradation system with in situ pore formation. *Acta Biomaterialia* 2009, 5: 3328-3336.
- Mateus AYP. Development, Characterisation and Application of Calcium Phosphates Nanocrystals Aggregates in a Collagen Matrix to be used as Biomaterial in Bone Regeneration. *Faculdade de Engenharia*. ed. Porto: Universidade do Porto 2010.
- Mehta M, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Mooney DJ. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, 64: 1257-1276.
- Mendonça G, Mendonça DBS, Simões LGP, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Aragão FJL, Cooper LF. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials* 2009, 30(25): 4053-4062.
- Miranda SCCC, Silva GAB, Hell RCR, Martins MD, Alves JB, Goes AM. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. *Archives of Oral Biology* 2011, 56: 1-15.
- Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, Wheeler MB. Biology and Therapeutic Use of Domestic Animal Stem Cells: Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology* 2011, 75 1381-1399.
- Mou Z-L, Zhao L-J, Zhang Q-A, Zhang J, Zhang Z-Q. Preparation of porous PLGA/HA/collagen scaffolds with supercritical CO<sub>2</sub> and application in osteoblast cell culture. *The Journal of Supercritical Fluids* 2011, 58: 398-406.
- Muhonen V. Bone- Biomaterial Interface: The effects of surface modified NiTi shape memory alloy on bone cells and tissue. *Acta Universitatis Ouluensis* 2008: 182.
- Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010, 31(3): 461-466.
- Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 2009, 76: 167-182.
- Muzzarelli RAA. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers* 2011, 83: 1433-1445.
- Narayan RJ. The next generation of biomaterial development. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2010, 368: 1831-1837.
- Noronha LCFFd. Efeito do cálcio extracelular na osteogénese através da regulação do calcium sensing receptor. *Faculdade de Engenharia*. ed. Porto: Universidade do Porto 2005.
- Northup SJ. In Vitro Assessment of Tissue Compatibility. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE eds., *Testing Biomaterials Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine* New York: Academic Press 1996: 215-220.
- Northup SJ. Safety Evaluation of Medical Devices: US Food and Drug Administration and International Standards Organization Guidelines. *International Journal of Toxicology* 1999, 18: 275-283.
- O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011, 14: 88-95.

Oliveira ALAM. New Biomimetic Approaches for Producing Bone-like Calcium-Phosphate Coatings on the Surface of Tissue Engineering 3D Architectures and Orthopaedic Implants. *Escola de Engenharia*. ed. Braga: Universidade do Minho 2007.

Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nature Reviews: Neuroscience* 2009, 10: 682-692.

Osorio SML. Novel polymeric systems based on natural materials: development and biological performance. *Escola de Engenharia*. ed.: Universidade do Minho 2007.

Palmeira-de-Oliveira A, Ribeiro M, Palmeira-de-Oliveira R, Gaspar C, Costa-de-Oliveira S, Correia I, Vaz CP, Maryinez-de-Oliveira J, Queiroz JÁ, Rodrigues AG. Anti-Candida Activity of a Chitosan Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile. *Gynecol Obstet Invest* 2010, 70: 322-7.

Pang X, Zhitomirsky I. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite-chitosan coatings. *Materials Characterization* 2007, 58: 339-348.

Parfitt AM. The two faces of growth: Benefits and risks to bone integrity. *Osteoporosis International* 1993, 4: 382-398.

Patel NR, Gohil PP. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* 2012, 91-101.

Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 2008, 43: 931-940.

Pérez-Sánchez M-J, Ramírez-Glindon E, Lledó-Gil M, Calvo-Guirado J-L, Pérez-Sánchez C. Biomaterials for bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010, 15: e517-522.

Petrovic V, Zivkovic P, Petrovic D, Stefanovic V. Craniofacial bone tissue engineering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 2012, 114: e1-e9.

Pielichowska K. Preparation of polyoxymethylene/hydroxyapatite nanocomposites by melt processing. *International Journal of Material Forming* 2008, 1: 941-944.

Pinto ARC. Potential of human bone marrow derived stem cells combined with chitosan based biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Escola de Engenharia*. ed. Braga: Universidade do Minho 2010.

Pratap J, Lian JB, Stein GS. Metastatic bone disease: Role of transcription factors and future targets. *Bone* 2011, 48: 30-36.

Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 2010, 35: 403-440.

Puzas JE. *The Osteoblast*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press 1993.

Re'em T, Tsur-Gang O, Cohen S. The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGF $\beta$ 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2010, 31: 6746-6755.

Reves BT, Jennings JA, Bumgardner JD, Haggard WO. Preparation and Functional Assessment of Composite Chitosan-Nano-Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials* 2012, 3: 114-130.

Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P, Correia IJ. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair and Regeneration* 2009, 17: 817-824.

Rodrigues MÂA. Desenvolvimento de um Biomaterial de Alumina para Futura Aplicação em Regeneração Óssea. *Faculdade de Ciências da Saúde*. ed. Covilhã: Universidade da Beira Interior 2010: 1-43.

Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2011: 218-252.

Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience* 2004, 4: 743-765.

Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CXF, Woodruff MA, Hutmacher DW, Cool SM. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 2009, 30(13): 2479-2488.

Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, Pérez-Bouza A, Neuss S. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* 2010, 31(3): 467-480.

Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2001, 34(4-5): 147-230.

Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011, 48: 571-576.

Shalumon KT, Anulekha KH, Girish CM, Prasanth R, Nair SV, Jayakumar R. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. *Carbohydrate Polymers* 2010, 80: 413-419.

Shi C, Chen W, Zhao Y, Chen B, Xiao Z, Wei Z, Hou X, Tang J, Wang Z, Dai J. Regeneration of full-thickness abdominal wall defects in rats using collagen scaffolds loaded with collagen-binding basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 2011, 32(3): 753-759.

Shih Y-RV, Chen C-N, Tsai S-W, Wang YJ, Lee OK. Growth of Mesenchymal Stem Cells on Electrospun Type I Collagen Nanofibers. *Stem Cells* 2006, 24: 2391-2397.

Sionkowska A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science* 2011, 36(9): 1254-1276.

Smith RL, Lindsey DP, Dhulipala L, Harris AHS, Goodman SB, Maloney WJ. Effects of Intermittent Hydrostatic Pressure and BMP-2 on Osteoarthritic Human Chondrocyte Metabolism In Vitro. *Journal of Orthopaedic Research* 2011: 361-368.

Solheim E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics* 1998, 22: 410-416.

Son JS, Lee K-B, Kim S-G, Kwon T-Y, Kim K-H. Porous calcium phosphate granules containing drug-loaded polymeric nanoparticles for bone regeneration. *Materials Letters* 2012, 76: 243-246.

Spector M. Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss Med Wkly* 2006, 136: 293-301.

Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* 2008, 11: 18-25.

Suárez-González D, Barnhart K, Migneco F, Flanagan C, Hollister SJ, Murphy WL. Controllable mineral coatings on PCL scaffolds as carriers for growth factor release. *Biomaterials* 2012, 33(2): 713-721.

Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2010, 47: 1-4.

Tan ML, Friedhuber AM, Dunstan DE, Choong PFM, Dass CR. The performance of doxorubicin encapsulated in chitosan-dextran sulphate microparticles in an osteosarcoma model. *Biomaterials* 2010, 31(3): 541-551.

Temtem Mr, Silva LgMC, Andrade PZ, dos Santos F, da Silva CuL, Cabral JMS, Abecasis MM. Supercritical CO<sub>2</sub> generating chitosan devices with controlled morphology. Potential application for drug delivery and mesenchymal stem cell culture. *The Journal of Supercritical Fluids* 2009, 48: 269-277.

Thein-Han WW, Misra RDK. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2009, 5: 1182-1197.

Tierney CM, Jaasma MJ, O'Brien FJ. Osteoblast activity on collagen-GAG scaffolds is affected by collagen and GAG concentrations. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009, 91A: 92-101.

Tripathi G, Basu B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International* 2012, 38: 341-349.

Tsuzuki N, Otsuka K, Seo J, Yamada K, Haneda S, Furuoka H, Tabata Y, Sasaki, N. In vivo osteoinductivity of gelatin b-tri-calcium phosphate sponge and bone morphogenetic protein-2 on an equine third metacarpal bone defect. *Research in Veterinary Science* 2012, 93: 1021-1025.

Tuzlakoglu K. Fiber-Based Structures from Natural Origin Polymers for Tissue Engineering Approches. *Escola de Engenharia* ed.: Universidade do Minho 2007.

Vallet-Regí M, Ruiz-Hernández E. Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine. *Advanced Materials* 2011, 23: 5177-5218.

Van der Stok J, Van Lieshout EMM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - A systematic literature review. *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 739-750.

Venkatesan J, Qian Z-J, Ryu B, Ashok Kumar N, Kim S-K. Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan - Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 2011, 83: 569-577.

Verma S, Kumar N. Effect of biomimetic 3D environment of an injectable polymeric scaffold on MG-63 osteoblastic-cell response. *Materials Science and Engineering C* 2010, 30(8): 1118-1128.

Verron E, Khairoun I, Guicheux J, Boulter J-M. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discovery Today* 2010, 15: 547-552.

Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, 64(12): 1293-1309.

Wang L, Lei DL, Cheng XB, Cao J, Tian L, Cui FZ. Effects of nerve growth factor delivery via a collagen/nano-hydroxyapatite gel to mandibular distraction osteogenesis in a rabbit model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009, 38: 557-558.

Wernike E, Montjovent M-O, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, Siebenrock K-A, Hofstetter W, Klenke FM. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *European Cells and Materials* 2010, 19: 30-40.

Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009, 30(30): 5897-5909.

Wojtowicz AM, Shekaran A, Oest ME, Dupont KM, Templeman KL, Hutmacher DW, Guldberg RE, Garcia AJ. Coating of biomaterial scaffolds with the collagen-mimetic peptide GFOGER for bone defect repair. *Biomaterials* 2010, 31(9): 2574-2582.

Wu ZX, Liu D, Wan SY, Cui G, Zhang Y, Lei W. Sustained-release rhBMP-2 increased bone mass and bone strength in an ovine model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Orthopaedic Science* 2011, 16: 99-104.

Xiao Y, Qian H, Young WG, Bartold PM. Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue Engineering* 2003, 9: 1167-1177.

Xu C, Su P, Chen X, Meng Y, Yu W, Xiang AP, Wang Y. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2011, 32(4): 1051-1058.

Xu XL, Lou J, Tang T, Ng KW, Zhang J, Yu C, Dai K. Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005, 75B: 289-303.

Yang B, Li X, Shi S, Kong X, Guo G, Huang M, Luo F, Wei YQ, Zhao X, Qian ZY. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers* 2010, 80(5): 860-865.

Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2009, 30(21): 3551-3559.

Yilgor P, Sousa RA, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. Effect of scaffold architecture and BMP-2/BMP-7 delivery on in vitro bone regeneration. *Journal of Material Science: Material Medicine* 2011, 21: 2999-3008.

Yilgor P, Yilmaz G, Onal MB, Solmaz I, Gundogdu S, Keskil S, Sousa RA, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. An in vivo study on the effect of scaffold geometry and growth factor release on the healing of bone defects. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2012.

Yoon B-H, Choi W-Y, Kim H-E, Kim J-H, Koh Y-H. Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering. *Scripta Materialia* 2008, 58: 537-540.

Zaborowska M, Bodin A, Bäckdahl H, Popp J, Goldstein A, Gatenholm P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2010, 6: 2540-2547.

Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009, 61: 988-1006.

Zhang Z-G, Li Z-H, Mao X-Z, Wang W-C. Advances in bone repair with nanobiomaterials: mini-review. *Cytotechnology* 2011, 63: 437-443.

Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 2769-2781.



## Capítulo 3



# Caracterização das propriedades mecânicas e biológicas do *scaffold* de Alumina (Artigo I)

Ao longo deste subcapítulo descreve-se a preparação e caracterização do *scaffold* de alumina, bem como a avaliação das suas propriedades mecânicas e biológicas.

## 1.1 Introdução

O tecido ósseo desempenha um papel fundamental na locomoção, garante que o esqueleto apresente uma capacidade de carga adequada e seja um invólucro de proteção para os órgãos internos do corpo (Stevens, 2008).

As fraturas e as doenças ósseas degenerativas representam um grave problema de saúde, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo (Santora e Skolbekken, 2010). O tecido ósseo apresenta uma notável capacidade regenerativa, contudo, em casos de deformidades congénitas, de grandes defeitos ósseos, em casos de pacientes mal nutridos ou que padeçam de diabetes apresentam uma capacidade de regeneração limitada. Nestes doentes o processo de regeneração é muito lento e não consegue suprimir as necessidades em causa. Hoje em dia, os materiais utilizados para a reconstrução óssea em meio clínico incluem o enxerto ósseo autógeno, enxerto ósseo alógeno ou a aplicação de materiais sintéticos. No entanto, existem várias limitações associadas a estes substitutos ósseos: disponibilidade limitada do enxerto ósseo autógeno (a obtenção de enxertos autógenos implica sofrimento extra para o paciente), os aloenxertos podem contribuir para a transmissão de doenças, e ainda, certos substitutos ósseos elaborados a partir de materiais sintéticos apresentam limitada osteointegração e desencadeiam reações adversas no organismo (Bueno e Glowacki, 2009).

A fim de ultrapassar estes problemas foram realizados diferentes estudos na área da engenharia de tecidos (Stevens, 2008; Dvir *et al.*, 2010; Coimbra *et al.*, 2011). Esta área de conhecimento aplica metodologias da engenharia de materiais e das ciências da vida para produzir diferentes dispositivos com células incorporadas para se formar um esqueleto temporário para o crescimento do novo tecido (Li *et al.*, 2005; Rezwan *et al.*, 2006; Bueno e Glowacki, 2009; Cenni *et al.*, 2010; Vallet-Regi, 2010).

As matrizes porosas podem ser produzidas com polímeros biológicos, tais como o colagénio e o ácido hialurónico, que fornecem uma informação biológica inata para a ligação e proliferação celular. Além disso, os polímeros sintéticos tais como polifumaratos, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico e de ácido poliglicólico, e policaprolactona, também têm sido estudados para aplicação na regeneração óssea (Li *et al.*, 2005; Puppi *et al.*, 2010; Ruckh *et al.*, 2010; Shalumon *et al.*, 2010).

Hoje em dia, uma abordagem comum na regeneração do tecido ósseo é o isolamento de células específicas do tecido ósseo, obtidas a partir de uma biópsia do paciente, e posteriormente colocá-las a crescer na presença de um *scaffold* tridimensional (3D), em condições de cultura controladas, para deste modo se reproduzir a estrutura de matriz extracelular, fornecendo informações importante às células para o desenvolvimento do tecido (Dvir *et al.*, 2010).

Posteriormente, as matrizes porosas com células são colocadas diretamente no local da lesão, onde o novo tecido será formado, no corpo do paciente. Uma abordagem alternativa é o implante de *scaffolds* no corpo do paciente com o objetivo de estimular e orientar a formação do tecido *in vivo* (Reyes *et al.*, 2007; Guarino *et al.*, 2008; Perez-Sanchez *et al.*, 2010). A vantagem desta abordagem é a de reduzir o número de cirurgias, resultando numa recuperação mais rápida do paciente. Além disso, os tratamentos com base nestas técnicas permitirão resolver problemas de escassez de doadores, rejeição imunológica e transferência de agentes patogénicos (Lee *et al.*, 2010).

Nos trabalhos realizados ao longo do meu doutoramento, foi utilizado um material biocerâmico, conhecido como alumina ( $Al_2O_3$ ) para produzir um *scaffold* 3D. O óxido de superfície torna a alumina quimicamente inerte em ambientes biológicos (biocompatível). Além disso, a cerâmica de alumina também possui uma elevada dureza e boa resistência ao desgaste, o que faz com que seja utilizada como suporte de carga em próteses do quadril e implantes dentários (Tohma *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010).

A alumina tem sido utilizada no fabrico de *scaffolds* para serem usados como substitutos ósseos (Bose *et al.*, 2002; Swan *et al.*, 2005; Rambo *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009a). Além disso, este biomaterial foi também combinado com outros materiais biocompatíveis, como os fosfatos de cálcio, tais como hidroxiapatite (HA), (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2008). Ribeiro e os seus colaboradores mostraram que os implantes de titânio revestidos com alumina, melhoram o contacto osso-implante, oferecendo vantagens no processo de reparação óssea (Ribeiro *et al.*, 2009a). Até agora, tem-se observado que os implantes de superfície revestida com nanopartículas de  $Al_2O_3$  promovem a diferenciação osteoblástica, através da expressão de genes e interação mecânica com o tecido ósseo circundante (Mendonça *et al.*, 2009). Na literatura foi também descrito que os *scaffolds* de alumina podem inicialmente permitir uma adesão e crescimento de osteoblastos comparável à apresentada pela HA, caso seja modificada de forma a produzir estruturas rugosas e porosas. Assim, a alumina apresenta-se como um material promissor para a regeneração óssea, uma vez que apresenta propriedades semelhantes às do tecido ósseo (Chanda *et al.*, 2009).

## 1.2 Materiais e Métodos

### 1.2.1 Materiais

Os *scaffolds* de alumina foram produzidos com alumina tabular comercial T60 (Alcoa, EUA). A linha celular de osteoblastos humanos hFOB 1.19 (CRL-11372), foi obtida a partir da American Type Culture Collection (VA, EUA). Esta linha celular é imortalizada e tem sido utilizada em estudos que envolvem aplicações ortopédicas (Harris *et al.*, 1995; Miki *et al.*, 2009). Anfotericina B, L-glutamina, meio de cultura celular (Dulbecco's Modified Eagle Medium - F12 (DMEM-F12)), MTT, etanol (EtOH), glutaraldeído, penicilina G, solução salina de fosfato (PBS), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido clorídrico (HCl), isopropanol, estreptomicina e tripsina foram adquiridos à Sigma (Sintra, Portugal). Soro fetal bovino (SFB) foi adquirido à Biochrom AG (Berlim, Alemanha). Quetamina e xilazina foram adquiridos à Agrofauna, Portugal. Frascos cultura celular (T-flasks) e placas de 96 poços foram adquiridos à Nunc (Dinamarca).

## 1.2.2 Métodos

### 1.2.2.1 Sintetização dos *scaffolds* de alumina

As amostras de matrizes porosas de alumina foram produzidas através de uma mistura de 3 tipos de alumina. Alumina tabular comercial T60 (Alcoa), disponível em dois tamanhos diferentes (<0,2 mm; 0,2-0,5 mm) com uma densidade compreendida entre 3,96 - 4 g/cm<sup>3</sup>, e alumina reativa (<0,7 µm) com uma área específica de superfície (AES) de 7 m<sup>2</sup>/g. O *scaffold* foi produzido de acordo com o método descrito na Patente Portuguesa #103432, 2008. A mistura foi elaborada através da adição de 33% de cada tipo de alumina, 1% de ácido cítrico, como antifloculante (0,36 mg/m<sup>2</sup> por AES), e água desionizada num homogeneizador. Após esta estar homogénea, foram feitos provetes de dimensões 10X30X50 mm<sup>3</sup>. Seguidamente, foram deixados à temperatura ambiente durante 24 h, e posteriormente secados a 110°C durante 24 h. Depois da secagem, foram sinterizados em ciclos de 1600°C numa mufla (Termolab) (Pinto *et al.*, 2010).

### 1.2.2.2 Caracterização das propriedades mecânicas dos *scaffolds* de alumina

Para caracterizar as propriedades mecânicas, foram utilizados cinco suportes de alumina, em cada ensaio.

O módulo de rutura (MOR) foi determinado sujeitando os *scaffolds* a um ensaio de rutura de três pontos (Zwick 1435, carga da célula, de 5kN), pelo procedimento descrito e padronizado na norma ASTM C-133. Em seguida, foi determinada a porosidade, a densidade e absorção das peças fraturadas (ASTM C-20). Foi também determinada a dureza, usando um aparelho Vickers AVK-C2 (Mitutoyo AVKC2).

### 1.2.2.3 Cultura celular de osteoblastos humanos

As células CRL-11372 foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com 6 ml de DMEM-F12 (1:1 v/v), suplementado com SFB (10% v/v) inativado, penicilina G (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e anfotericina B (0,25 µg/ml). As amostras foram mantidas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi mudado a cada 3 dias, até se obter confluência celular. A confluência foi obtida após 7 dias. Após a obtenção da mesma, as células foram lavadas com PBS/EDTA (0,025%). Seguidamente, adicionou-se tripsina (0,18%) e as células foram incubadas durante 3 minutos. Findo esse tempo, a atividade da tripsina foi bloqueada pela adição de meio de cultura com SFB (10% v/v). As células foram, então, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e semeadas em T-flasks 75 cm<sup>2</sup> (Maia *et al.*, 2009).

### 1.2.2.4 Proliferação das células CRL-11372 na presença de *scaffolds* de alumina

Para avaliar o comportamento celular, na presença do material cerâmico produzido, as células CRL-11372 foram semeadas na presença do *scaffold* (3x3 mm) numa placa de 96 poços, numa densidade de 5x10<sup>4</sup> células/poço, durante 24 h (n = 5).

O crescimento celular foi comparado com o de células CRL-11372 semeadas na ausência do *scaffold*. A proliferação celular foi monitorizada utilizando um microscópio ótico invertido - Olympus CX41 (Tóquio, Japão) equipado com uma câmara digital Olympus SP-500 UZ.

#### 1.2.2.5 Microscopia eletrônica de varrimento

A morfologia da superfície das cerâmicas de alumina na presença ou ausência de células humanas osteoblásticas, foi analisada por microscopia eletrônica de varrimento (MEV) durante 7 dias. As amostras ( $n = 4$ ) foram fixadas durante a noite com glutaraldeído (2,5% PBS) a 4°C. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS durante 2 min e desidratadas com etanol de acordo com um gradiente de 70, 80, 90 e 100%, durante 5 min cada. Seguidamente as amostras foram secadas através da utilização de CO<sub>2</sub> em condições supercrítica e colocadas em suportes adequados. Posteriormente, as amostras foram revestidas com ouro no equipamento Emitech K550 (Londres, Inglaterra) e observadas num MEV - Hitachi S-2700 (Tóquio, Japão) com uma voltagem 20 kV a diferentes ampliações.

#### 1.2.2.6 Avaliação do perfil de citotóxico do *scaffold* de alumina

Para avaliar a citotoxicidade do presente material cerâmico foram semeadas as células CRL-11372, com uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ml em placas de 96 poços com e sem *scaffolds* de alumina, e cultivadas com 100 µl de meio DMEM-F12 a 37°C, numa atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Os *scaffolds* de alumina foram imersos em etanol (96%) durante 24 h e secos a 40°C durante 4 h, a fim de promover a evaporação do etanol, e irradiados com UV durante 30 min. Posteriormente, estes *scaffolds* foram colocados em placas de 96 poços e foram semeadas células nos respectivos poços, formando o controlo positivo (K<sup>-</sup>). Simultaneamente, foi efetuado o mesmo processo para o controlo negativo (K<sup>+</sup>), no entanto, foi adicionado a cada poço etanol a 96% (K<sup>+</sup>) (Mitchell *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2009b; Dvir *et al.*, 2010; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2010).

Após 24 h, a viabilidade celular das células em contacto ou na ausência dos *scaffolds* foi avaliada pela redução do MTT em formazano púrpura ( $n = 5$ ). O meio de cultura de cada uma das amostras foi removido e adicionou-se 50 µl de MTT (5 mg/mL PBS). As placas foram colocadas numa incubadora durante 4 h a 37°C, numa atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Depois disso, o MTT foi cuidadosamente removido e seguidamente adicionou-se a cada poço 50 µl de isopropanol/HCl (0,04N) durante 90 min, a fim de solubilizar os cristais de formazano formados. O formazano produzido foi quantificado através do método colorimétrico. Foi efetuada a leitura da absorvância a 570 nm, usando um leitor de microplacas Biorad Microplate Reader Benchmark (Tóquio, Japão). A quantidade de formazano formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra (Capasso *et al.*, 2003; Ganapathy-Kanniappan *et al.*, 2010; Peter *et al.*, 2010).

#### 1.2.2.7 Ensaios *in vivo*

Neste estudo foram utilizados 24 ratos fêmea Wistar (12 semanas), com um peso compreendido entre 200 e 230 g. O protocolo animal efetuado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Hospitalar Cova da Beira e realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas no Guia para cuidados e uso de animais de laboratório. Cada animal foi anestesiado com uma injeção intraperitoneal IP (40 mg/kg de quetamina e 5 mg/kg de xilazina) de modo a serem submetidos a cirurgia. Os animais foram em seguida separados em dois grupos (teste e controlo), sendo cada um deles constituído por 12 animais. Subsequentemente, foi induzido um defeito ósseo na calote, de acordo com o procedimento descrito na literatura (Cooper *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011), em todos os animais com uma broca especial. No grupo controlo, o defeito ósseo

não foi preenchido com qualquer material, enquanto no grupo teste houve inserção do *scaffold* produzido na lesão óssea.

Os *scaffolds* de alumina foram esterilizados conforme descrito anteriormente na secção 1.2.2.6.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em jaulas individuais e alimentados com alimentação comercial e água *ad libitum*. Durante o período pós-operatório, todos os animais se apresentavam saudáveis. Os animais foram sacrificados após 7, 15, e 30 dias, com uma dose letal de anestesia.

#### 1.2.2.8 Análise histológica

Após necrópsia dos animais, foram recolhidas as amostras do defeito ósseo e os órgãos vitais (cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rins) de todos os animais. As amostras de osso foram descalcificadas utilizando uma solução de EDTA 10% durante um período de duas semanas, a 4°C. A solução de EDTA foi mudada todas as semanas.

Posteriormente, as amostras foram fixadas em formalina, desidratadas em etanol e impregnadas com parafina para o processamento histológico de rotina. Foram obtidas secções de 3 µm, de cada bloco de parafina e estas, foram seguidamente coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e avaliadas de forma independente por dois especialistas em Anatomia Patológica, utilizando um microscópio de ótico com um software específico da Olympus.

#### 1.2.2.9 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos no ensaio de MTT representam a média±erro padrão da média. A significância estatística foi calculada usando a análise de variância one-way ANOVA com teste de Dunnet's post hoc. Os cálculos foram realizados utilizando o MYSTAT 12 (Systat Software, uma subsidiária da Cranes Software International Ltd.).

### 1.3 Resultados

#### 1.3.1 Caracterização das propriedades macroscópicas do *scaffold* de alumina

Do ponto de vista macroscópico os *scaffolds* de alumina produzidos, apresentam uma cor branca opaca, com uma superfície rugosa e irregular (Figura 12A).

A análise MEV (Figura 12B e 12C) revelou uma estrutura superficial porosa interligada.

O *scaffold* apresentava uma porosidade de  $6,9 \pm 1,7\%$  e uma elevada dureza  $528,3 \pm 48,5$  MPa e Mor  $-55$  MPa. O biomaterial apresentou densidade de  $3,2 \pm 0,0$  g/cm<sup>2</sup> e absorção de água de  $2,2 \pm 0,4\%$ .

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, pode-se verificar que o referido material cerâmico tem maior estabilidade termodinâmica, devido ao seu processo de fabrico.

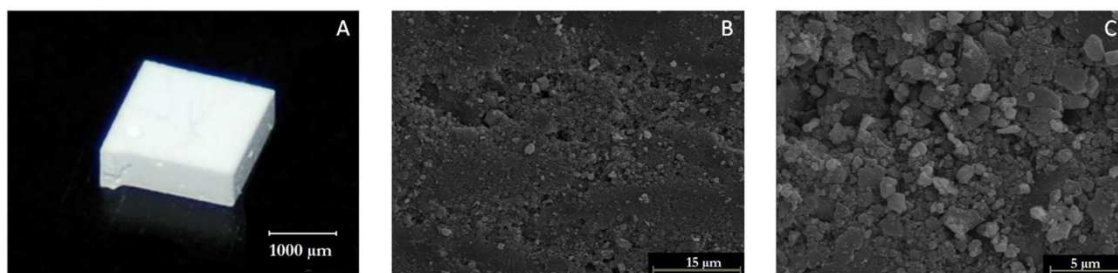


Figura 12. Caracterização da estrutura macroscópica do *scaffold* de alumina.

Tabela 3. Propriedades mecânicas do *scaffold* de alumina.

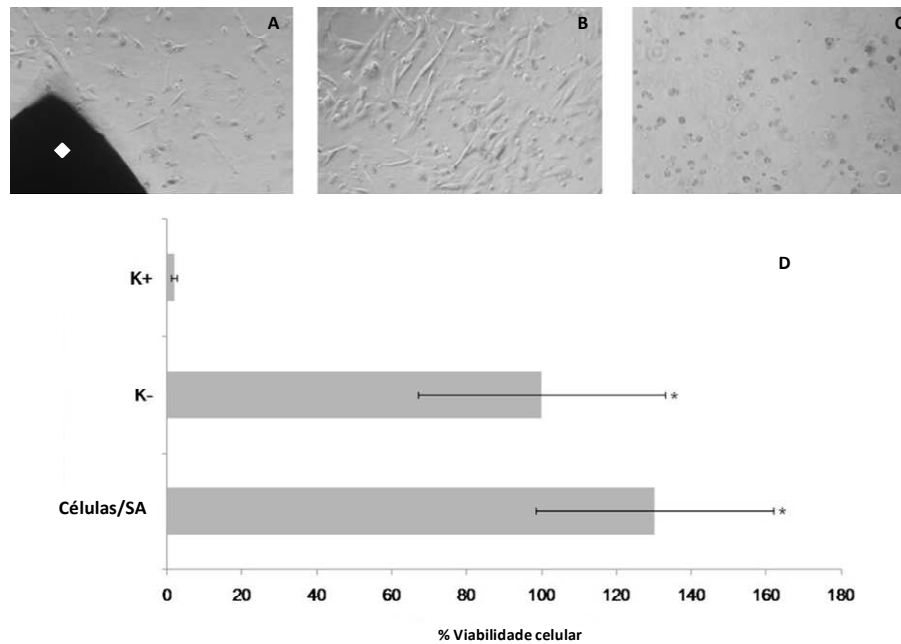
Tipo de Teste	Resultado
Dureza [MPa]	528,3±48,5
Módulo de Rutura [MPa]	>55
Densidade [g/cm <sup>3</sup> ]	3,2±0,006
Porosidade [%]	6,9±1,7
Absorção de água [%]	2,2±0,4

### 1.3.2 Caracterização do perfil citotóxico do *scaffold* de alumina

#### 1.3.2.1 Ensaio *in vitro*

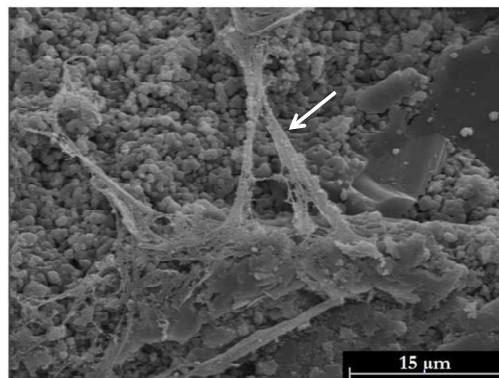
Para avaliar a citotoxicidade deste *scaffold*, as células CRL-11372 foram colocadas em contacto com o material. Após 24 h as CRL-11372 células aderiram e cresceram na proximidade do *scaffold* (Figura 13A) e no controlo negativo (Figura 13B). No controlo positivo, não se observou a adesão celular e/ou proliferação, foram observadas células com forma esférica que é a forma típica das células mortas (Figura 13C).

Para melhor se avaliar o perfil citotóxico do *scaffold*, foi também realizado, um ensaio de MTT (Figura 13D). Os resultados obtidos revelaram uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre as células expostas ao biomaterial e o controlo positivo, e entre o controlo positivo e controlo negativo, após 24 h de incubação. No entanto, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o controlo negativo e as células em contacto com o *scaffold* alumina.



**Figura 13.** Imagens de microscopia ótica de células CRL-11372 em contacto com o *scaffold* de alumina (♦) (A, B e C). Avaliação da viabilidade celular medida pelo ensaio de MTT: (K<sup>+</sup>) controlo positivo, (K<sup>-</sup>) controlo negativo e (Células/SA) células na presença do *scaffold* de alumina.

Além disso, também foram adquiridas imagens por MEV, para caracterizar a adesão de células ao biomaterial. Estes dados mostraram que as células CRL-11372 aderiram e proliferaram na presença do biomaterial, devido às suas propriedades de superfície. A rugosidade de superfície permite a fixação celular, que pode ser observada pelos prolongamentos citoplasmáticos que se espalham sobre a superfície do biomaterial, que reflete a adesão ao fim de 3 dias em cultura (Figura 14). O elevado número de células presente comprova o crescimento celular (Figura 14).



**Figura 14.** Imagem obtida por MEV de um osteoblasto humano (CRL-11372) na superfície do *scaffold*, após 3 dias em cultura.

### 1.3.2.2 Ensaio *in vivo*

A análise histológica das amostras de órgãos (cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, baço) foi realizada com o objetivo de verificar a presença de alterações morfológicas entre o grupo teste e o grupo controlo. Esta análise não revelou variações significativas entre os dois grupos, o que indica que o *scaffold* não desencadeou qualquer resposta sistémica. No entanto, quando as amostras de tecido ósseo recolhidas da calote foram analisadas, verificaram-se algumas diferenças significativas entre os dois grupos (Figura 15).

As amostras foram avaliadas quanto à qualidade do interface osso-*scaffold*, resposta do tecido e a formação de osso no interior do defeito (Figura 15).

Após 7 dias, a amostra obtida a partir do grupo controlo apresentou um tecido fibroso com novos vasos e uma pequena faixa de tecido de granulação, mas sem observação do processo inflamatório (Figura 15). No grupo teste foi observada uma grande quantidade de tecido de granulação entre os dois topos ósseos (Figura 15). Quando as amostras foram recolhidas após um período de 30 dias, a coloração H & E revelou um novo tecido ósseo na superfície, sem reação periosteal na amostra do grupo controlo. A amostra do grupo teste apresentou algum espaço entre dois fragmentos ósseos, ligados por tecido conjuntivo e uma nova formação óssea, o que significa uma posterior cura, embora lenta, do tecido ósseo, ou seja, o biomaterial vai promover a regeneração óssea.

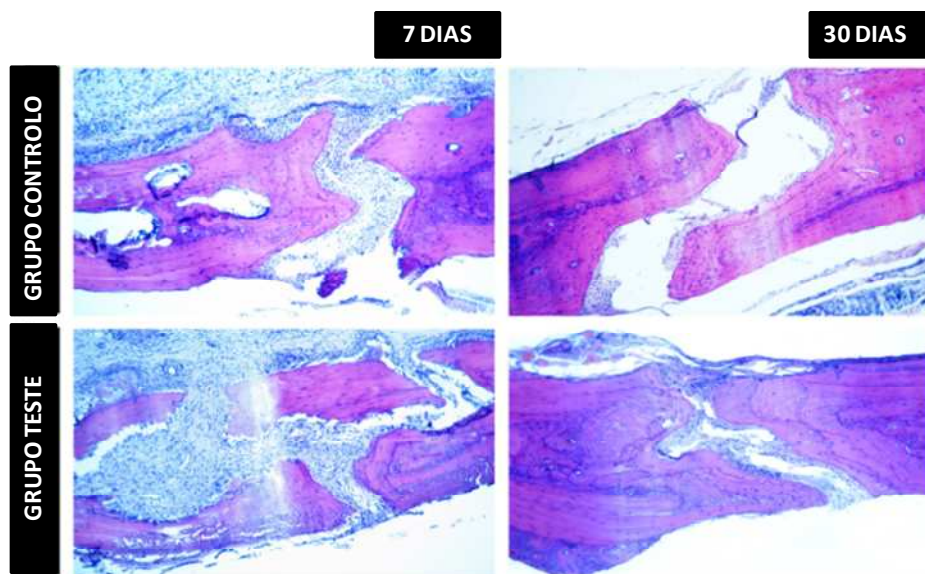


Figura 15. Imagens histológicas do tecido ósseo da calote de rato após 7 e 30 dias.

## 1.4 Discussão

A engenharia de tecidos é uma área de investigação relativamente nova e desafiadora, que procura novos procedimentos e técnicas para reparar tecidos e/ou órgãos danificados. No caso particular da regeneração óssea, é necessário o desenvolvimento de *scaffolds* biocompatíveis, osteocondutivos e bioativos que induzam a adesão celular, bem como o crescimento celular. Uma matriz porosa ideal (também conhecida como *scaffold*) para ser utilizada na engenharia de tecido ósseo, não deve desencadear uma resposta adversa por parte do hospedeiro (Dvir *et al.*, 2010).

Neste estudo foi utilizada uma nova técnica, envolvendo um processo de sinterização, com o intuito de se produzir um *scaffold* de alumina para ser utilizado como um substituto ósseo. Este *scaffold* foi produzido e caracterizado por meio de diferentes técnicas experimentais, para se avaliarem as suas propriedades mecânica e biológicas.

A caracterização das propriedades mecânicas do *scaffold* é fundamental para a otimização da produção de uma matriz porosa. A porosidade intrínseca do biomaterial utilizado é um fator chave para permitir que os osteoblastos aderiram e cresçam (Popat *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2005; Rambo *et al.*, 2006; Thei-Han *et al.*, 2009). O *scaffold* produzido apresentava uma porosidade de  $6,9 \pm 1,7\%$ . Este parâmetro está diretamente relacionado com a rigidez e resistência

à deformação do tecido que deverá substituir. A indução de pequenas mudanças na porosidade, resultam em grandes mudanças nas propriedades do material. No caso de enxertos ósseos de osso cortical, inicialmente pode ter entre 5% a 10% de porosidade (Goldberg e Akhavan, 2005).

Na literatura existem diversos estudos que relatam a importância de materiais porosos para a engenharia de tecido ósseo, uma vez que são necessários para a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais e desempenham um papel importante na vascularização (Sadiq *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

A biocerâmica produzida neste estudo apresentou também um elevado valor de dureza ( $528,3 \pm 48,5$  MPa) e MoR (MPa ~55). Estas propriedades fazem deste biomaterial um bom candidato para ser utilizado como substituto ósseo, uma vez que a força e desgaste a que o material estará sujeito serão elevados. O valor obtido para a dureza é superior à do tecido ósseo natural (~100 MPa) e ao valor de outros materiais, tais como o dióxido de zircônio (6-10 MPa) (Hutmacher, 2000; Acchar e Segadaes, 2010). No entanto, este *scaffold* apresenta uma dureza inferior relativamente aos *scaffolds* de alumina produzidos por Hamadouche e Sedel, que apresentaram uma dureza de 595 MPa (Hamadouche e Sedel, 2000). Tal decréscimo era esperado, devido ao grau de porosidade do nosso *scaffold*, o que reduz a resistência global. Os valores de MoR obtidos para este biomaterial (~55 MPa) foram superiores aos obtidos para outros materiais sinterizados, tais como HA (MoR = 50 MPa), mostrando assim que este biomaterial é muito resistente a forças de tração (Pattanayak *et al.*, 2005).

O *scaffold* aqui produzido apresentou uma densidade de  $3,2 \pm 0,06$  g/cm<sup>3</sup>. Este valor é mais baixo quando comparado com o obtido para o material pré-sinterizado (3,98 g/cm<sup>3</sup>). No entanto, é mais elevado do que a densidade média do tecido ósseo (1,9 g/cm<sup>3</sup>) (Leslie e Ward, 2004). Durante a produção deste *scaffold* foram tidas em conta as alterações das suas propriedades, tais como, a porosidade do biomaterial aumenta, a densidade, resistência e dureza diminui.

A absorção de água por este material é muito importante, uma vez que esta propriedade está diretamente relacionada com a adesão celular e também com a troca iónica no interior do *scaffold* (Bowen *et al.*, 2005). Neste *scaffold*, a alumina encontra-se no grau de oxidação mais elevado e os fluidos corporais humanos não podem reduzir os iões alumínio (Al<sup>3+</sup>) à superfície (Osawa *et al.*, 2005). Assim, a alumina permanece no corpo a pH fisiológico. Se houvesse a libertação de iões Al<sup>3+</sup> da superfície do *scaffold* a viabilidade celular seria afetada (Matsumoto, 2000). O Al<sup>3+</sup> compete diretamente com Ca<sup>2+</sup> no processo de formação óssea e a sua presença induz a redução do teor de cálcio no osso e na qualidade do osso (Matsumoto, 2000).

A avaliação do perfil citotóxico do biomaterial é uma questão importante que deve ser avaliada, uma vez que determina se um material pode ser utilizado na engenharia de tecidos (Ribeiro *et al.*, 2009b). A avaliação da citotoxicidade *in vitro* é efetuada através de protocolos padrão que fornecem informações sobre as interações entre as células e a superfície do material. Este procedimento é muitas vezes utilizado como ensaios de rastreio iniciais para avaliar a biocompatibilidade de um material (La Flamme *et al.*, 2007). O perfil citotóxico do *scaffold* foi avaliado por um ensaio MTT, cujos resultados sugeriram que *scaffold* poroso não afetou a viabilidade das células, não tendo sido observado um efeito citotóxico agudo. As imagens de MEV mostraram que os osteoblastos humanos aderiram e cresceram na superfície do *scaffold*. No entanto, a densidade do biomaterial não facilitou o crescimento de células no seu interior. No

entanto, os resultados mostram que o *scaffold* promove a adesão e proliferação celular (Figura 14).

A utilização de modelos animais para caracterizar a toxicidade de novos biomateriais ou dispositivos médicos é uma parte necessária no processo de validação e segurança do produto. Além disso, também são um passo intermédio para a realização dos ensaios clínicos.

Neste estudo nos ensaios *in vivo* foram utilizados ratos Wistar para se avaliar a reação do animal à presença do biomaterial, quer a nível local como a nível sistémica, após a implantação dos *scaffolds*. Na literatura está descrito que após a colocação de um implante, há uma cascata de processos moleculares e celulares, despolotado quase instantaneamente, e ocorre uma resposta inflamatória aguda, com duração de dois a cinco dias (Stanford, 2010). Ao mesmo tempo, as proteínas do plasma são adsorvidas à superfície do material, seguindo-se um contacto inicial de glóbulos vermelhos e plaquetas. À medida que a cicatrização de tecidos ocorre, a coagulação do sangue não serve apenas como um reservatório de fatores de crescimento, mas também como um *scaffold* provisório em que as células mesenquimais osteogénicas podem migrar. Com base nos dados publicados na literatura, a formação de tecido de granulação começa aproximadamente no quarto dia após a colocação do implante e pode durar até à terceira semana, após ter ocorrido a lesão. Durante este período, as células osteogénicas são estimuladas e inicia-se a deposição óssea (Davies, 2010). Neste contexto, as análises histológicas são muito importantes para monitorizar a regeneração óssea.

A análise histológica das amostras de órgãos não revelou variações significativas entre o grupo controlo e o grupo teste. Os resultados indicaram a não ocorrência de resposta sistémica por parte do organismo à presença do biomaterial. No entanto, a análise do tecido ósseo recolhido da calote revelou algumas diferenças entre os dois grupos.

Deste modo e de acordo com o que está descrito na literatura, este é um dos primeiros estudos que descreve a implantação de *scaffolds* de alumina num defeito ósseo e em que foi feita a monitorização ao longo do tempo da resposta do organismo à presença biomaterial no organismo. Recentemente, Kim e seus colaboradores descreveram a avaliação, *in vitro* e *in vivo* de *scaffolds* de alumina 3D revestidos e não revestido com TCPH poroso (Kim *et al.*, 2011).

## 1.5 Conclusão

O objetivo deste estudo foi o de produzir um *scaffold* de alumina que pode ser utilizado num futuro próximo como um substituto ósseo. Os resultados dos ensaios *in vitro* revelaram que o *scaffold* tem propriedades mecânicas compatíveis com a sua aplicação na terapia óssea, tais como elevada dureza e MoR, e uma aparente porosidade relativa. Além disso, quando as células CRL-11372 foram semeadas, na presença do biomaterial, foi observada adesão e proliferação celular, o que significa que este *scaffold* não tem um efeito citotóxico agudo. A análise histológica das amostras permitiu concluir que o *scaffold* não desencadeou uma resposta sistémica por parte do sistema imunitário dos ratos Wistar.

Em estudos futuros será interessante produzir os *scaffolds* de alumina por outros métodos. Os *scaffolds* de alumina serão revestidos com materiais naturais e sintéticos biocompatíveis, a fim de melhorar a sua aplicação como um substituto ósseo. Para este fim serão usados polímeros ou

moléculas biativas (células e/ou FCs) de modo a tornar o *scaffold* osteoindutor e osteocondutor, e desta forma favorecer a osteointegração.

## 1.6 Referências Bibliográficas

Acchar W, Segadaes AM. Mechanical properties of a lithium glass-ceramic matrix (LZSA) reinforced with TiC or (W,Ti)C particles: A preliminary study. *Composite Structures* 2010, 92: 707-711.

Bose S, Darsell J, Hosick HL, Yang L, Sarkar DK, Bandyopadhyay A. Processing and characterization of porous alumina scaffolds. *Journal of Materials Science, Materials in Medicine* 2002, 13: 23-28.

Bowen P, Carry C, Luxembourg D, Hofmann H. Colloidal processing and sintering of nanosized transition aluminas. *Powder Technology* 2005, 157: 100-107.

Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nature Reviews Rheumatology* 2009, 5(12): 685-697.

Capasso JM, Cossio BR, Berl T, Rivard CJ, Jimenez C. A colorimetric assay for determination of cell viability in algal cultures. *Biomolecules Engineering* 2003, 20: 133-138.

Cenni E, Perut F, Baldini N. In vitro models for the evaluation of angiogenic potential in bone engineering. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010, 32: 21-30.

Chanda A, SinghaRoy R, Xue WC, Bose S, Bandyopadhyay A. Bone cell-materials interaction on alumina ceramics with different grain sizes. *Materials Science and Engineering C Mater Biol Appl* 2009, 29: 1201-1206.

Coimbra P, Ferreira P, de Sousa H, Batista P, Rodrigues M, Correia I, Gil MH. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011, 48(1): 112-118.

Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic Reconstructive Surgery* 2010; 125(6): 1685-1692.

Davies JE. Immediate loading: The role of the implant surface on biological stabilization. *Journal of Implant and Reconstructive Dendistry* 2010, 2-7.

Dvir T, Timko B, Kohane D, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology* 2010, 6: 13-22.

Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JFH, Kunjithapatham R, Buijs M, Syed LH, Rao PP, et al. The Pyruvic Acid Analog 3-Bromopyruvate Interferes With the Tetrazolium Reagent MTS in the Evaluation of Cytotoxicity. *Assay and Drug Development Technologies* 2010, 8: 258-262.

Goldberg V, Akhavan S. Biology of bone grafts. *Bone Regeneration and Repair* 2005, 57-65.

Guarino V, Causa F, Taddei P, di Foggia M, Ciapetti G, Martini D, Fagnano C, Baldini N, Ambrosio L. Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008, 29(27): 3662-3670.

Hamadouche M, Sedel L. Ceramics in orthopaedics. *The Journal of Bone & Joint Surgery Br* 2000, 82: 1095-1099.

Harris SA, Enger RJ, Riggs LB, Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995, 10: 178-186.

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

Kim YH, Anirban JM, Song HY, Seo HS, Lee BT. In Vitro and In Vivo Evaluations of 3D Porous TCP-coated and Noncoated Alumina Scaffolds. *Journal of Biomaterials Applications* 2011, 25(6): 539-558.

La Flamme KE, Popat KC, Leoni L, Markiewicz E, La Tempa TJ, Roman BB, Grimes CA, Desai TA. Biocompatibility of nanoporous alumina membranes for immunoisolation. *Biomaterials* 2007, 28(17): 2638-2645.

Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59: 339-359.

Lee Y, Ha Y, Yoo J, Koo K, Yoon K, Kim H. Alumina-on-Alumina Total Hip Arthroplasty: A Concise Follow-up, at a Minimum of Ten Years, of a Previous Report. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2010, 92: 1715-1719.

Leslie WD, Ward LM. Bone density monitoring with the total hip site: time for a reevaluation? *Journal of Clinical Densitometry* 2004, 7: 269-274.

Li JP, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, de Groot K. Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: Preparation and in vitro experiment. *Biomaterials* 2006, 27(6): 1223-1235.

Li JP, Habibovic P, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, Groot K. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials* 2007, 28(18): 2810-2820.

Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005, 26(18): 3919-3928.

Maia J, Ribeiro M, Ventura C, Carvalho R, Correia I, Gil M. Ocular injectable formulation assessment for oxidized dextran-based hydrogels. *Acta Biomaterialia* 2009, 5: 1948-1955.

Matsumoto H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology* 2000, 200: 1-46.

Mendonça G, Mendonca DBS, Simoes LGP, Araujo AL, Leite ER, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJ. Nanostructured Alumina-Coated Implant Surface: Effect on Osteoblast-Related Gene Expression and Bone-to-Implant Contact In Vivo. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 2009, 24: 205-215.

Miki Y, Suzuki T, Nagasaki S, Hata S, Akahira J, Sasano H. Comparative effects of raloxifene, tamoxifen and estradiol on human osteoblasts in vitro: Estrogen receptor dependent or independent pathways of raloxifene. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2009, 113: 281-289.

Mitchell JJ, Paiva M, Heaton MB. Optimal 96-well plate set-up to avoid ethanol volatility when assessing ethanol cytotoxicity. *Alcohol* 1998, 15: 137-139.

Osawa CC, Bertran CA. Mullite formation from mixtures of alumina and silica sols: Mechanism and pH effect. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2005, 16: 251-258.

- Palmeira-de-Oliveira A, Ribeiro M, Palmeira-de-Oliveira R, Gaspar C, Costa-de-Oliveira S, Correia I, Vaz CP, Maryinez-de-Oliveira J, Queiroz JA, Rodrigues AG. Anti-Candida Activity of a Chitosan Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2010, 70: 322-327.
- Pattanayak DK, Divya P, Upadhyay S, Prasad RC, Rao BT, Rama-Mohan BT. Synthesis and Evaluation of Hydroxyapatite Ceramics. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs* 2005, 18: 87-92.
- Perez-Sanchez MJ, Ramirez-Glendon E, Lledo-Gil M, Calvo-Guirado JL, Perez-Sanchez C. Biomaterials for bone regeneration. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2010, 15: E517-E22.
- Peter M, Binulal N, Nair S, Selvamurugan N, Tamura H, Jayakumar R. Novel biodegradable chitosan-gelatin/nanobioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal* 2010, 158: 353-361.
- Pinto D, Silva A, Segadaes A, Devezas T, editors. *Influence of Surface Area on the Flowability Behaviour of Self-Flow Refractory Castables 2010: Trans Tech.*
- Popat KC, Swan EEL, Mukhatyar V, Chatvanichkul KI, Mor GK, Grimes CA, Desai TA. Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response. *Biomaterials* 2005, 26(22): 4516-4522.
- Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 2010, 35: 403-440.
- Rambo C, Mueller F, Mueller L, Sieber H, Hofmann I, Greil P. Biomimetic apatite coating on biomorphous alumina scaffolds. *Materials Science Engineering C Mater Biol Appl* 2006, 26: 92-9.
- Reyes CD, Petrie TA, Burns KL, Schwartz Z, Garcia AJ. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials* 2007, 28(21): 3228-3235.
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006, 27(18): 3413-3431.
- Ribeiro FV, Nociti FH, Sallum EA, Casati MZ. Effect of Aluminum Oxide-Blasted Implant Surface on the Bone Healing Around Implants in Rats Submitted to Continuous Administration of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 2009 (a), 24: 226-233.
- Ribeiro M, Espiga A, Silva D, Batista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P, Correia IJ. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regeneration* 2009 (b), 17: 817-824.
- Ruckh TT, Kumar K, Kipper MJ, Popat KC. Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on poly(epsilon-caprolactone) nanofiber scaffolds. *Acta Biomaterialia* 2010, 6: 2949-2959.
- Sadiq IM, Chowdhury B, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles. *Nanomedicine* 2009, 5: 282-286.
- Santora L, Skolbekken J. From Brittle Bones to Standard Deviations: The Historical Development of Osteoporosis in the Late Twentieth Century. *Science, Technology & Human Values* 2010, 36(4): 497-521.

Shalumon KT, Anulekha KH, Girish CM, Prasanth R, Nair SV, Jayakumar R. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. *Carbohydrate Polymers* 2010, 80: 413-419.

Stanford C. Surface Modification of Biomedical and Dental Implants and the Processes of Inflammation, Wound Healing and Bone Formation. *International Journal of Molecular Sciences* 2010; 11: 354-369.

Stevens M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today (Kidlington)* 2008, 11: 18-25.

Swan EEL, Popat KC, Grimes CA, Desai TA. Fabrication and evaluation of nanoporous alumina membranes for osteoblast culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2005, 72A: 288-295.

Thein-Han W, Misra R. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2009, 5(4):1182-1197.

Tohma Y, Tanaka Y, Ohgushi H, Kawate K, Taniguchi A, Hayashi K, Isomoto S, Takakura Y. Early bone in-growth ability of alumina ceramic implants loaded with tissue-engineered bone. *Journal of Orthopaedic Research* 2006, 24: 595-603.

Vallet-Regi M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *C R Chim* 2010, 13: 174-185.

Webster TJ, Hellenmeyer EL, Price RL. Increased osteoblast functions on theta + delta nanofiber alumina. *Biomaterials* 2005, 26(9): 953-960.

Yang L, Sun H, Qi N. Novel mini -TCP 3D perfusion bioreactor for proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnology Bioengineering* 2010, 15: 329-340.

Ye JH, Xu YJ, Gao J, Yan SG, Zhao J, Tu Q, Zhang J, Duan X-J, Sommer CA, Mostoslavsky G, Kaplan DL, Wu Y-N, Zhang C-P, Wang L, Chen Z. Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs. *Biomaterials* 2011, 32(22): 5065-5076.

Yoon BH, Choi WY, Kim HE, Kim JH, Koh YH. Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering. *Scripta Materialia* 2008, 58: 537-540.

## Capítulo 4



# Caracterização Biológica do Complexo Polielectrolítico Pectina/Quitosano para uma possível aplicação na Engenharia de Tecido Ósseo (Artigo II)

Ao longo deste capítulo é descrita a caracterização biológica do complexo polielectrolítico de pectina/quitosano para aplicação na regeneração óssea.

## 1.1 Introdução

Nos últimos anos na área da Engenharia de Tecidos tem havido um crescente interesse na utilização de materiais biocompatíveis e/ou biodegradáveis que têm sido utilizados como matrizes de suporte ou como substratos para a entrega de moléculas bioativas e células, em tecidos com a finalidade de promover a sua reconstrução (Liu *et al.*, 2007).

Na ETO, os biomateriais atuam como um esqueleto temporário, inserido nos locais de defeito do esqueleto ou nos locais de perda óssea, de modo a apoiar e estimular a regeneração do tecido ósseo, enquanto que, gradualmente se degradam e são substituídos por novo tecido ósseo (Liu *et al.*, 1999; Radice *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2005; Aronin *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2009; Dumas *et al.*, 2009). Ao longo das duas últimas décadas, materiais inorgânicos e orgânicos, naturais e sintéticos têm sido estudados para esta finalidade (Stevens, 2008; Puppi *et al.*, 2010). Os materiais inorgânicos bioativos, com uma composição semelhante à fase mineral do osso, tais como o fosfato tricálcico, hidroxiapatite e vidros bioativos, têm sido amplamente utilizados para a reparação e substituição de tecidos ósseos danificados. Os polímeros sintéticos biodegradáveis e biocompatíveis, tais como, o APG, o APL e os seus copolímeros (APLG) têm também sido estudados para esta aplicação biomédica. Os polímeros naturais, em particular proteínas e polissacarídeos, são amplamente utilizados na regeneração do tecido ósseo. A sua degradabilidade, biocompatibilidade, similaridade com a matriz extracelular e as interações celulares intrínsecas, tornam estes materiais mais atrativos para aplicação na engenharia de tecidos (Malafaya *et al.*, 2007; Mano *et al.*, 2007). Os polissacarídeos, tais como, alginato, quitosano, ácido hialurónico e proteínas (ex. colagénio), são exemplos de polímeros naturais utilizados por diversos investigadores para este propósito (Liu *et al.*, 1999; Radice *et al.*, 2000). Atualmente, está a ser efetuada muita investigação na produção de *scaffolds* de polímeros-compósitos inorgânicos, para aplicação na ETO, com o intuito de se imitar a estrutura nativa deste tecido. Os investigadores têm tido uma preocupação constante em melhorar a adesão celular aos *scaffolds*, bem como, aumentar a sua resistência mecânica e estabilidade. Assim, a combinação da fase de resistência do polímero com a resistência à compressão de um composto inorgânico parece favorável para o desenvolvimento de um biomaterial mais eficiente ao nível da regeneração óssea (Rezwan *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2009; Swetha *et al.*, 2010).

Nesta parte do meu trabalho de doutoramento foram produzidos *scaffolds* porosos, biodegradáveis com pectina e quitosano, para aplicação na ETO.

As pectinas são polissacarídeos, constituídos por unidades de ácido D-galacturónico, presentes nas paredes celulares das plantas (Mohnen, 2008). As pectinas comerciais são obtidas principalmente a partir de bagaço de maçã e a partir da casca de citrinos, por meio de um processo de extração ácida (Rolin, 2002). Os extratos de pectina são amplamente utilizados na indústria de processamento de alimentos, devido às suas propriedades de espessamento e gelificação. Os extratos de pectina comerciais consistem predominantemente em cadeias lineares de resíduos de (1,4)- $\alpha$ -D-ácido galacturónico parcialmente metil esterificados. Dependendo do grau de substituição dos grupos carboxilo D-galacturónico por grupos metóxil (-OCH<sub>3</sub>), definido como o grau de esterificação (DE), as pectinas são classificadas como pectinas de alta esterificação (DE > 50%) ou pectinas de baixa esterificação (DE < 50%).

O uso da pectina na preparação de sistemas de entrega de fármacos específicos para o cólon tem sido objeto de inúmeras investigações (Ashford *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2003; Ahrabi *et al.*, 2000; Chambin *et al.*, 2006; Maestrelli *et al.*, 2008; Bigucci *et al.*, 2009), devido à sua suscetibilidade à degradação pelas enzimas produzidas por um grande número de micro-organismos presentes no cólon. A pectina foi também investigada para o tratamento de superfícies de dispositivos médicos (Morra *et al.*, 2004) e para a produção de implantes ósseos revestidos com nanopartículas (Kokkonen *et al.*, 2008). Recentemente, alguns investigadores descreveram que a pectina possui atividade anti-inflamatória e anticarcinogénica (Chen *et al.*, 2006; Salman *et al.*, 2008).

Por outro lado, o quitosano, um polímero catiónico obtido a partir da quitina (através da desacetilação da quitina em meio alcalino) e compreendendo unidades de monómeros  $\beta$ -(1-4)-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina (Montembault *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2009), é um dos biomateriais mais estudados para aplicações farmacêuticas e biomédicas. O quitosano apresenta propriedades biológicas diferentes, tais como, atividade anticolesterolémica e antimicrobiana, biocompatibilidade, propriedades antimicóticas, biodegradabilidade, potencial hemostático, não carcinogénico, afinidade notável para as proteínas, assim como promoção da proliferação, adesão e diferenciação celular (Kim *et al.*, 2008; Muzzarelli, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009).

Devido a estas e a outras propriedades, o quitosano e os seus derivados, isoladamente ou em combinação com outros biomateriais, têm sido utilizados para a produção de um grande número de diferentes matrizes para aplicações na engenharia de tecidos (Kim *et al.*, 2008; Muzzarelli, 2009), incluindo aplicações na ETO (Di Martino *et al.*, 2005).

Neste trabalho, os *scaffolds* de pectina/quitosano foram preparados através da liofilização dos complexos polieletrólitos insolúveis (CPEs), numa solução aquosa. Os CPEs são estruturas supramoleculares formadas por interações iónicas estabelecidas entre dois polieletrólitos de cargas opostas.

Os CPEs baseados em quitosano ou formados entre quitosano e polieletrólitos naturais (DNA, proteínas, carboximetilcelulose) ou sintéticos (poli (ácido acílico), poli (ácido estirenosulfónico)), já foram investigados para várias aplicações na área de engenharia de tecidos, nomeadamente para a entrega de fármacos (Berger *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Naidu *et al.*, 2009).

## 1.2 Materiais e Métodos

### 1.2.1 Materiais

O quitosano obtido a partir da carapaça de caranguejos (peso molecular médio (300-1000 kDa), grau de acetilação, DA ~ 28%). A pectina com um baixo grau esterificação, extraída a partir de citrinos (Grau de esterificação, DE ~ 42%) foram adquiridos à Sigma. O ácido acético (96%) foi adquirido à Fluka. O acetato de sódio (Pureza > 99,0%) e a solução salina tamponada com fosfato foram comprados à Sigma.

### 1.2.2 Métodos

#### 1.2.2.1 Preparação de *scaffolds* de pectina-quitosano

Inicialmente foram preparadas duas soluções de polissacarídeos, dissolvendo 1g de cada polissacarídeo em 100ml de tampão acetato 0,01 M (pH 4.5). Os CPEs entre os dois polímeros foram formados misturando as duas soluções à temperatura ambiente. A solução com a maior viscosidade (solução de quitosano) foi colocada sob agitação (3000 rpm), utilizando um homogeneizador. De seguida, procedeu-se à adição da solução de pectina à solução de quitosano. A mistura foi deixada durante 10 min, a uma velocidade de agitação de 7000 rpm. Formaram-se precipitados de CPEs que foram isolados por centrifugação a 5000 rpm durante 5 min e posteriormente lavados com água destilada. Estas duas etapas foram repetidas duas vezes. Após a centrifugação final, os CPEs isolados foram congelados a aproximadamente -20°C e finalmente liofilizados durante 2 dias. Para a preparação dos *scaffolds* de CPEs, foram utilizadas duas proporções de polissacarídeos, 2:1 e 1:1 de pectina:quitosano, (w/w).

#### 1.2.2.2 Microscopia eletrónica de varrimento

A morfologia dos *scaffolds* de pectina-quitosano, antes e depois de submersos em PBS, foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento. As amostras foram colocadas sobre uma fita adesiva (de dupla face), que permite a adesão ao *scaffold* e ao suporte metálico. Seguidamente as amostras foram revestidas com ouro num revestidor de pulverização catódica. As observações foram realizadas a 20 kV num MEV - JSM5310 (JEOL, Japão).

O MEV foi também utilizado para analisar a superfície dos *scaffolds* de pectina-quitosano, com e sem osteoblastos humanos aderidos. Os *scaffolds* incubados com as células, foram lavados três vezes com tampão PBS durante 2 min e fixados durante 10 min com glutaraldeído 2,5% (em PBS) a 4°C. As amostras foram lavadas três vezes com água destilada durante 2 min e desidratadas em EtOH com concentrações de 70, 80, 90 e 100%, durante 10 min cada. Finalmente, as amostras foram colocadas sobre uma fita adesiva (de dupla face), que permite a adesão ao *scaffold* e ao suporte metálico e foram revestidas com ouro por pulverização catódica, utilizando um K550 Emitech (Londres, Inglaterra), revestidor por crepitação. As amostras foram analisadas utilizando um MEV - Hitachi S2700 (Tóquio, Japão), a uma voltagem de aceleração de 20 kV.

### 1.2.2.3 Cultura celular de osteoblastos humanos

Os osteoblastos humanos (CRL-11372) foram semeados em T-flasks de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) com 6 ml de meio DMEM-F12 (Gibco) (1:1, v/v) suplementado com SFB (10%, v/v), penicilina G (100 units/cm<sup>3</sup>), estreptomicina (100 mg/cm<sup>3</sup>) e anfotericina B (0,25 mg/cm<sup>3</sup>).

Após atingida a confluência (cerca de uma semana), as células cultivadas foram libertadas a partir do substrato utilizando PBS/EDTA e 0,18% tripsina. As células foram então semeadas em T-flasks de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

### 1.2.2.4 Proliferação de osteoblastos humanos na presença do *scaffold* de pectina-quitosano

Para analisar a adesão e proliferação celular, foram semeados osteoblastos humanos em placas de 96 poços durante 24 h, na presença de *scaffolds* de pectina-quitosano. O crescimento celular foi monitorizado utilizando um microscópio ótico invertido Olympus CX41 (Tóquio, Japão), equipado com uma câmara digital Olympus SP500.

### 1.2.2.5 Caracterização do perfil citotóxico do *scaffold* de pectina-quitosano

Os osteoblastos humanos (CRL-11372) foram semeados na presença ou ausência dos *scaffolds* de pectina-quitosano, em placas de 96 poços, com 100 ml de meio de cultura DMEM e incubadas a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Após a incubação, a atividade redox da succinato desidrogenase mitocondrial foi avaliada por meio da redução do MTT.

A cada amostra, foram adicionados 50 µl de MTT (5 mg/cm<sup>2</sup> PBS), seguidos de incubação durante 4 h a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois, o meio foi retirado e foi adicionado às células 50 µl de isopropanol/HCl (0,04 M), para dissolver os cristais de formazano formados e posteriormente a placa foi incubada durante 90 min, a uma temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A absorvância da placa foi lida a 570 nm através de um leitor de microplacas Biorad Benchmark (Tóquio, Japão).

Os poços que contêm as células no meio de cultura sem *scaffolds*, foram usados como controlos negativos (K<sup>-</sup>). Os poços que continham células, aos quais foi adicionado EtOH (96%), foram usados como controlo positivo (K<sup>+</sup>). As amostras foram analisadas utilizando um microscópio ótico Olympus CX41, equipado com uma câmara digital Olympus SP-500 UZ.

Os resultados obtidos foram expressos com a média ± erro padrão da média ( $n = 5$ ). A análise estatística dos resultados foi efetuada usando a one-way ANOVA e as diferenças entre os grupos foram testadas pelo one-way ANOVA com o teste Dunnet's post hoc.

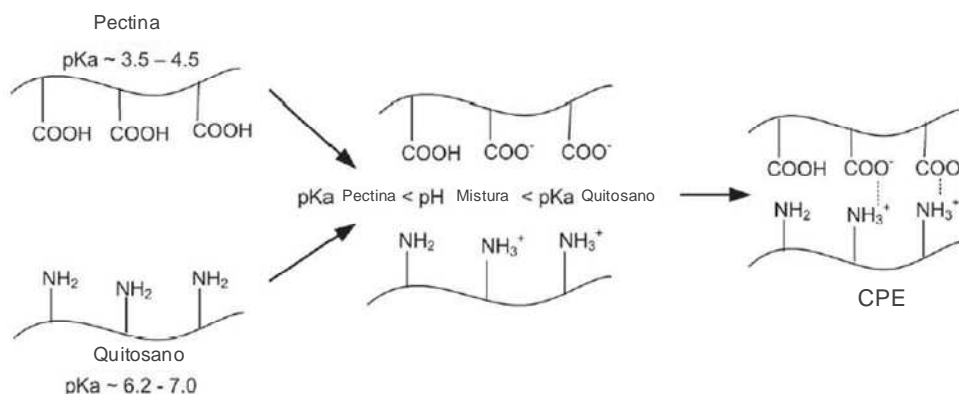
## 1.3 Resultados e Discussão

### 1.3.1 Preparação dos *scaffolds* CPE pectina-quitosano

Os CPEs são formados através da interação entre polielectrólitos com cargas opostas, numa solução aquosa. Neste sistema particular, as atrações eletrostáticas entre os grupos amina do quitosano (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) e os grupos carboxílicos ionizados (COO<sup>-</sup>) da pectina, são responsáveis pelas interações que conduzem à formação do CPEs pectina/quitosano.

Para produzir um CPE, ambos os polímeros têm de ser ionizados e apresentar cargas opostas. Isto significa que a formação de CPEs entre uma polibase fraca (quitosano) e um políácido

fraco (pectina) ocorre numa gama de pHs situada entre o pKa da pectina e o pKa do quitosano, em que a maioria dos grupos amina do quitosano e dos grupos carboxílicos da pectina se encontram ionizados. Assim, devido às interações electrostáticas, os dois polissacarídeos complexam entre si, formando os CPEs. Para os sistemas de quitosano e pectina correspondem valores de pH entre 3,5-4,5 (intervalo pKa da pectina (Rolin, 2002)) e 6,2-7,0 (intervalo pKa do quitosano (Vaarum *et al.*, 2005)). A representação esquemática da formação do CPE, formação entre a pectina e o quitosano é apresentada na figura 16. Além do pH, que é o fator mais importante que afeta a formação dos CPEs e as suas propriedades, outros fatores, como a proporção de carga dos dois polímeros, a temperatura e força iónica também são importantes.



**Figura 16.** Representação esquemática da reação de complexação da pectina com o quitosano (adaptado de Fonseca, 2011).

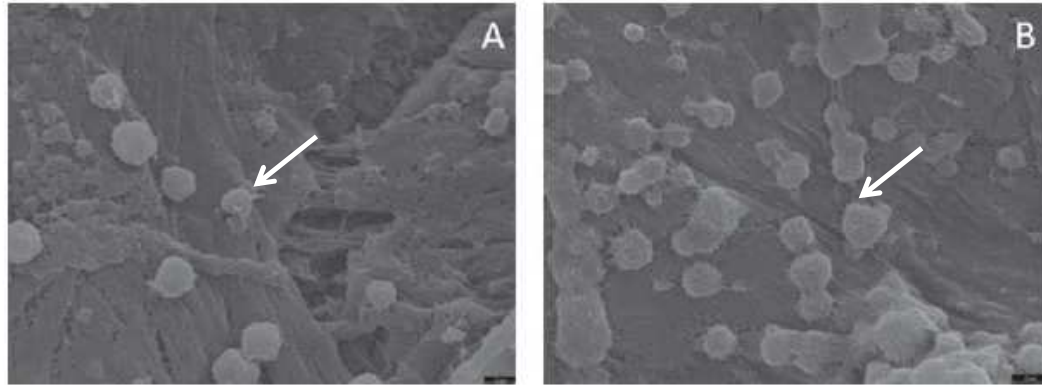
Neste trabalho, as reações de complexação polieletrólíticas entre o quitosano e a pectina foram realizadas a pH 4,5, utilizando-se duas proporções diferentes de pectina:quitosano (2:1 e 1:1). Os dois *scaffolds* resultantes foram designados P-QT\_2:1 e P-QT\_1:1.

### 1.3.2 Microscopia eletrónica de varrimento

A morfologia dos *scaffolds* de CPEs foi analisada por MEV. Os *scaffolds* apresentam uma forma estrutural irregular e altamente porosa. Além disso, os poros estão altamente interligados.

A morfologia do *scaffold* P-QT\_1:1, após submersão em PBS durante 1, 2 e 3 semanas, sugere que os tamanhos dos poros do *scaffold* aumentam gradualmente com o aumento do tempo de submersão. Este efeito pode ser atribuído à dissolução gradual da estrutura tridimensional, devido à rutura das interações iónicas, que foram previamente estabelecidas entre as cadeias dos dois polímeros.

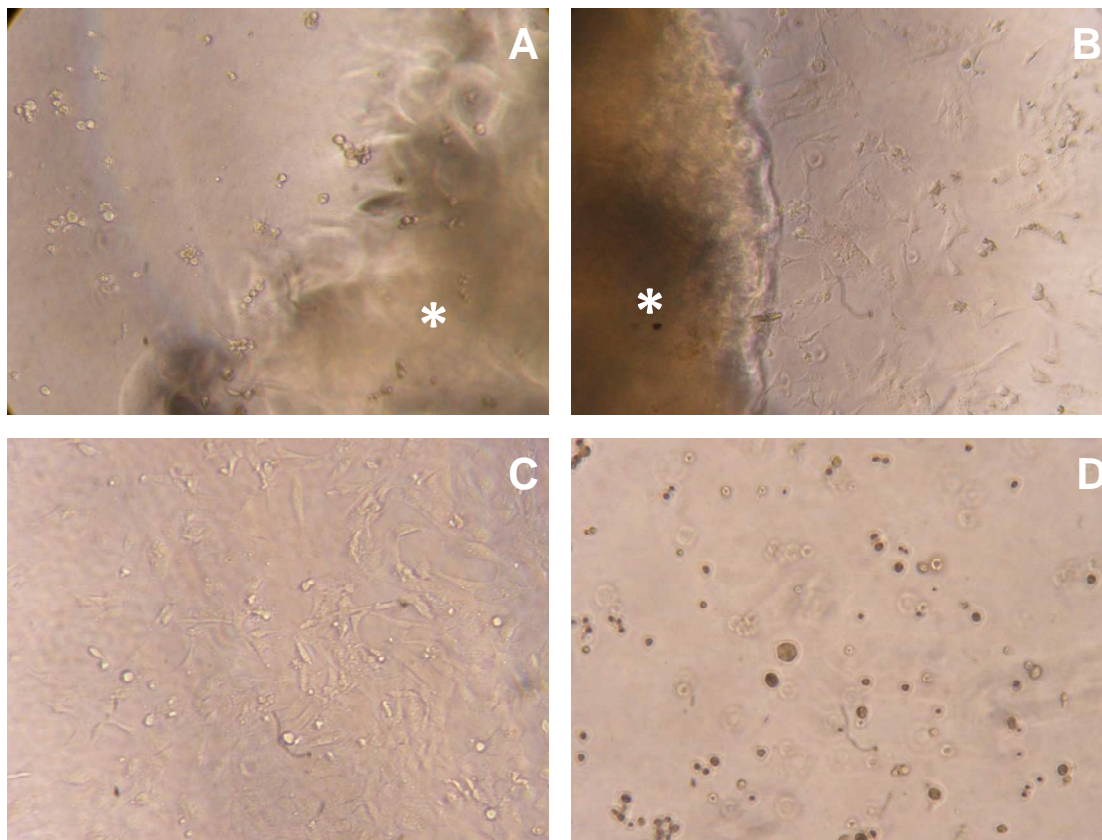
Na figura 17 podem observar-se imagens de MEV, com células aderidas à superfície dos *scaffolds*, após 3 dias de incubação. Os osteoblastos humanos foram observados como aglomerados. O *scaffold* P-QT\_1:1 (Figura 17A) apresenta um menor número de células aderidas em comparação com o *scaffold* P-QT\_2:1 (Figura 17B), apesar de ambos os *scaffolds* possuírem uma composição semelhante (em termos de proporções de pectina e quitosano).



**Figura 17.** Imagens de MEV de osteoblastos humanos aderidos à superfície dos *scaffolds* P-QT\_1:1 (A) e P-QT\_2:1 (B).

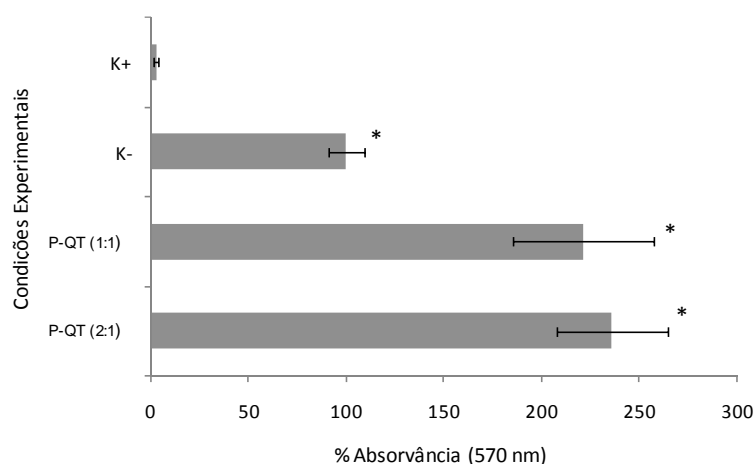
### 1.3.3 Citotoxicidade do *scaffold* de pectina-quitosano

Os osteoblastos humanos foram cultivados em placas de 96 poços, com ou sem *scaffolds* de CPE, para avaliar a citotoxicidade do *scaffold*. Após 24 h, a adesão e proliferação celular foi caracterizada através da utilização de um microscópio ótico invertido. As células aderiram e cresceram na vizinhança dos dois *scaffolds* (Figura 18A e 18B) e no controlo negativo (Figura 18C). No controlo positivo não foi observada adesão ou proliferação celular, uma vez que as células apresentavam uma forma esférica, que é característica das células mortas (Figura 18D).



**Figura 18.** Imagens de microscopia ótica de osteoblastos após terem sido semeados na superfície de *scaffolds* de pectina-quitosano (\*) após 24h: (A) células em contacto com o *scaffold* P-QT\_1:1, (B) células em contacto com o *scaffold* P-QT\_2:1, (C) controlo negativo (K<sup>-</sup>) e controlo positivo (K<sup>+</sup>).

Para uma caracterização mais precisa da biocompatibilidade da pectina-quitosano, foi realizado um ensaio de MTT. Neste teste, o sal tetrazólio MTT é reduzido a formazano, que pode ser analisado colorimetricamente (através da mudança de cor aquando da reação). A redução do MTT é geralmente atribuída à atividade mitocondrial. Portanto, o nível de redução de MTT em formazano é proporcional ao metabolismo celular. Os resultados obtidos com este ensaio mostraram que o *scaffold* não afetou a viabilidade celular (Figura 19). O ensaio de MTT mostrou uma diferença significativa entre as células expostas aos dois *scaffolds* (P-QT\_1:1 e P-QT\_2:1) e o controlo positivo ( $p < 0,05$ ) e entre as células expostas aos *scaffolds* e o controlo negativo ( $p < 0,05$ ), após 24 h de incubação. Os resultados obtidos para ambos os *scaffolds* não foram estatisticamente diferentes. Estes resultados mostram que os materiais testados não tem um efeito agudo citotóxico.



**Figura 19.** Avaliação da viabilidade celular medida pelo ensaio de MTT: Controlo positivo (K+), Controlo negativo (K-) e células em contacto com o *scaffold* P-QT\_1:1, células em contacto com o *scaffold* P-QT\_2:1. Cada resultado é expresso em média±desvio padrão da média. A análise estatística foi efetuada pelo teste de one-way ANOVA de Dunnet's para um significância de (\*  $p < 0.05$ ).

## 1.4 Conclusão

Neste trabalho, foi preparado e caracterizado um *scaffold* poroso para posterior aplicação na regeneração do tecido ósseo. Os *scaffolds* foram produzidos com polissacarídeos de pectina e quitosano, a partir da liofilização dos complexos polielectrólitos formados, entre os dois polissacarídeos, numa solução aquosa, a pH 4.5.

Apesar dos diferentes rácios iniciais de massa utilizados na preparação dos *scaffolds* P-QT\_1:1 e P-QT\_2:1, os resultados da análise elementar revelaram que a composição dos dois suportes foi idêntica, sendo composta por cerca de 30% (w/w) de quitosano e 70% (w/w) de pectina. Estudos de perda de peso mostraram que os *scaffolds* perderam cerca de metade da sua massa após um mês de imersão numa solução de PBS a pH 7.4. A avaliação morfológica de MEV mostrou que os *scaffolds* possuem uma estrutura altamente porosa e irregular. Deste modo, os estudos *in vitro* com osteoblastos humanos mostraram que estes aderem e proliferam na superfície dos *scaffolds*, comprovando a biocompatibilidade do biomaterial. Os resultados dos testes de MTT corroboraram esta observação.

Contudo, em estudos futuros pretende-se incorporar na preparação dos CPEs, um material inorgânico bioativo, por exemplo a HA, de forma a melhorar as propriedades dos *scaffolds*, quer ao nível das suas propriedades mecânicas, como no que diz respeito à promoção da osteointegração.

## 1.5 Referências Bibliográficas

Ahrabi SF, Madsen G, Dyrstad K, Sande SA, Graffner C. Development of pectin matrix tablets for colonic delivery of model drug ropivacaine. *European Journal of pharmaceutical Sciences* 2000, 10(1): 43-52.

Aronin CEP, Cooper JA, Sefcik LS, Tholpady SS, Ogle RC, Botchwey EA. Osteogenic differentiation of dura mater stem cells cultured in vitro on three-dimensional porous scaffolds of poly( $\epsilon$ -caprolactone) fabricated via co-extrusion and gas foaming. *Acta Biomaterialia* 2008, 4(5): 1187-1197.

Ashford M, Fell J, Attwood D, Sharma H, Woodhead P. Studies on pectin formulations for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release* 1994, 30(3): 225-232.

Becker ST, Bolte H, Krapf O, Seitz H, Douglas T, Sivananthan S, Wiltfang J, Sherry E, Warnke PH. Endocultivation: 3D printed customized porous scaffolds for heterotopic bone induction. *Oral Oncology* 2009, 45(11): E181-E188.

Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 57(1): 35-52.

Bigucci F, Luppi B, Monaco L, Cerchiara T, Zecchi V. Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009, 61(1): 41-46.

Chambin O, Dupuis G, Champion D, Voilley A, Pourcelot Y. Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 321(1-2): 86-93.

Chen CH, Sheu MT, Chen TF, Wang YC, Hou WC, Liu DZ, Chung TC, Liang YC. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochemical Pharmacology* 2006, 72(8): 1001-1009.

Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005, 26(30): 5983-5990.

Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal* 2009, 45(1): 141-148.

Dumas V, Perrier A, Malaval L, Laroche N, Guignandon A, Vico L, Rattner A. The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials* 2009, 30(19): 3279-3288.

Jiang L, Li Y, Zhang L, Wang X. Preparation and characterization of a novel composite containing carboxymethyl cellulose used for bone repair. *Materials Science and Engineering C* 2009, 29: 193-198.

- Kang HS, Park SH, Lee YG, Son T-I. Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly( $\gamma$ -glutamic acid) for biological application: Preparation, physical properties, and cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science* 2007, 103(1): 386-394.
- Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 2008, 26(1): 1-21.
- Kokkonen H, Cassinelli C, Verhoef R, Morra M, Schols HA, Tuukkanen J. Differentiation of Osteoblasts on Pectin-Coated Titanium. *Biomacromolecules* 2008, 9(9): 2369-2376.
- Liao IC, Wan ACA, Yim EKF, Leong KW. Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes. *Journal of Controlled Release* 2005, 104(2): 347-358.
- Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design* 2007, 85(7): 1051-1064.
- Liu L, Fishman ML, Kost J, Hicks KB. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials* 2003, 24(19): 3333-3343.
- Liu LS, Thompson AY, Heidarani MA, Poser JW, Spiro RC. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 1999, 20(12): 1097-1108.
- Maestrelli F, Cirri M, Corti G, Mennini N, Mura P. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008, 69(2): 508-518.
- Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering application. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59: 207-233.
- Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NM, Reis RL. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society, Interface* 2007, 4(17): 999-1030.
- Mao X, Chu CL, Mao Z, Wang JJ. The development and identification of constructing tissue engineered bone by seeding osteoblasts from differentiated rat marrow stromal stem cells onto three-dimensional porous nano-hydroxylapatite bone matrix in vitro. *Tissue Cell* 2005, 37(5): 349-357.
- Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 2008, 11(3): 266-277.
- Montembault A, Viton C, Domard A. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials* 2005, 26(8): 933-943.
- Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Nagel MD, Della Volpe C, Siboni S, Maniglio D, Brugnara M, Ceccone G, Schols HA, Ulvskov P. Effects on Interfacial Properties and Cell Adhesion of Surface Modification by Pectic Hairy Regions. *Biomacromolecules* 2004, 5(6): 2094-2104.
- Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 2009, 76: 167-182.
- Naidu VGM, Madhusudhana K, Sashidhar RB, Ramakrishna S, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV. Polyelectrolyte complexes of gum kondagogu and chitosan, as diclofenac carriers. *Carbohydrate Polymers* 2009, 76(3): 464-471.

Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 2010, 35(4): 403-440.

Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, 50(2): 101-109.

Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006, 27: 3413-3431.

Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P, Correia IJ. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair and Regeneration* 2009, 17: 817-824.

Rolin C, in: C. Seymour, P. Knox (Eds.), *Pectins and their Manipulation*, Blackwell, Boca Raton, 2002, pp. 222-241.

Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Orlin J, Bessler H. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2008, 62(9): 579-582.

Silva CL, Pereira JC, Ramalho A, Pais AACC, Sousa JJS. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *Journal of Membrane Science* 2008, 320(1-2): 268-279.

Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* 2008, 11(5): 18-25.

Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2010, 47(1): 1-4.

Vaarum KM, Smidsrod O. in: S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., NY, 2005, pp. 625-660.

## Capítulo 5



# Caracterização de *scaffolds* de Hidroxiapatite produzidos por impressão 3D

Neste capítulo serão apresentados os ensaios efetuados no Centro de Investigação de Ciências da Saúde (CICS) aos *scaffolds* de hidroxiapatite produzidos no Centro de Tecnologia Mecânica e Gestão Industrial (IDMEC) do Instituto Superior Técnico, com o intuito de serem aplicados na Engenharia de Tecido Ósseo.

## 1.1 Introdução

Os biomateriais constituídos por fosfatos de cálcio têm sido amplamente utilizados na prática clínica como substitutos ósseos (Leukers *et al.*, 2005). Um biomaterial de sucesso para aplicação *in vivo* deve apresentar várias propriedades mecânicas e biológicas, tais como: 1) apresentar poros que permitam a interligação e crescimento celular, bem como o fornecimento de nutrientes e eliminação de metabolitos, 2) o tamanho dos poros devem estar no intervalo de 5-10 vezes o diâmetro da célula (uma célula eucariótica pode ter entre 10-100  $\mu\text{m}$ ); 3) a superfície química do *scaffold* deve favorecer a adesão celular, diferenciação e proliferação celular, 4) o *scaffold* deve ser fabricado com um material biodegradável, que apresente uma taxa de degradação adequada, de modo a permitir a substituição progressiva do *scaffold* pelo tecido hospedeiro, 5) o *scaffold* deve apresentar uma estrutura com propriedades mecânicas adequadas para as necessidades do hospedeiro (Bártolo *et al.*, 2008; Peltola *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009). Apesar de todos estes requisitos serem bem conhecidos na comunidade científica a sua obtenção na produção de *scaffolds* não é fácil de conseguir, quer através da utilização de técnicas de fabrico convencionais, ou por métodos mais avançados (Peltola *et al.*, 2008).

Como uma alternativa aos métodos convencionais de fabrico de *scaffolds*, foi recentemente introduzido no campo da engenharia de tecidos, um grupo de técnicas, designadas por prototipagem rápida (PR) (Cima *et al.*, 1995; Pham *et al.*, 1998; Hollister *et al.*, 2002; Leukers *et al.*, 2005; Masood *et al.*, 2005; Chumnanklang *et al.*, 2007; Khalyfa *et al.*, 2007; Fierza *et al.*, 2008). PR consiste no fabrico de estruturas complexas construídas camada por camada, de acordo com um programa de computador, em que o modelo pretendido é impresso sobre uma camada fresca de pó por meio da deposição de um aglutinante adequado (Hollister *et al.*, 2002). Atualmente, existem inúmeras tecnologias disponíveis, incluindo estereolitografia, sinterização seletiva a laser, modelação de objetos laminados, modelagem por deposição fundida e impressão tridimensional (I3D) (Cima *et al.*, 1995; Pham *et al.*, 1998; Hollister *et al.*, 2002; Leukers *et al.*, 2005; Masood *et al.*, 2005; Chumnanklang *et al.*, 2007; Khalyfa *et al.*, 2007; Fierza *et al.*, 2008). Deste modo, o desenho de um *scaffold* é introduzido num software de um computador, sendo a interconectividade 3D desejada e a estrutura, rigorosamente controladas, para além de que, o processo de fabrico pode ser repetido e altamente controlado. Além disso, a forma exterior do *scaffold* pode ser projetada de acordo com a anatomia do defeito do próprio paciente, obtendo-se um implante personalizado. Esta tecnologia I3D foi desenvolvida no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT) (Cima *et al.*, 1995).

Apesar de já terem sido publicados diferentes artigos onde a I3D foi usada para produzir *scaffolds*, ainda há a necessidade de prosseguir com este tipo de estudos para otimizar a produção de *scaffolds* que apresentem propriedades mecânicas e biológicas ideais para a regeneração óssea (Cima *et al.*, 1995; Leukers *et al.*, 2005; Khalyfa *et al.*, 2007; Saiz *et al.*, 2007; Amillota e Pelzer, 2008; Fierza *et al.*, 2008). No presente estudo foi utilizada a hidroxiapatite, uma vez que é um substituto ósseo promissor devido à sua semelhança com a parte inorgânica do osso natural.

Os *scaffolds* produzidos por impressão 3D podem ser utilizados para engenharia de tecidos, sendo sobre eles semeadas células do próprio paciente. Esta estrutura 3D vai permitir a adesão das células e subsequentemente permitir a formação de tecido. Deste modo, o design do *scaffolds* torna-se muito importante, para otimizar a eficiência da propagação celular e para observar a proliferação celular no interior da estrutura. Nesta parte do estudo, procedeu-se à caracterização das propriedades mecânicas e biológicas do *scaffold* produzidos por impressão 3D, no sentido de avaliar o processo de adesão e proliferação celular, à superfície e no interior, e avaliar a biocompatibilidade, osteocondução e osteointegração do material.

## 1.2 Materiais e Métodos

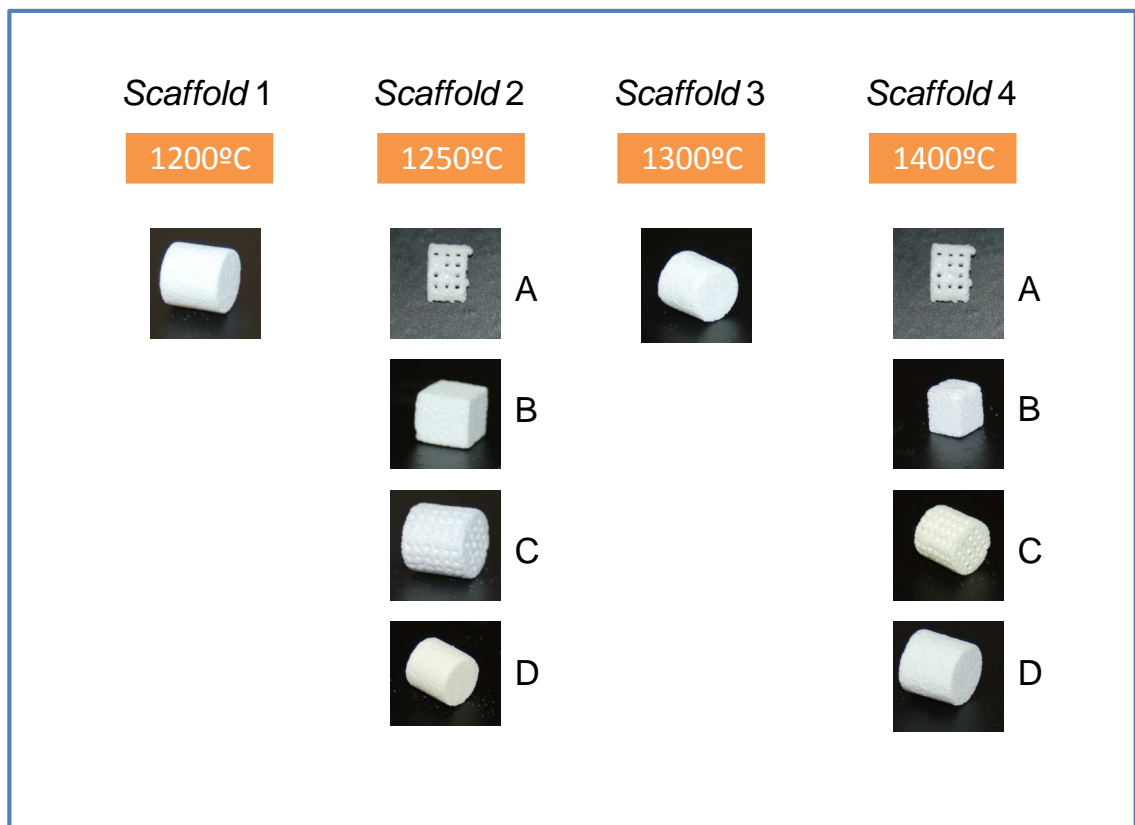
### 1.2.1 Materiais

No presente trabalho foi utilizada uma impressora 3D Spectrum Z™ 510 (da Z Corporation), para a produção de *scaffolds* com diferentes geometrias. Todos os materiais utilizados na produção dos *scaffolds* foram fornecidos pela Z Corporation: um material compósito com alto desempenho (Zp130), um aglutinante à base de água (Zb58) e como infiltrante, um cianoacrilato de viscosidade ultra baixa (Z-bond 101).

A linha celular de osteoblastos humanos (CRL-11372), foi obtida a partir da American Type Culture Collection (VA, EUA). CRL-11372 é uma linha celular imortalizada que tem sido utilizada em estudos que envolvem aplicações ortopédicas (Duarte *et al.*, 2009; Muzzarelli, 2009). Anfotericina B, L-glutamina, DMEM-F12, MTS, EtOH, glutaraldeído, penicilina G, PBS, EDTA, PMS, estreptomicina e tripsina foram adquiridos à Sigma (Sintra, Portugal). SFB foi adquirido à Biochrom AG (Berlim, Alemanha). Quetamina e xilazina foram adquiridos à Agrofaua, Portugal. Os T-Flasks e as placas de 96 poços foram adquiridos à Nunc (Dinamarca).

### 1.2.2 Design e produção dos *scaffolds*

Neste estudo, os *scaffolds* foram produzidos com uma estrutura cúbica e/ou cilíndrica, utilizando o software 3D Design, Solidworks®. Os *scaffolds* cúbicos apresentam 10 mm de comprimento e os *scaffolds* cilíndricos têm um diâmetro e um comprimento de 10 mm. Estes *scaffolds* são estruturas porosas (com macro e microporos) como se observa na figura 20.



**Figura 20.** Imagens dos *scaffolds* de hidroxiapatite produzidos por impressão 3D e sinterizados a diferentes temperaturas.

É de salientar que no presente estudo a geometria dos poros, e a distribuição dos mesmos foi analisada e testada, uma vez que apresentam um papel fundamental ao nível das propriedades mecânicas do *scaffold*, condicionando a sua resistência e interação célula-*scaffold*.

Relativamente ao processo de impressão 3D funciona do seguinte modo: 1) uma camada de hidroxiapatite granulada é colocada numa plataforma de construção, 2) uma válvula microdispensadora injeta aglutinante sobre a superfície de pó e liga os grânulos nas regiões selecionadas, 3) depois de uma camada ser impressa, a plataforma baixa e é depositada nova camada sobre a camada anterior, 4) Depois de terminar o todo o processo, um ligeiro fluxo de ar remover o pó solto que permaneceu na estrutura interna da peça.

A espessura média do pó usada para fazer a impressão 3D dos *scaffolds* definida foi de 0,1 mm. Depois de serem impressos, todos os modelos foram sujeitos a operações de pós-processamento a fim de melhorar as suas propriedades mecânicas: em primeiro lugar, as partículas de pó resultantes dos protótipos foram removidas com ar comprimido, e de seguida procedeu-se à infiltração dos *scaffolds* com cianoacrilato. Posteriormente, procedeu-se à secagem dos mesmos num forno a 60°C durante 25 min. Por último, os *scaffolds* foram sinterizados a diferentes temperaturas: 1200, 1250, 1300 e 1400°C.

### 1.2.3 Cultura celular de osteoblastos humanos

As células CRL-11372 foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com 6 ml de DMEM-F12 (1:1 v/v), suplementado com SFB (10% v/v) inativado, penicilina G (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e anfotericina B (0,25 µg/ml). As amostras foram mantidas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi mudado a cada 3 dias, até se obter confluência celular. A confluência foi obtida após 7 dias. Após a obtenção da mesma, as células foram lavadas com PBS/EDTA a 0,025%. Posteriormente foi adicionada tripsina a 0,18% e as células foram incubadas durante 3 min. Findo esse tempo, a atividade da tripsina foi bloqueada pela adição de meio de cultura com SFB (10% v/v). As células foram, então, centrifugadas, ressuspendidas em meio de cultura e semeadas em T-flasks-75 cm<sup>2</sup> (Maia *et al.*, 2009).

### 1.2.4 Proliferação das células CRL-11372 na presença do *scaffold* de hidroxiapatite

Para avaliar o comportamento das células, na presença do material cerâmico produzido, as células CRL-11372 foram semeadas na presença do *scaffold* (3x3mm) numa placa de 96 poços, numa densidade de 5x10<sup>4</sup> células/poço, durante 24 h (*n* = 5).

O crescimento celular foi comparado com o de células CRL-11372 semeadas na ausência do *scaffold* e com um controlo com células às quais foi adicionado EtOH para provocar a lise celular (K<sup>+</sup>). A proliferação celular foi monitorizado utilizando um microscópio ótico invertido - Olympus CX41 (Tóquio, Japão) equipado com uma câmara digital Olympus SP-500 UZ.

### 1.2.5 Microscopia eletrónica de varrimento

A morfologia dos cerâmicos de HA com ou sem células na sua superfície, foi caracterizado por microscopia eletrónica de varrimento durante 7 dias. As amostras (*n* = 4) foram fixadas durante a noite com glutaraldeído (2,5% PBS), a 4°C. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS durante 2 min e desidratadas com etanol de acordo com um gradiente de 70, 80, 90 e 100%, durante 5 min cada. Posteriormente, este foi removido dos *scaffolds* através da utilização de CO<sub>2</sub> em condições supercríticas e colocadas em suportes adequados. Posteriormente, as amostras foram revestidas com ouro num equipamento Emitech K550 (Londres, Inglaterra) e observadas num MEV - Hitachi S-2700 (Tóquio, Japão) com aplicação de uma voltagem de 20 kV e as amostras foram observadas a diferentes ampliações.

### 1.2.6 Avaliação do perfil de citotóxico do *scaffold* de hidroxiapatite

Para avaliar a citotoxicidade do presente material cerâmico foram semeadas as células CRL-11372, com uma densidade de 5x10<sup>4</sup> células/ml em placas de 96 poços na presença ou ausência de *scaffolds* de HA, e posteriormente cultivadas com 100 µl de meio DMEM-F12 a 37°C, numa atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Os *scaffolds* de HA foram previamente irradiados com radiação UV durante 30 min, bem como as placas onde iriam ser semeadas as células.

Os testes de citotoxicidade foram efetuados ao fim de 24, 48 e 72 h (Coimbra *et al.*, 2011). Após 24 h, o conteúdo de cada poço foi removido e foram adicionados 100 µl de meio de cultura

fresco e 20 µl da solução de reagente MTS/PMS. Posteriormente, a placa foi incubada durante 4 h a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, foi lida a absorvância a 492 nm, num leitor de microplacas (Sanofi, Pauster Diagnostics). O procedimento foi novamente repetido ao fim de 48 e 72 h. Os resultados obtidos foram expressos como a média ± o erro padrão da média de pelo menos quatro ensaios independentes. Ao longo do ensaio (24, 48 e 72 h) as placas usadas na cultura celular foram visualizadas através de um microscópio de luz invertida (Olympus CX41), equipado com uma câmara digital Olympus SP-500 UZ.

### 1.2.7 Ensaios *in vivo*

Neste estudo foram utilizados 120 ratos Wistar (com um peso compreendido entre as 200 a 230 g). O protocolo animal seguido no presente estudo, foi aprovado pelo Comité de Ética do Centro Hospitalar Cova da Beira e realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas nos Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório (DGAV). Cada animal foi anestesiado com uma injeção intraperitoneal IP (40 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina) de modo a serem submetidos a cirurgia. Posteriormente, os animais foram separados em dois grupos (teste e controlo), cada um com 12 animais. Subsequentemente, foi induzido um defeito ósseo na calote (Cooper *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2012), em todos os animais com uma broca especial. No grupo controlo, o defeito ósseo não foi preenchido com qualquer material, enquanto no grupo teste houve inserção dos *scaffolds* produzidos, que teve o mesmo tamanho da lesão óssea.

Os *scaffolds* de hidroxiapatite foram esterilizados conforme relatado anteriormente na secção 3.2.6.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em jaulas individuais e alimentados com alimentação comercial e água *ad libitum*. Durante o período pós-operatório, todos os animais apresentaram boas condições gerais de saúde, apesar de não ter sido aplicada nenhuma terapia antibiótica. Os animais foram sacrificados após 3, 10, 21, 30 e 60 dias, com uma dose letal de anestesia.

### 1.2.8 Análise histológica

Após a necrópsia dos animais, foram retiradas amostras do defeito ósseo e os órgãos vitais (cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rins) de todos os animais. As amostras de osso foram descalcificadas utilizando uma solução de EDTA 10% (preparado com água destilada, pH 7.4) durante um período de duas semanas, a 4°C. A solução de EDTA foi mudada todas as semanas.

As amostras foram fixadas em formalina, desidratadas em etanol e incorporadas em parafina para o processamento histológico de rotina. Foram obtidas secções de 3 µm, de cada bloco de parafina e estas foram seguidamente coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por dois especialistas em anatomia patológica, utilizando um microscópio ótico com um software específico da Olympus.

### 1.2.9 Análise estatística

Os resultados obtidos no ensaio de MTS foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. A análise dos resultados foi efetuada usando a análise de variância one-way ANOVA com teste de Dunnet's post hoc. Os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico MYSTAT 12 (Systat Software, uma subsidiária da Cranes Software International Ltd.).

## 1.3 Resultados e Discussão

### 1.3.1 Caracterização do processo de impressão 3D

Para a avaliação do processo de impressão 3D foram considerados e analisados três parâmetros: as dimensões mínimas permitidas para aceitação dos *scaffolds*; os erros geométricos de controlo associados com o processo de fabrico, e as diferenças entre a macroporosidade teórica e real. É de salientar, que o processamento de materiais em pó dá origem a estruturas com uma microporosidade inerente, devido à existência de espaços vazios entre as partículas de pó. Esta porosidade é importante no processo de remodelação óssea.

Relativamente à caracterização do processo de fabrico este mostrou ser aplicável para a produção do *scaffold*, permitindo o controlo do tamanho, tipologia e distribuição dos poros. Contudo, a análise criteriosa deste ponto foi efetuada pelos investigadores do Instituto Superior Técnico (IDMEC).

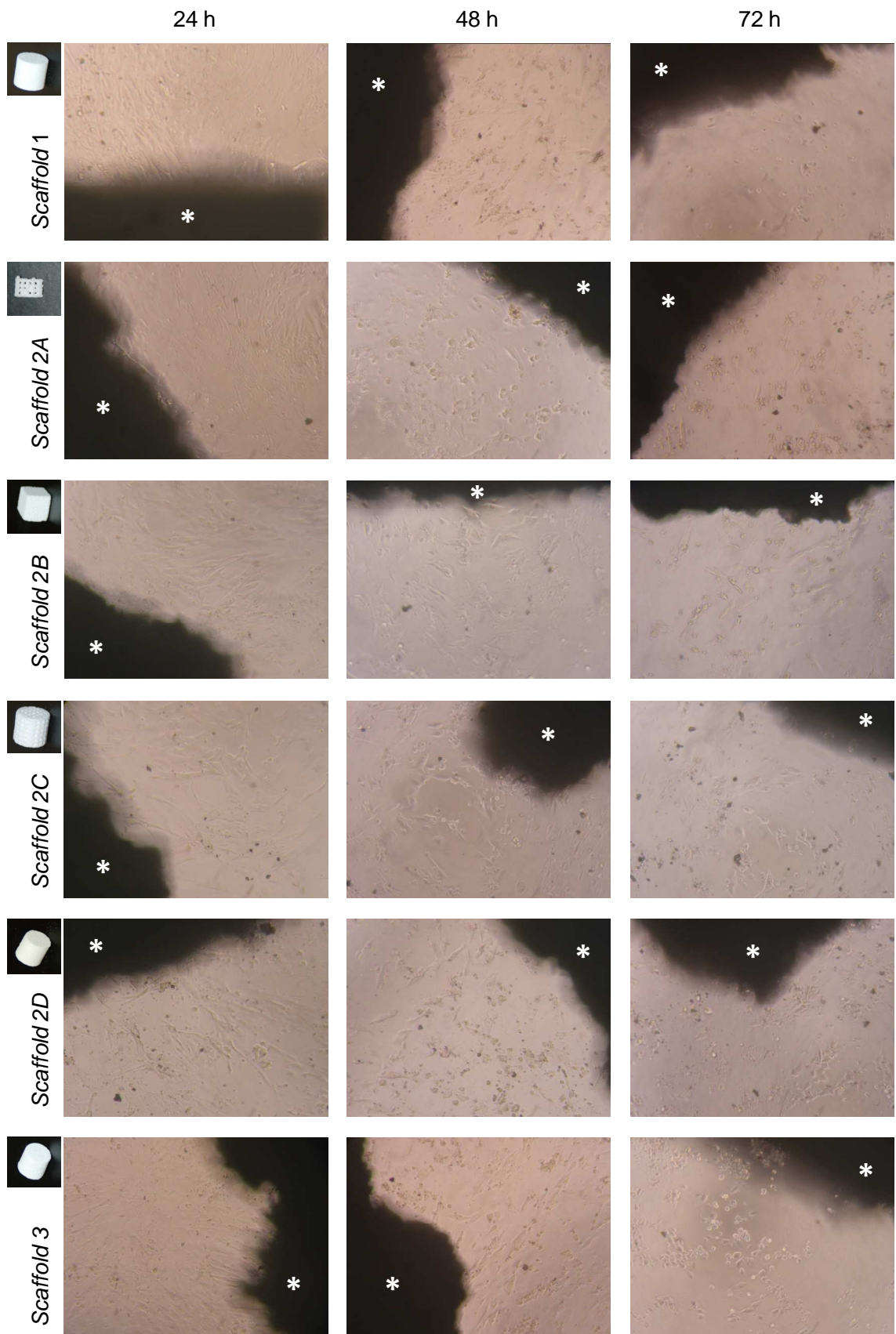
### 1.3.2 Caracterização do perfil citotóxico do *scaffold* de hidroxiapatite

#### 1.3.2.1 Ensaio *in vitro*

Para avaliar a citotoxicidade dos diferentes *scaffolds*, foram semeadas CRL-11372, em placas de 96 poços, na presença destes biomateriais (grupos teste). Foram ainda efetuados os grupos controlo negativo ( $K^-$ ), onde apenas foram semeadas células e controlo positivo ( $K^+$ ), onde foram semeadas células e adicionado a cada poço etanol a 96%.

As culturas foram analisadas ao longo de 24, 48 e 72 h, à medida que ia sendo efetuado o ensaio de MTS (Figura 21 e 22).

Após as primeiras 24 h verificou-se que as células aderiam à superfície dos biomateriais, contudo, eram notórias algumas diferenças entre a adesão aos biomateriais em estudo. Também se verificou crescimento celular nos poços dos  $K^-$  e a ausência do mesmo no  $K^+$ .



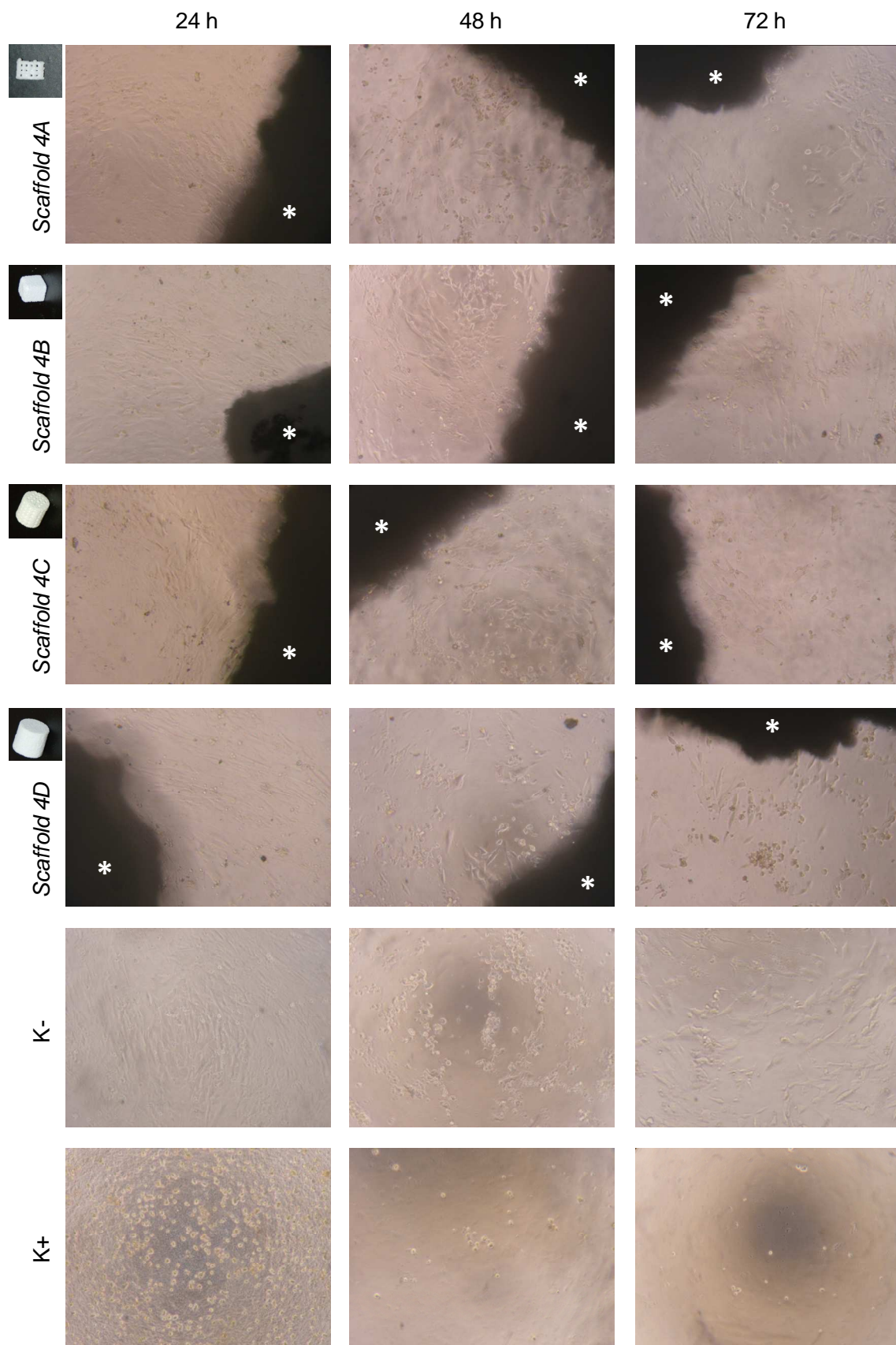
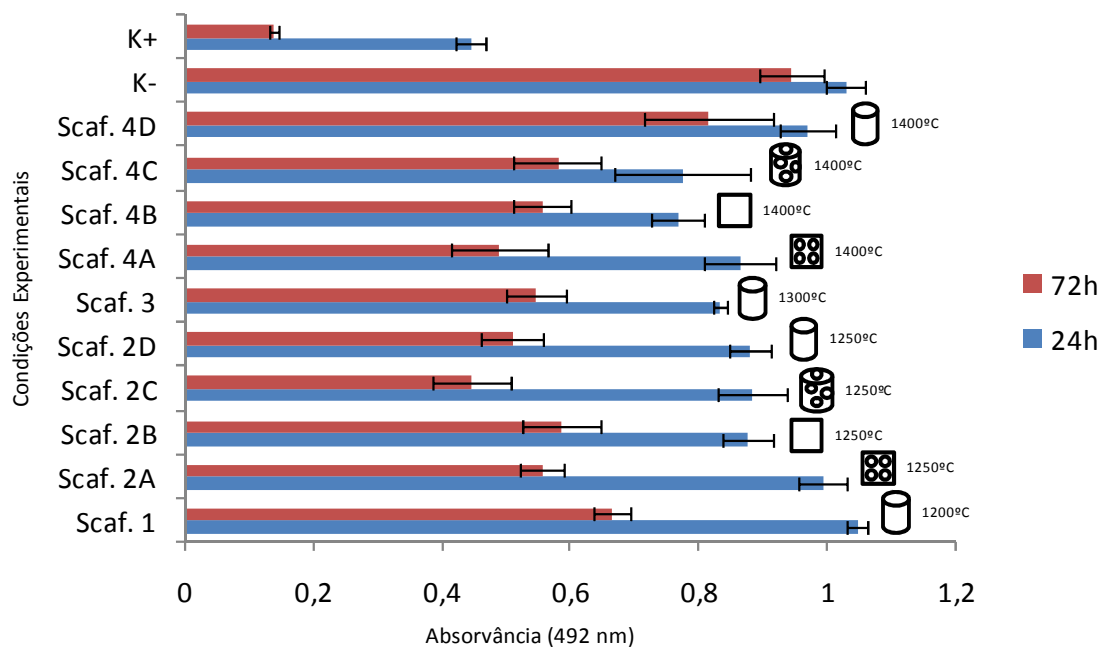


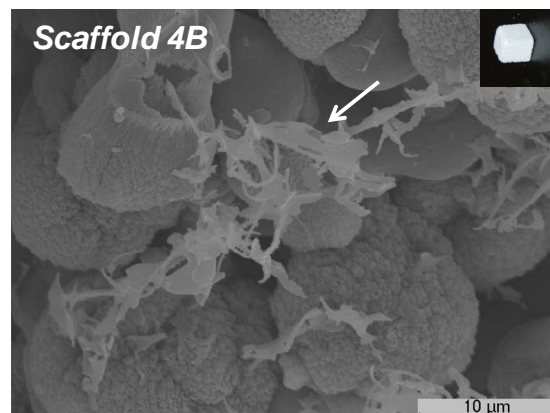
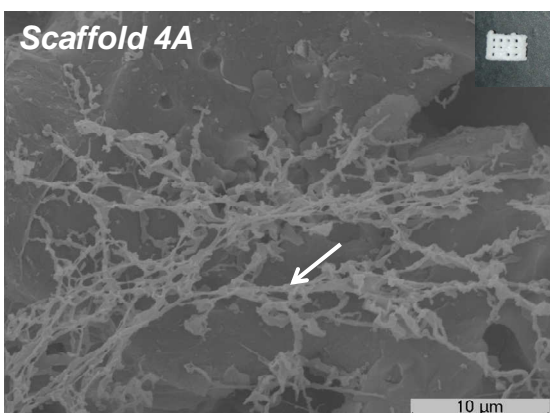
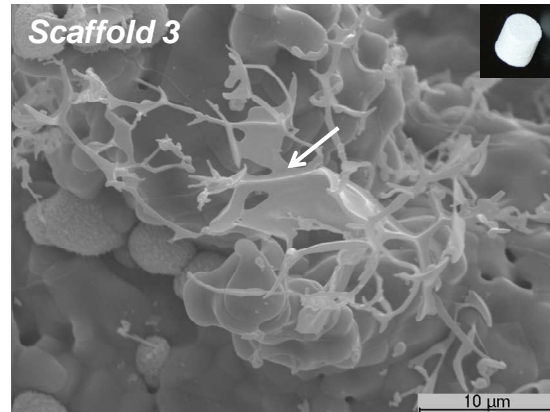
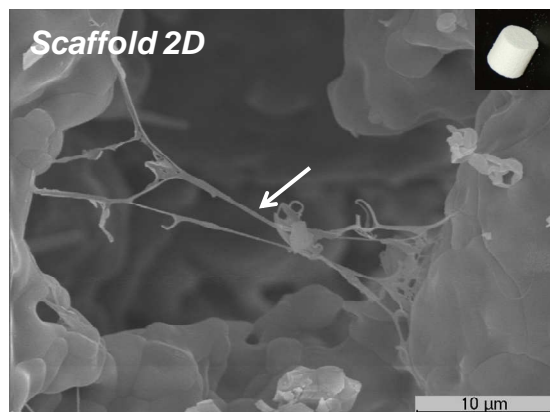
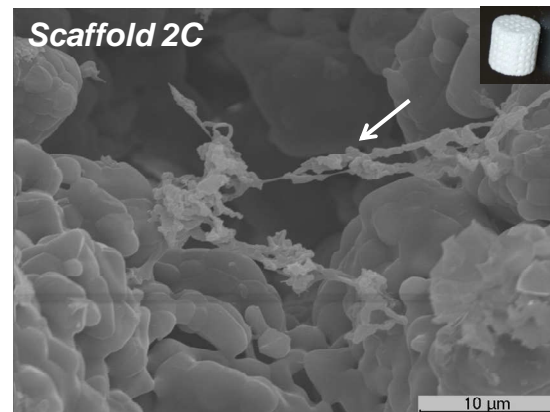
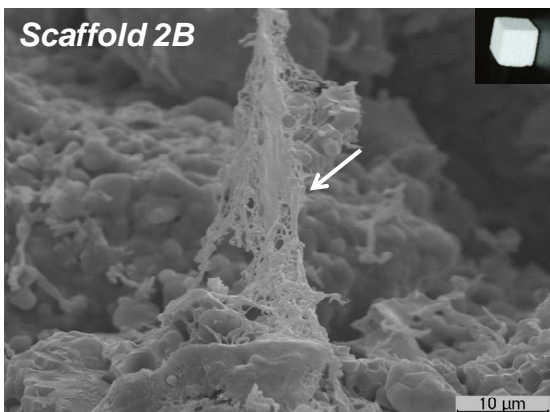
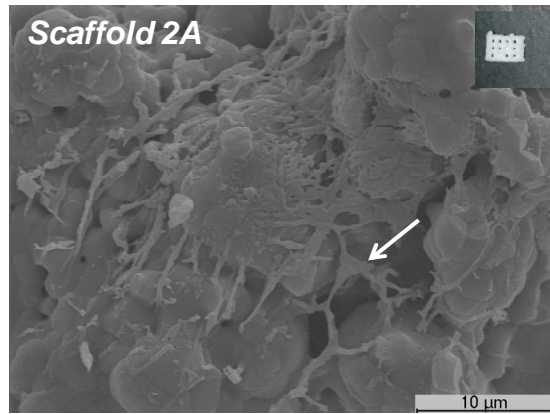
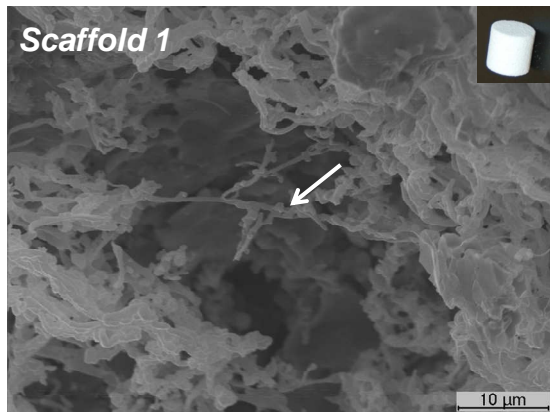
Figura 21. Imagens de microscopia ótica de CRL-11372 semeados na superfície dos *scaffolds* (\*) e na ausência dos mesmos, K<sup>-</sup> e K<sup>+</sup>.

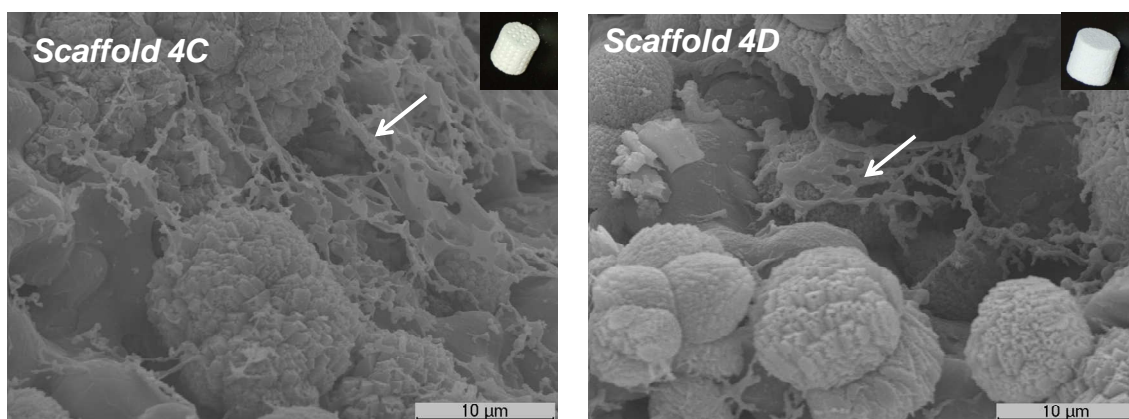


**Figura 22.** Avaliação da viabilidade celular através do ensaio de MTS, após 24 e 72 h, na presença dos diferentes *scaffolds* de hidroxiapatite.

No sentido de avaliar mais aprofundadamente os estudos, foram repetidos os ensaios *in vivo* para os materiais que apresentavam valores mais altos de viabilidade celular.

Através da análise das imagens de MEV, também se comprovou a adesão das células aos biomateriais, devido às propriedades de superfícies dos mesmos. Esta análise permitiu verificar que ocorreu a adesão celular através dos prolongamentos citoplasmáticos (filopodia) e o crescimento celular, ao fim de 3 dias (Figura 23).

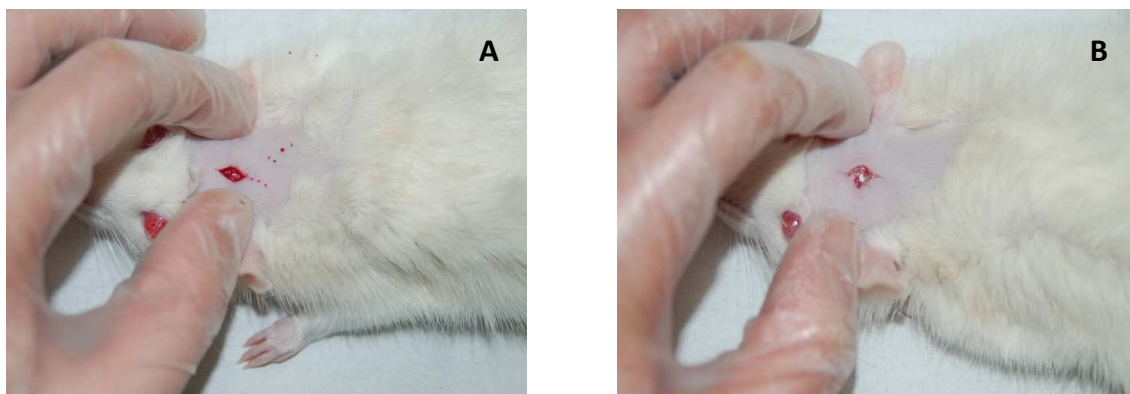




**Figura 23.** Imagens de MEV de CRL-11372 na superfície dos *scaffolds* em estudo.

### 1.3.2.2 Ensaio *in vivo*

Para completar o estudo foram efetuados testes *in vivo* com 120 de ratos Wistar (com 16 semanas de vida), com peso entre 200-230 g. Tal como já foi mencionado o procedimento cirúrgico realizou-se através da criação de um defeito ósseo na calote dos animais que foi preenchido, no grupo teste, por cada um dos biomateriais individualmente (Figura 24).



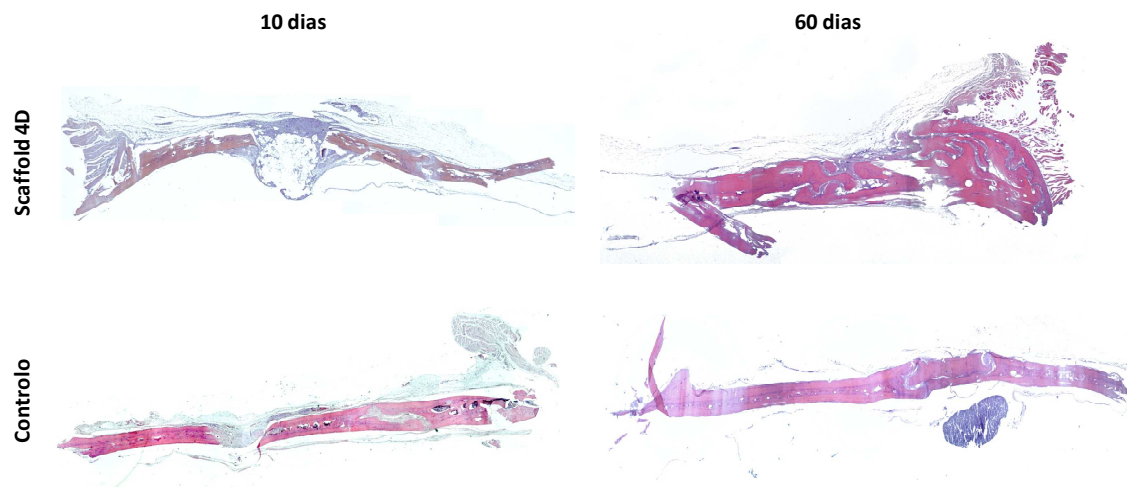
**Figura 24.** Avaliação da biocompatibilidade dos materiais através de ensaios *in vivo*.

Os animais foram sacrificados após 3, 10, 21, 30 e 60 dias. Durante a necrópsia dos animais foram recolhidos os órgãos vitais (cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, baço) e amostra de osso da calote para posterior análise histológica.

No momento em que se efetuou a necropsia do animal não foram observadas lesões significativas e episódios de profunda inflamação no local onde tinha sido efetuado o defeito ósseo. Contudo, a avaliação histológica das amostras foi efetuada para verificar a presença ou ausência de alterações morfológicas entre o grupo teste e o grupo controlo.

No pós-operatório, no terceiro e no décimo dia, a análise histológica do tecido ósseo revelou um processo inflamatório e a formação de tecido de granulação no tecido em contacto com os materiais em estudo. O grupo controlo apresentou junto do local onde tinha sido efetuado o defeito ósseo, a presença de um tecido fibroso com novos vasos e uma pequena faixa de tecido de granulação, mas não foi observada reação inflamatória (Figura 25). De todos os materiais testados, o material 4D foi o que apresentou uma maior biocompatibilidade tanto nos ensaios *in*

*vitro*, como nos ensaios *in vivo*. Seguidamente, serão apenas apresentadas as imagens obtidas na análise histológica para este material (Figura 25). As imagens histológicas obtidas para os outros materiais são apresentadas no Anexo I.



**Figura 25.** Imagens histológicas do tecido ósseo da calote de rato após 10 e 60 dias da criação do defeito ósseo.

Após um período de 30 e 60 dias, verificou-se no grupo controlo a formação de um novo tecido ósseo na superfície, sem reação periosteal na amostra. No grupo teste, após os 60 dias ainda se observava uma lacuna óssea, preenchida por tecido conjuntivo, e com um início de formação óssea (Figura 25).

## 1.4 Conclusões

O presente trabalho permitiu caracterizar *scaffold* de HA produzidos por impressão 3D e verificar a sua aplicação na ETO. Relativamente à caracterização do processo de fabrico este mostrou ser aplicável para a elaboração do *scaffold*, permitindo o controlo da sua produção. A prototipagem rápida apresenta como vantagens a capacidade de se desenvolverem *scaffolds* de grande complexidade geométrica sem a necessidade de um processamento direto manejável e num tempo reduzido.

No que diz respeito à avaliação biológica, verificou-se que as células proliferaram na superfície dos *scaffolds* desenvolvidos. Através das análises dos testes biológicos efetuados, verificou-se que as células penetravam no interior dos grânulos de HA. Estes resultados permitiram concluir que os *scaffolds* de HA produzidos através da técnica de impressão 3D, possuem as propriedades adequadas para serem usadas na regeneração óssea, contudo é necessário efetuar mais ensaios *in vivo* para permitir a otimização dos *scaffolds* por forma a permitirem a regeneração óssea do hospedeiro. Deste modo, os resultados apresentados neste estudo são importantes em relação à continuidade da utilização da técnica de impressão 3D para a engenharia de tecido ósseo, uma vez que é possível o desenvolvimento de *scaffolds* com elevada complexidade geométrica num curto espaço de tempo, garantindo melhores propriedades dos *scaffolds* ao nível da estrutura.

## 1.5 Referências Bibliográficas

Amillota A, Pelzer R. Modelling of porous structures for rapid prototyping of tissue Engineering scaffolds. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 2008, 39: 501-511.

Bártolo P, Almeida H, Rezende R, Laoui T, Bidanda B. Advanced Processes to Fabricate Scaffolds for Tissue Engineering. In *Virtual Prototyping and Bio Manufacturing in Medical Applications*. Springer US 2008, 149-170.

Batista P, Rodrigues M, Silva D, Morgado P, Henriques J, Almeida M, Silva A, Correia IJ. Characterization of the mechanical and biological properties of a new alumina scaffold. *J Appl Biomater Function Mater* 2012, doi: 10.5301/JABFM.2012.9264.

Chumnanklang R, Panyathanmaporn T, Sitthiseripratip K, Suwanprateeb J. 3D printing of hydroxyapatite: Effect of binder concentration in precoated particle on part strength. *Materials Science and Engineering C* 2007, 27: 914-921.

Cima M, Sachs E, Fan T, Brecht J, Michaels S, Khanuja S, Lauder A, Lee S, Brancazio D, Curodeau A, Tuerck H. Three Dimensional Printing Techniques, Massachusetts Institute of Technology, U.S. Patent No. 5387380 1995.

Coimbra P, Ferreira P, de Sousa H, Batista P, Rodrigues M, Correia I, Gil MH. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011, 48(1): 112-118.

Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic Reconstructive Surgery* 2010, 125(6): 1685-1692.

Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal* 2009, 45(1): 141-148.

Fierza F, Beckmann F, Huser M, Irsend S, Leukers B, Witte F, Özer Degistiricif O, Andronacheb A, Thief M, Müllera B. The morphology of anisotropic 3D-printed Hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 2008, 29(28): 3799-3806.

Hollister S, Maddox R, Taboas J. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials* 2002, 23(20): 4095-103.

Jones A, Arns C, Huttmacher D, Milthorpe B, Sheppard A, Knackstedt M. A The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials* 2009, 30(7): 1440-1451.

Khalyfa A, Vogt S, Weisser J, Grimm G, Rechtenbach A, Meyer W, Schnabelrauch M. Development of a new calcium phosphate powder-binder system for the 3D printing of patient specific implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2007, 18(5): 909-916.

Leukers B, Gülkan H, Irsen S, Milz S, Tille C, Schiker M, Seitz H. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2005, 16: 1121-1124.

Maia J, Ribeiro M, Ventura C, Carvalho R, Correia I, Gil M. Ocular injectable formulation assessment for oxidized dextran-based hydrogels. *Acta Biomaterialia* 2009, 5: 1948-1955

Masood S, Singh J, Morsi Y. The design and manufacturing of porous scaffolds for tissue engineering using rapid prototyping. *Int J Adv Manuf Technol* 2005, 27: 415-420.

Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 2009, 76: 167-182.

Peltola M, Melchels F, Grijpma D, Kelloma M. A review of rapid prototyping Techniques for tissue engineering purposes. *Annals of Medicine* 2008, 40(4): 268-280.

Pham D, Gault R. A comparison of rapid prototyping technologies", *Int. J. Machine Tools and Manufature* 1998, 38: 1257-1287.

Saiz E, Gremillard L, Menendez G, Miranda P, Gryn K, Tomsia A. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds. *Materials Science Engineering C* 2007, 27: 546-550.

Ye JH, Xu YJ, Gao J, Yan SG, Zhao J, Tu Q, Zhang J, Duan X-J, Sommer CA, Mostoslavsky G, Kaplan DL, Wu Y-N, Zhang C-P, Wang L, Chen J. Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs. *Biomaterials* 2011, 32(22): 5065-5076.

## Capítulo 6



# Caracterização de um substituto ósseo injetável (Patente - PT 104595)

No presente capítulo será descrita a produção de um substituto ósseo injetável desenvolvido em colaboração com a empresa CERAMED, que resultou numa Patente PT 104595.

## 1.1 Introdução

Os substitutos ósseos injetáveis têm vindo a ser alvo de intensa investigação. O facto de serem injetáveis apresentam vantagens uma vez que permitem reduzir a duração das intervenções cirúrgicas, minimizar os efeitos secundários e as dores pós-operatórias para o paciente. Assim, a recuperação do paciente torna-se mais rápida e os custos associados ao tratamento do paciente, reduzidos (Liu *et al.*, 2006).

Os cimentos ósseos, constituídos essencialmente por fosfatos de cálcio, constituem atualmente um dos mais importantes grupos de substitutos ósseos injetáveis. Estes compostos são vantajosos uma vez que são biocompatíveis, apresentam uma razoável resistência mecânica e permitem uma fácil aplicação, devido ao seu período de secagem ser adequado à prática cirúrgica (Liu *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009). No entanto, devido à sua elevada densidade, não permitem uma eficiente adesão e proliferação celular. Por outro lado, também não permitem trocas de nutrientes no seu interior, o que é uma condição fundamental para a formação óssea. Deste modo, a fraca resposta biológica e de interligação ao tecido, condiciona de forma negativa a sua aplicação no processo de regeneração óssea (Weiss *et al.*, 2007). Uma outra característica dos cimentos ósseos recai no facto de não serem produtos prontos a utilizar, tendo que ser preparados durante a intervenção cirúrgica, condicionando a sua duração e podendo desencadear outras complicações fisiológicas.

Deste modo, com o intuito de se melhorar a eficiência de adesão e proliferação celular no local do implante, são atualmente utilizados granulados de fosfato de cálcio injetáveis, que funcionam como cerâmicos macroporosos interconectados (Trojani *et al.*, 2006). A macroporosidade associada aos espaços entre os grânulos, permitem a migração de fluidos corporais, células e tecidos, imprescindíveis à vascularização do local, potenciando a formação de novo osso (Gauthier *et al.*, 2005).

A incorporação de biopolímeros, pode funcionar como veículo para o transporte de granulados facilitando assim a aplicação destes substitutos ósseos, proporcionando estabilidade e impedindo assim, a migração de partículas cerâmicas para os tecidos circundantes durante e após o implante (Gauthier *et al.*, 2005).

O polissacarídeo quitosano é um potente osteoindutor, que acelera de forma substancial o crescimento do novo osso (Borges *et al.*, 2009). Por outro lado, este composto é totalmente biodegradável, biocompatível, promove a adesão celular e possui propriedades antimicrobianas (Liu *et al.*, 2006; Chesnutt *et al.*, 2009).

O biomaterial desenvolvido apresenta uma composição mais simplificada do que as anteriormente publicadas, sem perder as características de injectabilidade, moldabilidade e

biocompatibilidade. O presente substituto ósseo é composto por uma combinação de polímeros (que lhes conferem propriedades de injetabilidade, moldabilidade, coesão e plasticidade) com os grânulos cerâmicos bifásicos que originam uma matriz biodegradável, que mimetiza a estrutura orgânica/inorgânica do osso e com a vantagem de ser um produto pronto a usar.

## 1.2 Materiais e Métodos

### 1.2.1 Materiais

O substituto ósseo injetável foi produzido com uma grande variedade de compostos (hidroxiapatite, beta fosfato tricálcico, cloreto de cálcio, alginato de sódio, quitosano, polietileno glicol) adquiridos à Sigma (Sintra, Portugal). A linha celular de osteoblastos humanos hFOB 1.19 (CRL-11372), foi obtida a partir da American Type Culture Collection (VA, EUA). CRL-11372 é uma linha celular imortalizada que tem sido utilizada em estudos que envolvem aplicações ortopédicas. Anfotericina B, L-glutamina, DMEM-F12, MTT, EtOH, glutaraldeído, penicilina G, PBS, EDTA, HCl, isopropanol, estreptomicina e tripsina foram adquiridos à Sigma (Sintra, Portugal). SFB foi adquirido à Biochrom AG (Berlim, Alemanha). Quetamina e xilazina foram adquiridos à Agrofaua, Portugal. T-flasks e placas de 96 poços foram adquiridos à Nunc (Dinamarca).

### 1.2.2 Métodos

#### 1.2.2.1 Preparação do substituto ósseo injetável

O substituto ósseo injetável e a sua preparação compreendem a mistura de uma fase líquida (hidrogel) com uma fase sólida (grânulos):

- Composição da fase sólida (preparação dos grânulos)

A fase sólida é composta por grânulos com uma composição bifásica e foram elaborados a partir de uma mistura de 75% B fosfato tricálcico e de 25% hidroxiapatite. A 80 g de uma solução aquosa de alginato de sódio foram adicionadas 15 g de hidroxiapatite e 5 g de B fosfato tricálcico. A mistura resultante foi colocada numa seringa e injetada lentamente num equipamento de encapsulamento (através da regulação do fluxo de ar comprimido e do caudal da mistura foi possível controlar o diâmetro dos grânulos), com um caudal de 20 a 50 ml/min e uma pressão de 0,1 Mpa. As gotas assim formadas polimerizam numa solução aquosa de cloreto de cálcio com uma concentração de 0,1 M. Posteriormente, os grânulos foram secos, com temperaturas entre os 40 e os 100°C, e sinterizados a 1150°C, durante 2 a 6 h, de forma a queimar o polímero e formar uma estrutura estável e porosa, constituída apenas por fosfatos de cálcio. Finalmente, com recurso a um peneiro, os grânulos são separados com diâmetros entre 38 e 500 µm.

- Composição da fase líquida (preparação do hidrogel)

A fase líquida é composta por um hidrogel formado por dois polímeros (um hidrofóbico e outro hidrofílico), que foram dissolvidos numa solução aquosa de um ácido orgânico. A 10 mL de solução aquosa de ácido orgânico a 2% v/v é adicionado 0,5 g de quitosano e 1 mL de polietileno glicol. A reação ocorre a uma temperatura de refluxo, entre os 60-100°C, durante um período de tempo de 12 h.

O polímero hidrofóbico foi dissolvido numa concentração que varia entre 3 a 6% em peso total, e faz parte do seguinte grupo: celulose, quitina, quitosano, hidroxipropilo quitosano, poli vinilpirrolidona e similares.

O polímero hidrofílico foi dissolvido numa concentração que varia entre 10 a 30% em peso total, e faz parte do seguinte grupo: polietileno glicol, polipropileno glicol, alginato de sódio, poli hidroxietil metacrilato e similares.

O ácido orgânico presente na fase aquosa está numa concentração que varia de 1 a 58 em peso total e pode ser um dos seguintes ácidos orgânicos: ácido acético, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico e/ou similares.

Posteriormente, o hidrogel obtido é arrefecido e usado diretamente na mistura com a fase sólida.

As concentrações usadas determinam a viscosidade da fase líquida e foram determinadas com base na viscosidade adequada para a aplicação do substituto ósseo. Através do procedimento referido, obteve-se uma fase líquida homogênea, determinante para o transporte da fase sólida e na fixação celular sobre a superfície do substituto ósseo.

A mistura das duas fases foi efetuada de acordo com um rácio que pode ir dos 0,3 a 1 g/g. Isto é, por cada grama de fase sólida, adiciona-se entre 1 a 3 gramas de fase líquida.

A 1 g de grânulos de fosfato de cálcio são adicionados entre 1,5 a 3 g de hidrogel. Posteriormente, são misturados com uma espátula, e a mistura é introduzida numa seringa e fechada em saco de polietileno com recurso a vácuo.

O substituto ósseo deve possuir uma quantidade máxima de fase sólida transportável pela fase líquida sem perdas de propriedades de injetabilidade e consistência do produto final. O rácio usado é responsável pela consistência final e ideal do substituto ósseo.

No final, a mistura é colocada numa seringa para facilitar a sua aplicação, podendo permanecer no interior desta sem perder as características referidas anteriormente.

#### **1.2.2.2 Teste de injetabilidade**

Para efetuar a medição da injetabilidade do substituto ósseo produzido, coloca-se a seringa contendo a mistura num suporte apropriado no equipamento de tração Instron Universal Testing Machine modelo 4507, sob uma velocidade de compressão de 60 mm/min e com intervalos de tempo, de 1 hora, 1, 10 e 30 dias, 3 e 6 meses.

#### **1.2.2.3 Cultura celular de osteoblastos humanos**

As células CRL-11372 foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com 6 ml de DMEM-F12 (1:1 v/v), suplementado com SFB (10% v/v) inativado, penicilina G (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e anfotericina B (0,25 µg/ml). As amostras foram mantidas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi mudado a cada 3 dias, até se obter confluência celular. A confluência foi obtida após 7 dias. Após a obtenção da mesma, as células foram lavadas com PBS/EDTA a 0,025%. Seguidamente, adicionou-se tripsina a 0,18% e as células foram incubadas durante 3 minutos. Após este tempo, a atividade da tripsina foi

bloqueada pela adição de meio de cultura com SFB (10% v/v). As células foram, então, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e semeadas em T-flasks-75 cm<sup>2</sup>.

#### **1.2.2.4 Proliferação e adesão celular na presença do substituto ósseo injetável**

Para determinar se houve adesão e proliferação celular na presença do biomaterial, foi colocada uma lamela no interior dos poços de placa de cultura de 24 poços. Em cada poço foram semeados osteoblastos em meio de cultura, com 10% de SFB. As placas foram posteriormente colocadas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 48 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido e as lamelas e os biomateriais (com as células aderidas) foram retiradas da placa de cultura e fixadas com gluteraldeído (2,5% em PBS) a 4°C durante 24 h. Seguidamente, as lamelas e os biomateriais foram lavados com tampão PBS e desidratados progressivamente durante 10 min em EtOH a 70, 80, 90, 100%.

Após a desidratação a montagem foi efetuada colocando o substituto ósseo e as lamelas numa placa de alumínio que foi revestida a ouro utilizando o equipamento Emitech K550. O biomaterial revestido foi colocado no interior de um MEV - Hitachi S-2700) com uma voltagem de aceleração de 20 kV e as imagens foram obtidas a diferentes ampliações.

#### **1.2.2.6 Avaliação do perfil de citotóxico do substituto ósseo injetável**

Para avaliar a citotoxicidade do substituto ósseo injetável produzido, este foi pesado (0,8 g) e após ter sido esterilizado (em EtOH) foi adicionado a 4 ml de meio de cultura DMEM. O biomaterial permaneceu no meio de cultura durante 24 h a 37°C.

Posteriormente, foi recolhido o meio de cultura onde se encontrava o biomaterial e esse meio foi utilizado para semear células da linhagem CRL-11372. As células foram semeadas, numa densidade de  $3 \times 10^5$  células/ml, em meio DMEM com 5% de SFB em placas de cultura de 96 poços. Seguidamente as placas foram colocadas na incubadora a 37°C na presença de 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Do mesmo modo, foram efetuados dois grupos controlo, o controlo negativo (K<sup>-</sup>) (as células foram colocadas em meio de cultura sem terem estado em contacto com o biomaterial) e o controlo positivo (K<sup>+</sup>) (as células foram colocadas em meio de cultura sem terem estado com o biomaterial, mas, ao meio foi ainda adicionado EtOH).

Após atingirem a confluência, o meio em contacto com as células foi removido e foi efetuado o ensaio de MTT. A cada poço da placa onde se encontram as células foi adicionado 100 µl de corante MTT, que ficou a incubar a 37°C durante 3 h. O formazano produzido foi diluído em 0,004M de HCl em isopropanol durante 1h30. Após esse período realizou-se a leitura da absorvância a 570 nm.

#### **1.2.2.7 Análise estatística**

Os resultados obtidos no ensaio de MTT foram expressos em média ± erro padrão da média. A significância estatística dos resultados foi calculada usando a análise de variância one-way ANOVA com teste de Dunnet's post hoc. Os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico MYSTAT 12 pacote estatístico (Systat Software, uma subsidiária da Cranes Software International Ltd.).

## 1.3 Resultados e Discussão

### 1.3.1 Propriedades macroscópicas do substituto ósseo injetável

Do ponto de vista macroscópico o substituto ósseo injetável (IBS) apresentava uma cor branca opaca e uma superfície porosa (Figura 26A). A estrutura porosa superficial do substituto ósseo foi também observada através da imagem obtida por MEV (Figura 26B).

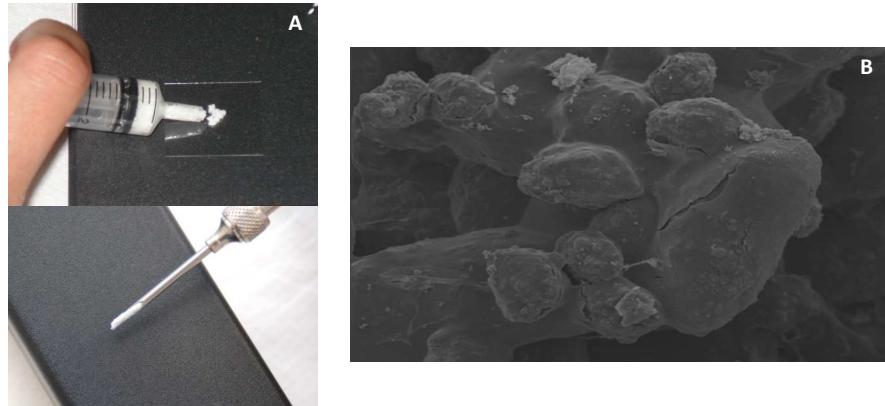


Figura 26. Imagens macroscópicas (A) e microscópicas (B) do substituto ósseo injetável.

### 1.3.2 Caracterização do perfil citotóxico do substituto ósseo injetável

Ao nível dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, o biomaterial apresentou excelentes condições de aplicação, devido às características de injetabilidade e moldabilidade, bem como, excelentes capacidades de regeneração óssea.

As células aderiram e cresceram no meio de cultura que tinha estado em contacto com o biomaterial, o que comprova a sua biocompatibilidade, tal como se pode observar pelos resultados obtidos no ensaio de MTT (Figura 27).

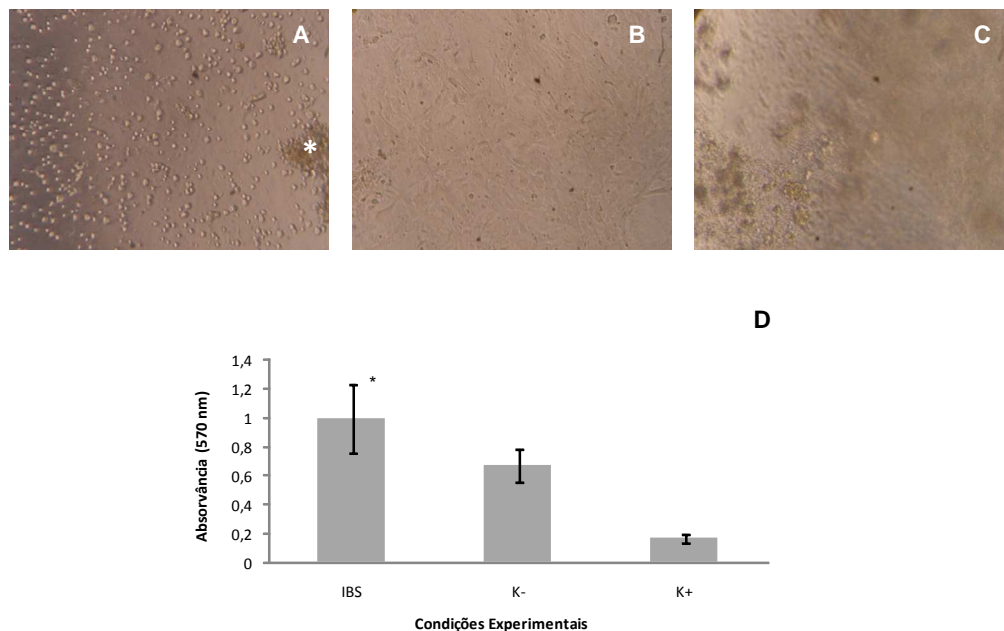
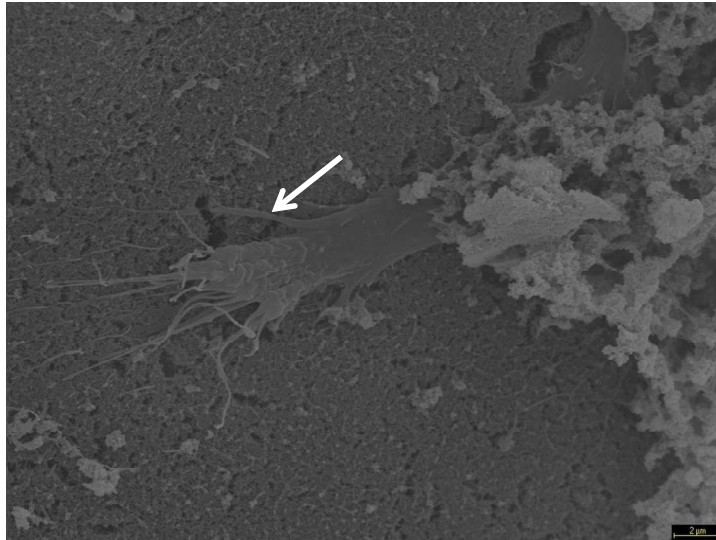


Figura 27. Imagens de microscopia ótica de células CRL-11372 em contacto com o substituto ósseo injetável (\*) (A) e na ausência do *scaffold* (B e C). Avaliação da viabilidade celular medida pelo ensaio de MTT (D): (K<sup>+</sup>) controlo positivo, (K<sup>-</sup>) controlo negativo e (IBS) células na presença do substituto ósseo injetável. Cada resultado é expresso em média  $\pm$  desvio padrão da média. A análise estatística foi efectuada pelo teste de one-way ANOVA de Dunnet's para um significância de (\*  $p < 0.05$ ).

Por outro lado, foram também adquiridas imagens de MEV através das quais se comprovou a adesão das células ao biomaterial, devido às propriedades de superfícies do mesmo. Através das imagens de MEV pôde observar-se o crescimento celular e a filopodia, ao fim de 3 dias (Figura 28).



**Figura 28.** Imagem obtida por MEV, onde se observa a presença CRL-11372 na superfície do *scaffold* ao fim de 3 dias.

## 1.4 Conclusão

O biomaterial desenvolvido nesta parte do estudo era um produto injetável biocompatível e bioativo para posterior aplicação como cimento ósseo. A seleção dos fosfatos de cálcio para formação do biomaterial, prendeu-se com o facto da composição química do osso ser essencialmente formada por HA, deste modo, pretendia-se que a semelhança química entre osso e substituto ósseo fosse determinante para a indução da osteointegração.

A geometria dos grânulos produzidos foi esférica para que no final a estrutura fosse porosa. Os próprios grânulos devem apresentar microporosidade de forma a promover a osteointegração.

Os resultados *in vitro* mostraram que o substituto ósseo possui propriedades adequadas à sua aplicação na regeneração óssea. Futuramente, serão efetuados ensaios *in vivo* para efetuar uma análise mais completa deste produto injetável.

## 1.5 Referências Bibliográficas

Borges JPMR, Pires EFPA, Oliveira HML, Correia IS, Prata SGM. Substituto ósseo injectável e biocompatível. Universidade Nova de Lisboa, PT Patente No. 104595 2009.

Chesnutt BM, Viano AM, Yuan Y, Guda T, Appleford MR, Ong JL, Haggard WO, Bumgardner JD. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009, 88A(2): 491-502.

Gauthier O, Müller R, Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler J-M, Aguado E, Daculsi G. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials* 2005, 26(27): 5444-5453.

Liu H, Li H, Cheng W, Yang Y, Zhu M, Zhou C. Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials. *Acta Biomaterialia* 2006, 2(5): 557-565.

Song H-Y, Rahman AHME, Lee B-T. Fabrication of calcium phosphate-calcium sulfate injectable bone substitute using chitosan and citric acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009, 20(4): 935-941.

Trojani C, Boukhechba F, Scimeca J-C, Vandenbos F, Michiels J-F, Daculsi G, Boileau P, Weiss P, Carle GF, Rochet N. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2006, 27(17): 3256-3264.

Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, Enckel B, Pilet P, Amouriq Y, Daculsi G, Giumelli B. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Biomaterials* 2007, 28(22): 3295-3305.



## Capítulo 7



## Discussão, Conclusão e Perspetivas Futuras

Inspirados pela natureza, os investigadores têm feito enormes progressos ao longo das últimas décadas com o intuito de imitar algumas das estruturas chave e funções bioquímicas do osso, tentando simular o seu ambiente natural. No entanto, devido ao ambiente natural do tecido ósseo, ser extremamente complexo de recriar, nenhum dos materiais atuais imita tal organização e estrutura. O osso é um material natural composto, feito de colagénio (polímero orgânico) e carbonato de HA (cerâmico inorgânico). Deste modo, a escolha mais óbvia de materiais para um análogo sintético ósseo seria um composto de colagénio/HA, contudo a complexidade de interações entre os materiais e entre estes e as células tem merecido a investigação por parte da Engenharia de Tecido Ósseo. Assim, o presente estudo pretendeu dar um contributo para o estudo dos substitutos ósseos. Este trabalho foi desenvolvido no sentido de concretizar o objetivo proposto: desenvolver e testar biomateriais que permitam reparar/regenerar o tecido ósseo. Deste modo, foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, a fim de avaliar a biocompatibilidade e citotoxicidade dos biomateriais, bem como, o seu potencial osteocondutor, osteoindutor e as suas propriedades mecânicas.

A seleção dos biomateriais que foram estudados não foi uma tarefa fácil, devido à diversidade de biomateriais existentes na literatura. Contudo, para a realização do presente estudo, foram selecionados cerâmicos e polímeros, uma vez que estes materiais permitem reproduzir a composição química do osso.

Numa primeira fase foi produzido um *scaffold* com um biomaterial inerte, a alumina, uma vez que está cada vez mais a ser alvo de investigação e ainda não tem sido estudada na forma de nanopartículas para revestir próteses. Estudos recentes mostraram que a alumina se assemelha à HA no que diz respeito à adesão e crescimento celular, caso seja modificada, podendo produzir estruturas rugosas e porosas. Contudo também se verifica alguma controvérsia em relação ao uso da alumina como biomaterial, uma vez que alguns autores afirmam que nanopartículas de alumina são tóxicas. Por outro lado, outros autores referem o facto de a alumina ser bioinerte, para justificar o revestimento de próteses com esta cerâmica. No entanto, o que faz da alumina um potencial candidato na regeneração óssea, é o facto de a alumina ter propriedades mecânicas semelhantes às do osso, apesar de ainda não haver estudos que relatem o desempenho deste material na promoção da osteointegração. Deste modo, o nosso estudo tornou-se pertinente e os resultados obtidos indicaram que o material tem características mecânicas que se adequam à sua aplicação na engenharia de tecidos (nomeadamente na regeneração do tecido ósseo). Os ensaios *in vitro*, permitiram afirmar que o material não é citotóxico. Do mesmo modo, os ensaios *in vivo* corroboraram os ensaios *in vitro*, uma vez que não foi observada nenhuma reação sistémica. Estes resultados levantam a questão da aplicabilidade deste biomaterial no revestimento de próteses dentárias e femorais. No futuro, será interessante melhorar as propriedades deste *scaffold*, de forma a aproveitar as suas propriedades mecânicas, e a torná-lo osteocondutor, mais bioativo e biocompatível, através da incorporação de moléculas bioativas ou do revestimento com polímeros (quitosano, alginato).

Seguidamente e tendo-nos deparado com problemas como controlar a porosidade e a geometria, que influenciam sobretudo a adesão e a proliferação celular, foram desenvolvidos *scaffolds* de HA por impressão 3D em colaboração com o Instituto Superior Técnico, no projeto (PTDC/EME-TME/103375/2008). A HA é dos materiais mais utilizados no desenvolvimento de substitutos ósseos, devido à sua composição química ser igual à do osso. Esta cerâmica bioativa, capaz de estimular a regeneração óssea foi utilizada através de uma recente técnica de processamento por prototipagem rápida. Os *scaffolds* produzidos revelaram possuir boas propriedades nos estudos *in vitro*. Os *scaffolds* também foram caracterizados através de ensaios *in vivo* preliminares, que terão continuidade *à posteriori*.

Noutra fase deste estudo, foi caracterizado um substituto ósseo injetável, produzido pela empresa CERAMED. Este outro material era um compósito de  $\beta$  fosfato de cálcio, HA e QT que reunia as propriedades dos cerâmicos e dos polímeros. Este biomaterial apresentava ainda a vantagem de ser injetável o que permite a sua aplicação em preenchimentos ósseos.

A utilização de polímeros naturais tais como o QT, entre outros, também se mostra muito vantajosa para a aplicabilidade destes *scaffolds*, devido às propriedades que lhe estão associadas, tais como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e boas propriedades de osteointegração. Deste modo, este polímero tem vindo a ser muito utilizado na ETO e em colaboração com a Universidade de Coimbra foi ainda possível o desenvolvimento de um *scaffold* poroso elaborado a partir de polissacarídeos de pectina e QT, que foi produzido por liofilização dos complexos polieletrólitos. Os resultados obtidos mostraram que o *scaffold* possui uma estrutura altamente porosa e irregular que permitiu a adesão e proliferação celular à sua superfície. Contudo, em estudos futuros pretendemos incorporar um material inorgânico bioativo, como por exemplo HA, na preparação dos CPEs, para se obterem *scaffolds* compósitos, com propriedades mecânicas adequadas para aplicações de ETO.

Todos estes biomateriais foram caracterizados através de ensaios *in vitro*. Os ensaios foram essencialmente efetuados com uma linha celular de osteoblastos humanos (CRL-11372) para uma maior credibilidade do estudo dos biomateriais para a regeneração do tecido ósseo humano, uma vez que desta forma conhecemos bem o fenótipo com que estamos a trabalhar. Assim, podemos obter resultados reprodutíveis em que as células obtidas são iguais às que estão presentes no tecido ósseo humano.

Os ensaios *in vitro* efetuados foram testes de citotoxicidade, pretendendo-se analisar qualitativa e quantitativamente (ensaios de MTT e MTS), o padrão de proliferação/viabilidade celular. Para complementar os estudos *in vitro*, foram também efetuados estudos *in vivo*, para alguns materiais.

De um modo geral os resultados obtidos para os diferentes *scaffolds* estudados revelaram que estes têm potencial para serem usados como substitutos ósseos, contudo são necessários mais estudos ao nível da alteração das suas composições e estrutura, bem como do conhecimento das interações metabólicas que ocorrem a nível fisiológico, de forma a encontrarmos o biomaterial “ideal”. Ao nível da composição, o presente estudo permitiu concluir a importância da conjugação de materiais, uma vez que quando utilizados na forma de compósitos as suas propriedades

mecânicas e biológicas são melhores para serem aplicadas em ETO. Por exemplo, quando cerâmicas bioativas, tais como HA e TCPH são hibridizados com polímeros sintéticos biodegradáveis (APL, APG, PCL), apresentam uma maior resistência mecânica, atividade biológica e osteocondutividade. Do mesmo modo, a incorporação de moléculas bioativas permite melhorar as propriedades do biomaterial em relação às interações estabelecidas entre os mesmos e as células. Contudo, é necessário um estudo mais aprofundado para caracterizar as vias de sinalização que facilitam a reparação celular e a regeneração do tecido ósseo.

Por outro lado, o desenvolvimento de estruturas complexas, através de novas metodologias de processamento, como por exemplo a prototipagem rápida, revestem-se de uma importância fundamental, para o desenvolvimento de estruturas suficientemente porosas e resistentes que proporcionem um interface perfeito entre o biomaterial e o local onde vai ser implantado. Daí, a importância do estudo ao nível da nanoescala. A nanotecnologia é uma área de estudo que se tem vindo a expandir e que tem demonstrado melhorias significativas ao nível do desenvolvimento de biomateriais, permitindo um maior conhecimento das interações biomaterial-célula.

Deste modo, com a evolução da ciência, da engenharia de tecidos e dos biomateriais, têm sido desenvolvidos substitutos ósseos cada vez mais semelhantes ao tecido ósseo nativo, permitindo uma regeneração óssea seja eficaz. É neste sentido que investigadores devem continuar a apostar, compreender a biologia óssea e tentar recriar esse ambiente nativo, de forma a permitir uma regeneração óssea mais rápida e eficiente.

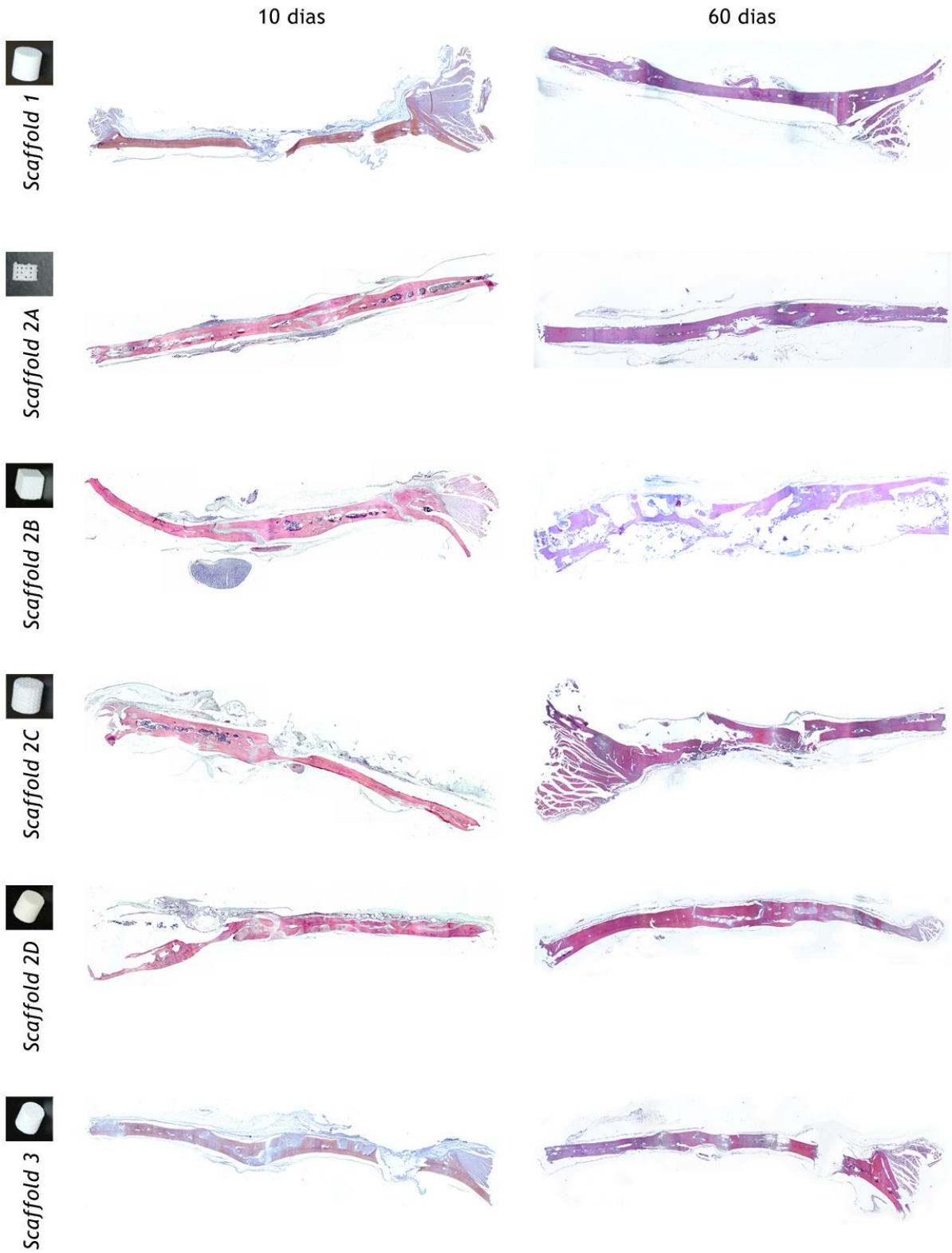


## Anexo



## Anexo I

Imagens histológicas do tecido ósseo da calote de rato após 10 e 60 dias da criação do defeito ósseo.





Scaffold 4A



Scaffold 4B



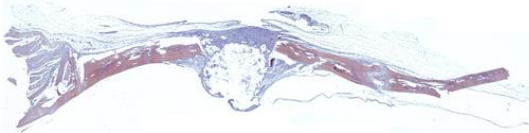
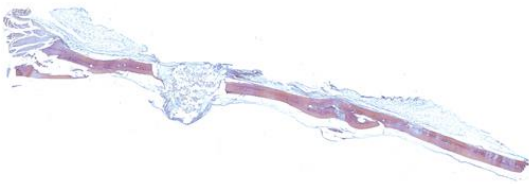
Scaffold 4C



Scaffold 4D

Controlo

10 dias



60 dias

