



João Ricardo Marques Levita

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA NO COMPORTAMENTO CELULAR DE *SCAFFOLDS* DESENHADOS PARA MEDICINA DENTÁRIA

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Biomédica, especialidade em Biomateriais e Instrumentação, orientada pela Doutora Ana Cristina Santos e Profª Doutora Margarida Figueiredo, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA NO COMPORTAMENTO CELULAR DE *SCAFFOLDS* DESENHADOS PARA MEDICINA DENTÁRIA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

Autor

João Ricardo Marques Levita

Orientadores

Doutora Ana Cristina Aguiar Santos (IBILI-FMUC)

Prof^a Doutora Margarida Figueiredo (DEQ-FCTUC)

Coimbra, Setembro, 2017

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



iBiLi
Institute for
Biomedical Imaging
and Life Sciences
University of Coimbra



IPL

cdrsp - centre for rapid
and sustainable
product development
polytechnic institute
of leiria



CHUC
CENTRO HOSPITALAR
E UNIVERSITÁRIO
DE COIMBRA



TÉCNICO
LISBOA



C²TN

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Agradecimentos

Agradeço a quem me ajudou e esteve presente na elaboração da dissertação, começando pela Doutora Ana Cristina Santos do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, minha Orientadora.

À Prof^ª Doutora Margarida Figueiredo, por ter aceite ser a co-orientadora deste trabalho inserido no âmbito de projetos desenvolvidos no grupo que coordena.

À Doutora Patrícia Coimbra, do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, pelos ensinamentos e disponibilidade.

Quero também agradecer à Prof^ª Doutora Bárbara Oliveiros pela indispensável ajuda na análise estatística dos dados recolhidos.

Agradeço ainda à Técnica de Laboratório Cláudia Brites do Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela sua assistência no que às técnicas histológicas diz respeito.

De seguida, deixo um sentido bem-haja aos colegas com quem partilhei as vivências de laboratório, que tanto contribuíram para o enriquecimento proveniente desta experiência de vida, tanto nos momentos mais trabalhosos, quanto nos mais descontraídos. São eles: a Catarina Sá, o Henrique Cunha, a Sara Gemelgo, a Maria Mendes e a Francisca Pereira.

Ao IPL tenho a agradecer ter tornado possível a produção dos *scaffolds*, em particular ao Diretor Nuno Alves, Diretor do Centro de Desenvolvimento Rápido e Sustentável (CDRSP) onde foi feita a produção propriamente dita, e à Mestre Tânia Alves, que deu indicações preciosas para a produção dos *scaffolds*.

Um obrigado também ao Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares do Instituto Superior Técnico, em especial ao seu diretor, o Prof. Doutor António Falcão, ao Mestre Pedro Santos pela ajuda na irradiação dos *scaffolds*, e à Doutora Sandra Cabo Verde pela realização dos testes de microbiologia.

Tenho ainda de deixar um agradecimento ao Instituto de Biofísica do IBILI-FMUC, ao Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra e ao Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra pelos recursos fornecidos, sem os quais a realização do trabalho não teria sido possível.

Não posso deixar de agradecer àqueles que fizeram parte desta etapa da minha vida, a vida académica. A todos os meus colegas de curso, em especial àqueles com quem convivi mais de perto, eles saberão quem são. Aos meus colegas de casa, pelos momentos de descontração naquela que foi a minha casa durante a maior parte destes últimos anos. E aos meus amigos da “*terrinha*”, muitos deles amigos há quase, ou mesmo, duas décadas.

Por último, quero agradecer à minha família. Avó, tios, primos, todos tiveram o seu contributo na minha vida. Aos meus pais, que mesmo nos momentos mais complicados da minha vida académica e da nossa vida familiar nunca deixaram de acreditar em mim e de me dar todo o seu apoio. Ao meu irmão, cuja distância nunca separará da minha vida e à pequena “*princesa*” Emma, cujo sorriso vale mais que tudo.

Resumo

A Engenharia de Tecidos, um campo do saber em grande crescimento, tem vindo a dar contributos de grande valor na área da Medicina Regenerativa, visando substituir tecidos humanos e promover a sua regeneração. Uma das estratégias mais utilizadas atualmente é a aplicação de *scaffolds*.

A característica mais importante de um material para este tipo de aplicações é a biocompatibilidade, capacidade de um material ser compatível com tecidos vivos, em particular, o corpo humano. Materiais biocompatíveis são desenvolvidos especificamente em função da aplicação a que se destinam, tendo de obedecer a um amplo espectro de parâmetros. Os *scaffolds* estudados neste trabalho foram produzidos usando um processo de fabricação aditiva, através de uma bioextrusora desenvolvida pelo Instituto Politécnico de Leiria. A poli(caprolactona) foi o material base utilizado, sozinho ou combinado com hidroxiapatite, em duas percentagens diferentes (10 e 25%), de origem natural ou sintética, e cuja adição visa potenciar a bioatividade do biomaterial e reforçar a estrutura.

O objetivo principal deste trabalho é comparar a esterilização por radiação gama de *scaffolds* para regeneração óssea com a esterilização por óxido de etileno, o método mais utilizado para material médico. Com este intuito, foi testado o seu comportamento biológico através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A esterilização por radiação gama foi efetuada pelo Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares do Instituto Superior Técnico de Lisboa, tendo sido usada uma dose média de aproximadamente 25 kGy. Já a esterilização por óxido etileno foi feita no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, de acordo com o protocolo de rotina para material cirúrgico.

Os ensaios *in vitro* foram realizados com fibroblastos, macrófagos e sua co-cultura, para tentar avaliar a citotoxicidade dos *scaffolds* e a proliferação celular. Os fibroblastos foram desenvolvidos a partir da polpa e papila apical de dentes jovens, através de uma colaboração com a área de Endodontia do Departamento de Medicina Dentária, da

Faculdade de Medicina da Faculdade de Coimbra. Usaram-se macrófagos peritoneais de rato, colhidos pela equipa, uma vez que possuem características muito semelhantes aos macrófagos humanos.

Para avaliar o desempenho dos *scaffolds in vitro*, utilizou-se o MTT (brometo de 3-(4,5,-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazólio), um método colorimétrico que permite avaliar a funcionalidade mitocondrial através da sua redução por enzimas da cadeia respiratória celular; ensaio de exclusão do azul de Tripano avalia a proliferação celular e a integridade da membrana plasmática. Pode-se concluir que os testes *in vitro* precisam de um maior número de amostras para serem mais conclusivos, sendo que a tendência mais evidente é a de que a esterilização por radiação gama parece ser benéfica para a cultura de macrófagos aos 3 dias. Observa-se que os fibroblastos têm uma influência muito mais vinculada nos resultados obtidos para a co-cultura.

Foram também realizadas experiências *in vivo*, usando ratos *Wistar* (modelo animal escolhido). Foram implantadas cirurgicamente pequenas amostras dos *scaffolds* no dorso dos animais, de modo a avaliar o seu comportamento biológico. No decorrer das experiências foram cumpridas todas as normas nacionais e internacionais de experimentação animal. Nem sempre se confirmam, para os ensaios *in vivo*, os bons resultados obtidos *in vitro* para alguns dos *scaffolds*. A complexidade de um organismo vivo torna difícil prever o seu comportamento face aos *scaffolds* implantados. Contudo, na maior parte dos casos, os *scaffolds* mais promissores cumpriram com as expectativas. Pode ser observada uma boa adaptação dos tecidos aos *scaffolds*, ou seja, o modelo *in vivo*, é um bom prolongamento do estudo *in vitro*, dado o local de implantação (subcutâneo). Não foi possível testar os *scaffolds* em conjunto com células produtoras de osso em monocultura e cultura acoplada nos ensaios *in vitro*, se assim fosse, poder-se-iam obter previsões mais acertadas relativamente ao sucesso de cada *scaffold in vivo*.

Em suma, conclui-se que não devem ser desconsideradas formulações com base apenas nos resultados *in vitro* obtidos. Será sempre importante continuar a expandir a estatística dos ensaios *in vitro*. Tudo fica em aberto para futuros ensaios incluindo células produtoras de osso, isoladas e combinadas com os tipos celulares já testados.

Palavras-chave: Engenharia de Tecidos, *Scaffold*, Macrófago, Fibroblasto, Radiação Gama.

Abstract

Tissue Engineering, a rapidly growing field of knowledge, has been giving great contributions to the area of Regenerative Medicine. Aiming to replace human tissues and promote their regeneration, nowadays one of the most commonly used strategies is the use of *scaffolds*.

The most important feature for a material with this type of applications is its biocompatibility, the material's ability to be compatible with living tissues, especially the human body. Biocompatible materials are developed specifically for an intended application, and have to comply with a wide variety of parameters.

The *scaffolds* were produced using an additive manufacturing process with a bio-extruder, developed by the *Instituto Politécnico de Leiria*. Poly(caprolactone) was the base material, used alone or combined with hydroxyapatite in two different percentages (10 and 25%), of natural and synthetic nature. The addition of hydroxyapatite intends to enhance the bioactivity of the biomaterial and to reinforce the structure.

The main goal of this work is to compare the sterilization of *scaffolds* for bone regeneration by gamma radiation versus ethylene oxide sterilization, the most widely used method for medical material. To this purpose, their biological behavior has been tested through *in vitro* and *in vivo* assays. The cytotoxicity and cell proliferation of isolated macrophages, fibroblasts, and their co-culture has been evaluated.

Sterilization by gamma radiation was performed in collaboration with the *Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares do Instituto Superior Técnico de Lisboa*. An average dose of approximately 25 kGy was used. The ethylene oxide sterilization was performed at the Hospital and University Center of Coimbra, according to their routine protocol for surgical material.

The assays were performed with fibroblasts, macrophages and their co-culture. Fibroblasts were developed from dental pulp and apical papilla of immature teeth, obtained through a collaboration with Endodontics of the Dentistry Department of the

Medical School of the University of Coimbra Peritoneal rat macrophages were collected by the team, as the present similar characteristics to human macrophages.

MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyl-tetrazolium bromide) was the chosen method to evaluate the biological performance of scaffolds; this colorimetric assay enables the cell proliferation evaluation by direct absorbance comparison, while the trypan blue exclusion test evaluates cellular proliferation and plasmatic membrane integrity.

It is important to enlarge the in vitro sample in order to have stronger results. Nevertheless, there is a tendency for macrophages to have better results with the ethylene oxide sterilization at 3 days, Fibroblasts have a stronger influence over the results than macrophages when in co-culture.

Wistar rats have been used for an experimental animal model. Small selected scaffold samples have been surgically implanted inside subcutaneous pouches, aiming to evaluate their biological behavior. The experiment has been done accordingly to national and international legislation for animal research.

It can be concluded that in vitro tests require a larger number of samples to be more conclusive, with the most evident tendency being that gamma-sterilization is beneficial to the macrophage culture at 3 days. In vivo studies do not always allow to confirm the good in vitro results. The complexity of a living organism hinders to preview the behavior of an implanted scaffold. However, in most cases, the most promising ones full filled the expectations. A good fitting to the scaffold can be observed, meaning that the in vivo model is a good extension of the in vitro study, given the site of implantation. It has not yet been possible to test in vitro bone producing cells, alone and combined with macrophages and fibroblasts. This would most probably enable to obtain more accurate predictions regarding the success of each scaffold in vivo.

In conclusion, it can be concluded that formulations based upon the in vitro results obtained should not be disregarded. It will always be important to continue to expand the statistics of in vitro trials. Everything remains open for future trials including bone-producing cells, isolated and combined with the cell types already tested.

Keywords: Tissue Engineering, *Scaffold*, Macrophage, Fibroblast, Gamma Radiation.

Índice

Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Quadros.....	xvii
Glossário.....	xix
1. INTRODUÇÃO geral.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Estrutura.....	3
2. Fundamentos teóricos.....	5
2.1. Engenharia de Tecidos.....	5
2.1.1. <i>Scaffolds</i>	6
2.1.2. Outras estratégias.....	8
2.2. Células.....	9
2.2.1. Fibroblastos.....	9
2.2.2. Macrófagos.....	10
2.2.3. Dente.....	11
2.2.4. Osso.....	13
2.2.5. Modelo Animal.....	14
2.2.6. Técnica histológica.....	15
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Materiais utilizados na produção dos <i>scaffolds</i>	17
3.1.1. Poli(caprolactona).....	17
3.1.2. Hidroxiapatite.....	18
3.2. Obtenção das células pretendidas.....	19
3.2.1. Macrófagos.....	19
3.2.2. Fibroblastos.....	24
3.2.3. Osteoblastos e células do osteossarcoma.....	25
3.3. Produção dos <i>Scaffolds</i>	28
3.4. Esterilização dos <i>Scaffolds</i>	30
3.4.1. Óxido de Etileno.....	31
3.4.2. Radiação Gama.....	32
3.5. Estudos <i>in vitro</i>	33
3.5.1. Métodos de trabalho.....	33
3.5.2. Teste do MTT.....	35
3.6. Estudos <i>in vivo</i>	37
3.7. Estudos histológicos.....	38
4. Análise de Resultados.....	45
4.1. <i>In vitro</i>	45

4.1.1.	Monocultura de Fibroblastos.....	46
4.1.2.	Monocultura de Macrófagos.....	49
4.1.3.	Co-Cultura.....	51
4.2.	<i>In vivo</i>	54
4.2.1.	Controlo.....	55
4.2.2.	<i>Scaffold</i> PCL + HAS(25%) – 300µm – 45°	56
4.2.3.	<i>Scaffold</i> PCL + HAS(10%) – 300µm – 90°	58
4.2.4.	<i>Scaffold</i> PCL + HAS(25%) – 600µm – 45°	60
4.2.5.	<i>Scaffold</i> PCL – 600µm – 90°	62
4.2.6.	<i>Scaffold</i> PCL + HAN(25%) – 300µm – 90°	64
4.2.7.	<i>Scaffold</i> PCL + HAS(10%) – 300µm – 45°	66
4.2.8.	<i>Scaffold</i> PCL + HAN(25%) – 600µm – 90°	68
4.2.9.	<i>Scaffold</i> PCL + HAS(25%) – 600µm – 90°	70
4.2.10.	<i>Scaffold</i> PCL + HAS(25%) – 300µm – 90°	72
5.	Considerações Finais	75
5.1.	Conclusões	75
5.2.	Perspetivas Futuras.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	ANEXO A - Estatística.....	83
	ANEXO B – Relatório do Efeito da Radiação Gama nos Scaffolds	89
	ANEXO C – Relatório do CTN.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Fibroblastos corados pelo MTT, observados no MOCF (200x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.....	9
Figura 2 –Macrófagos observados ao MOCF (100x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.	10
Figura 3 – Co-cultura corada com MTT ao MOCF (100x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.....	11
Figura 4 - Esquema de corte de um dente molar, identificando as estruturas e tecidos de acordo com o nível anatómico (adaptada de [11]).	13
Figura 5 – Reação de produção da PCL (retirado de [24]).	17
Figura 6 – Estrutura da Hidroxiapatite (retirado de [25])	18
Figura 7 – À esquerda: esquema de Câmara de Neubauer (retirado de []). À direita: imagem obtida por MOCF a 100x, utilizando câmara de Neubauer, foto do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.....	23
Figura 8 – Bioextrusora do CDRSP – IPL (retirado de [34])	28
Figura 9 – Foto da Câmara PRECISA22, à esquerda. Foto das amostras dentro da câmara.	32
Figura 10 – Caixas de 48 poços após realização do MTT, onde podemos ver as diferentes tonalidades, à esquerda temos os poços com os <i>scaffolds</i> e o MTT e à direita temos os poços já sem líquido.....	36
Figura 11 - Equipamento para ler testes de ELISA.	36
Figura 12 – Esquema anatómico de um rato Wistar (retirado de [20]).	37
Figura 13 - Tricotomia realizada no dorso do rato, em áreas específicas para posterior implantação subcutânea do <i>scaffold</i>	39
Figura 14 - Esquema de colheita dos <i>scaffolds</i> no rato realizados nos estudos <i>in vivo</i> : (a) controlo (corte sem colocação de material); (b) <i>scaffold</i> esterilizado por óxido de etileno; (c) <i>scaffold</i> esterilizado por radiação gama.	40
Figura 15 - Cassete de fixação utilizada para os estudos histológicos (PrintMate™ Embedding Cassettes, A84810048).	42
Figura 16 – Imagem do <i>Scaffold</i> PCL + HAN(10%) - 300µm - 45° obtida com lupa ótica e ampliação 5,5x, onde se podem ver: (a) folículos pilosos, (b) fibras de colagénio, (c) base das glândulas sebáceas, (d) tecido celular subcutâneo e (e) miofibras.	55
Figura 17 – Imagem do <i>scaffold</i> PCL + HAS(25%) – 300µm – 45° obtida ao microscópio ótico com ampliação 40x, em que são visíveis (e) miofibras, (f) fibrose, (g) depósitos de hidroxiapatite, (h) tecido conjuntivo que invadiu o <i>scaffold</i> , (i) vasos sanguíneos e (j) zona previamente ocupada pela PCL do <i>scaffold</i> . Nota-se a presença de infiltrado inflamatório mas em quantidade reduzida.....	56

- Figura 18 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 300µm – 45° obtida por microscópio óptico com ampliação 20x, em que se podem observar (a) folículos pilosos, (b) fibras de colagénio, (c) glândulas associadas aos folículos, (d) tecido celular subcutâneo, (e) miofibras, (f) fibrose com algum infiltrado inflamatório, (g) depósito de hidroxiapatite, (h) tecido conjuntivo que invadiu o *scaffold*, (i) vasos sanguíneos e (j) zona previamente ocupada pela PCL do *scaffold*.57
- Figura 19 - Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300µm – 90° obtida ao microscópio óptico com ampliação de 40x onde são evidentes (a) espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo, (d) vaso sanguíneo, (e) tecido celular subcutâneo invasor, (f) fibrose com algum infiltrado inflamatório. ...58
- Figura 20 - Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300µm – 90° obtida com microscópio óptico e ampliação 20x, em que estão presentes (a) espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor, (d) vaso sanguíneo, (e) fibrose com mais infiltrado inflamatório.59
- Figura 21 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 600µm – 45° obtida com microscópio óptico a 20x em que se pode observar (a) espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor, (d) vasos sanguíneos, (e) fibrose afastada do *scaffolds* com pouco infiltrado inflamatório, (f) miofibrilas a invadir a zona do *scaffold*.60
- Figura 22 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 600µm – 45° obtida através de microscópio óptico com ampliação 20x em que se observa (a) espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor, (d) vaso sanguíneo, (e) fibrose muito próxima da zona com bastante infiltrado inflamatório. ...61
- Figura 23 - Imagem do *scaffold* PCL – 600µm – 90° obtida com microscópio óptico a 40x em que se observa (a) espaço deixado livre pelo *scaffold* (só PCL), (b) tecido invasor com bastante infiltrado inflamatório e (c) zona de fibrose com algum infiltrado.62
- Figura 24 - Imagem do *scaffold* PCL – 600µm – 90° obtida ao microscópio óptico a 40x em que se nota (a) espaço deixado vago pela PCL, (b) tecido conjuntivo que invadiu o *scaffold* e (c) fibrose associada à implantação.63
- Figura 25 - Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 300µm – 90° obtida por microscópio óptico a 40x em que se vê (a) espaço deixado livre pela PCL do *scaffold*, (b) tecido conjuntivo invasor, (c) zona de fibrose.64
- Figura 26 – Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 300µm – 90° obtida com microscópio óptico a 40x em que se pode observar (a) espaço deixado livre pela PCL do *scaffold*, (b) tecido conjuntivo invasor, (c) depósitos de hidroxiapatite e (d) fibrose com infiltrado inflamatório.65
- Figura 27 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300µm – 45° obtida por microscópio óptico a 40x em que se observa (a) espaço deixado livre pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo que invadiu e contém infiltrado, (d) zona de fibrose circundante.66
- Figura 28 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300µm – 45° obtida com microscópio óptico a 40x com (a) espaço deixado livre pelo *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor e acima de (d) o início da zona de fibrose com bastante infiltrado inflamatório.67

-
- Figura 29 – Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 600 μ m – 90° obtida com microscópio ótico a 20x em que se pode observar (a) fibras de colagénio, (b) miofibras algo desorganizadas, (c) zona onde estaria o *scaffold* e (d) vaso sanguíneo.....68
- Figura 30 – Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 600 μ m – 90 obtida com microscópio ótico a 40x em que se observa (a) espaço deixado pela PCL, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor com bastante infiltrado inflamatório e (d) fibrose circundante com inflamatório.....69
- Figura 31 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 600 μ m – 90° obtida com microscópio ótico e ampliação 20x onde se observa (a) espaço deixado vago pela PCL, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor com infiltrado inflamatório, (d) miofibras e (e) tecido celular subcutâneo.....70
- Figura 32 - Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 600 μ m – 90° obtida por microscopia ótica a 20x em que se observa (a) espaço deixado vago pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor e (d) zona de fibrosa, em que acima podemos ver bastante infiltrado inflamatório.....71
- Figura 33 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 300 μ m – 90° obtida por microscópio ótico a 20x onde se observa (a) espaço deixado vago pela PCL, (b) grandes depósitos de hidroxiapatite e (c) tecido conjuntivo que estaria a tentar invadir.....72
- Figura 34 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 300 μ m – 90° obtida por microscópio ótico a 20x em que se observa (a) espaço deixado livre pela PCL, (b) grande depósito de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor com bastante infiltrado inflamatório e (d) zona de fibrose com bastante infiltrado também.....73

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Quadro de apresentação das 20 diferentes formulações dos <i>scaffolds</i> estudados.	29
Quadro 2 – Quadro de comparação percentual entre tipos de esterilização para fibroblastos.	46
Quadro 3 – Quadro de comparação percentual entre tipos de esterilização para macrófagos.	49
Quadro 4 – Quadro de comparação percentual entre tipos de esterilização para co-cultura.	51

GLOSSÁRIO

Acrónimo	Significado
CHUC	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
CTN	Campus Tecnológico Nuclear
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
DPSC	Células estaminais da polpa dentária
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESB	Sociedade Europeia de Biomateriais
FBS	soro fetal bovino
FD	Centros de filamentos
FG	Espaçamento entre filamentos ou dimensão do poro
FTIR-ATR	Espectro de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatite
Ig M	Imunoglobulina M
IPL	Instituto Politécnico de Leiria
LG	Espaçamento entre camadas
MOCF	Microscópio ótico de contraste de fase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Ob	Osteoblasto
OE	Óxido de Etileno
Ot	Osteóide
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Poli(caprolactona)
PGA	Ácido poliglicólico

PLGA	Ácido poli-DL-lático-co-glicólico
rpm	rotações por minuto
RPMI	<i>“Roswell Park Memorial Institute”</i>
RW	Diferença entre diâmetro de filamentos
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
ST	Espaçamento entre camadas que constituem a peça
U.V.	Radiação Ultravioleta
γ	Radiação Gama

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Introdução

Os biomateriais são dos elementos mais importantes a nível da Engenharia de Tecidos já que, como o próprio nome indica, permitem uma boa implementação em organismos vivos. Esta particularidade deve-se às suas propriedades a nível físico e químico, que se adequam à aplicação em causa. A principal característica necessária é a biocompatibilidade [1].

Os maiores avanços na Medicina Dentária estão interligados ao início dos implantes osteointegrados. Estes implantes constituem uma solução duradoura, mais confortável e menos lesiva quando comparada com técnicas usadas anteriormente, como por exemplo as próteses. Apesar dos custos associados, a comunidade medico-científica tem publicado muitos artigos relatando altos níveis de sucesso no tratamento com implantes dentários. Tal como noutro tratamento médico, o seu sucesso depende de vários fatores, nomeadamente as características anatómicas e fisiológicas de cada doente, dos seus hábitos de higiene oral e hábitos tabágicos, da presença de patologias concomitantes (por ex: diabetes não controlada), de terapêuticas agudas/crónicas instituídas, etc..

Apesar da evolução da técnica nem sempre é possível substituir as raízes dentárias ausentes por implantes. A indicação de implantes osteointegrados requer uma análise cuidadosa de vários fatores, de que se destacam a análise da quantidade e da qualidade do volume do osso alveolar no leito receptor e a proximidade de outras estruturas anatómicas, tal como o seio maxilar, que podem dificultar ou mesmo impedir a utilização dos implantes. A qualidade e a quantidade de osso disponível são fatores determinantes no planeamento da reabilitação com implantes, sendo, por isso, indicada a cirurgia oral reconstrutiva para aumentar o volume de tecido ósseo antes da implantação.

Embora existiam algumas técnicas que permitem esta reconstrução, vários estudos têm sido efetuados para encontrar o melhor método para recriar osso no maxilar

e/ou na mandíbula. Este é o fator impulsionador do projeto de investigação em que esta dissertação se integra: a partir da Engenharia de Tecidos pretende-se desenvolver uma metodologia que permita avaliar o desempenho biológico de diferentes *scaffolds* na integração/regeneração óssea, em particular, da mandíbula e do maxilar.

Uma vez que os *scaffolds* foram desenhados para ser implantados *in vivo*, a esterilização é um processo imprescindível para evitar a transmissão e desenvolvimento de microrganismos.

1.2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é comparar a esterilização de *scaffolds* para regeneração óssea por radiação gama, com a esterilização por óxido de etileno, o método mais utilizado para material médico [2].

Neste sentido foi avaliado o comportamento biológico dos *scaffolds* através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, assim poderemos ter uma melhor ideia da validade da sua utilização. Estes testes permitem testar a sua citotoxicidade e a proliferação celular.

Os *scaffolds* foram produzidos com materiais que provoquem a resposta mais neutra possível a nível imunitário, ao mesmo tempo que devem induzir osteogénese nos locais intervencionados. A sua produção foi variada de forma a obter diferentes combinações de PCL e hidroxiapatite, assim como, diferentes porosidades, variando a espessura e geometria dos filamentos.

In vitro foram usados macrófagos, fibroblastos e ambos os tipos celulares, em co-cultura. Os macrófagos foram colhidos a partir de ratos *Wistar* por lavagem da cavidade peritoneal (macrófagos peritoneais) e os fibroblastos foram desenvolvidos a partir de células estaminais mesenquimais da polpa ou papila apical de dentes humanos (imaturos). As células foram semeadas sobre os *scaffolds* em ambiente controlado, colocando-se as caixas de cultura na estufa. Os estudos incidiram em diferentes períodos de tempo, adequados a cada tipo celular, para avaliar a sua resposta. A viabilidade celular foi avaliada usando o teste do MTT.

In vivo, foram implantadas pequenas amostras de algumas formulações dos *scaffolds* produzidas no dorso de ratos *Wistar*, de modo a tentar perceber o comportamento de um organismo vivo devido à sua presença. Estes testes tornaram possível examinar, após a extração dos pedaços de *scaffolds*, o tipo de reação do organismo ao material. Com este intuito, as amostras recolhidas (*scaffolds* com tecido circundante) foram processadas para técnica histológica de rotina e os cortes histológicos foram examinados à lupa e ao microscópio ótico. As imagens obtidas possibilitam uma análise do nível de biocompatibilidade das formulações e, principalmente de cada método de esterilização utilizado – óxido etileno e radiação gama.

1.3. Estrutura

A dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos, cada um com o seu tipo de conteúdo. O primeiro capítulo (Introdução Geral) consiste na apresentação do trabalho a realizar, assim como dos seus objetivos, e na explicação a estrutura da dissertação. No segundo capítulo (Fundamentos Teóricos) faz-se uma introdução dos conceitos cuja compreensão é importante para um correto entendimento do trabalho realizado. De seguida, vem o capítulo Materiais e Métodos, em que, como o nome indica, são descritos os materiais utilizados e apresentados os métodos experimentais. O quarto capítulo (Análise de Resultados) apresenta os resultados obtidos, sendo estes explicados e discutidos. No último capítulo (Conclusão), são retiradas as conclusões possíveis de alcançar através dos dados obtidos e são discutidas perspetivas futuras.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Ao longo da dissertação serão apresentados e descritos vários conceitos e técnicas essenciais para a prossecução do trabalho. Como tal, tendo em vista tornar mais fácil a leitura e compreensão do que se seguirá, neste capítulo serão abordados a engenharia de tecidos e os biomateriais mais utilizados, a caracterização dos tipos de células que fizeram parte dos ensaios *in vitro*, o modelo animal escolhido – o rato *Wistar* – para os ensaios *in vivo* e a técnica histológica.

2.1. Engenharia de Tecidos

Como sabemos o corpo humano é um sistema de enorme complexidade que se encontra em constante equilíbrio, mas a complexidade desse equilíbrio faz com que haja muitas pequenas partes que, por defeito, desgaste ou intervenção externa, podem falhar. Nessas situações pode recorrer-se a uma área da Bioengenharia denominada Engenharia de Tecidos.

Este campo do saber é de vital importância para vários procedimentos relativos à utilização de próteses, realização de transplantes e diversas intervenções cirúrgicas. Com as constantes inovações nesta área tenta-se minimizar situações problemáticas neste tipo de procedimentos, como reações autoimunes e melhor integração nos materiais biológicos [3].

As técnicas e os seus produtos devem compreender várias características que lhes permitam adequar-se à diversidade e especificidade das suas aplicações. Existem várias abordagens para os diferentes problemas que se podem dividir em grupos, para melhor serem caracterizadas.

2.1.1. Scaffolds

Os *scaffolds* são a abordagem que será descrita com mais pormenor já que é foi na sua aplicação que os ensaios laboratoriais se focaram. Trata-se de estruturas tridimensionais que vão servir de suporte e se pretende que sejam integrados nos tecidos vivos durante o tempo necessário e que, no final do processo, sejam por eles substituídos. Devido à sua aplicação em contato com o organismo têm de possuir diversas características específicas. As de maior importância são as propriedades mecânicas, a estrutura, a superfície, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e, nesta situação em particular, a sua osteoindutividade e osteocondutividade [4].

2.1.1.1. Propriedades mecânicas

De acordo com o local de implantação e a sua função o *scaffolds* terá de ser construindo de forma e com materiais que lhe permitam corresponder a determinadas exigências mecânicas. Para a substituição óssea é necessário que a estrutura consiga suportar, pelo menos, as tensões que o osso em questão suportaria, precisando para tal de ter uma certa rigidez e flexibilidade. Este delicado equilíbrio tende a ser difícil de atingir, exigindo numerosos ensaios [5].

2.1.1.2. Estrutura

Estruturalmente devem ser satisfeitos vários requisitos, sendo o mais determinante a porosidade, que, sem comprometer a integridade estrutural, deve permitir a migração e proliferação celular (osteoblastos e células mesenquimais), assim como deposição matricial (essencialmente colagénio depositado pelas células), necessárias a uma correta integração *in vivo*. Esta porosidade é também necessária para uma vascularização da zona intervencionada, permitindo, assim, o aporte de oxigénio e todos os outros nutrientes vitais, bem como a eliminação de resíduos. Os poros devem estar interligados para permitir o estabelecimento de uma rede de comunicação no *scaffold*. O

seu tamanho poderá variar consoante o tipo de células, já que algumas aderem com maior facilidade em poros mais pequenos, enquanto outros tipos preferem poros de maior diâmetro. A parte mais delicada é conseguir elevados níveis de porosidade (percentagem de espaços vazios num corpo sólido) para que tudo o que se pretende, e já exposto, aconteça sem comprometer a integridade da estrutura [5].

2.1.1.3. Superfície

Para esta aplicação em particular, a adesão celular à superfície tem de ocorrer, logo as características superficiais do material têm de potenciar este mecanismo. Para que tal aconteça muitas vezes é necessário recorrer a técnicas de modificação da superfície [5].

2.1.1.4. Biocompatibilidade

O material tem de ser bem aceite pelo organismo, de outra forma poderia ocorrer uma resposta inflamatória que resultaria na perda de função ou mesmo rejeição. A adesão e proliferação celular têm de ocorrer para que o *scaffold* seja funcional. De forma alguma o implante pode ser reconhecido pelo organismo como um objeto estranho, tal resultaria em fibrose e possível encapsulamento do implante ou mesmo expulsão, dependendo da profundidade. As trocas e funções celulares devem ocorrer o mais próximo possível do que se verifica no tecido original. Este parâmetro impõe uma escolha cuidadosa do material a utilizar [5].

2.1.1.5. Biodegradabilidade

O organismo deve conseguir degradar o material como se tratasse de constituinte intrínseco. Esta biodegradabilidade deve ser um processo com duração controlada, para permitir a regeneração por parte do próprio tecido alvo do procedimento. Os produtos desta desintegração não podem ser tóxicos nem interferir com o funcionamento futuro do tecido nem dos circundantes [5].

2.1.1.6. Osteindutividade

Esta é também uma característica vital para um *scaffold* ter sucesso na sua aplicação. Neste caso, tratando-se de osso este deve potenciar os vários processos que culminam na formação de novo osso e manutenção do circundante, permitindo adesão, proliferação e diferenciação celular no tecido em questão, tal como formar matriz extracelular. Uma parte importante nestes processos é a vascularização cujo suporte deve assegurar, assim como induzir, a formação de osso por transmissão de sinalizadores e recrutamento de células estaminais [5].

2.1.2. Outras estratégias

É importante apresentar outras estratégias existentes no campo da Engenharia de Tecidos (ET). As mais importantes são o uso de: fatores de crescimento, células isoladas e matriz extracelular.

Os fatores de crescimento celular, por exemplo VEGF (*vascular endothelial growth factor*), FGF (*fibroblast growth factors*), superfamília de TNF (*tumor necrosis factor*), PRP (*platelet rich plasma*), etc., potenciam a ocorrência de vários comportamentos a nível celular, podendo ser aplicados por sistemas de libertação controlada (semelhante ao que utiliza na libertação de fármacos). Estes fatores atuam sobre moléculas específicas em cada caso permitindo, assim, ter algum controlo sobre o que vai acontecer com determinada célula [6].

Com a aplicação de células isoladas podem evitar-se algumas complicações relacionadas com procedimentos cirúrgicos, mas fica-se algo exposto à ação imunológica, que poderá diminuir a função das células (implantadas diretamente *in vivo*) ou, na pior das hipóteses, rejeitá-las por completo [7].

No caso da matriz extracelular pretende-se, igualmente, influenciar o comportamento de determinadas células através da alteração do meio que as rodeia e, assim, potenciar comportamentos específicos por parte destas [8].

2.2. Células

Nos ensaios laboratoriais *in vitro* realizados ao longo do trabalho foram utilizados diferentes tipos celulares que devem ser também abordados neste capítulo. Os estudos tiveram como objetivo avaliar a citotoxicidade dos materiais usados e a proliferação celular ocorrida com as diferentes formulações utilizadas. Com este intuito, foram utilizados macrófagos e fibroblastos, cuja funcionalidade é muito importante em situações de regeneração óssea. Tentou ainda fazer-se a diferenciação de células estaminais de polpa dentária em células produtoras de osso.

2.2.1. Fibroblastos

O tecido conjuntivo a nível celular é constituído essencialmente por fibroblastos (Figura 1). Estas células têm várias funções relevantes: produzem fatores de crescimento, produzem e regulam a matriz extracelular e são responsáveis pela síntese de vários tipos de fibras [9].

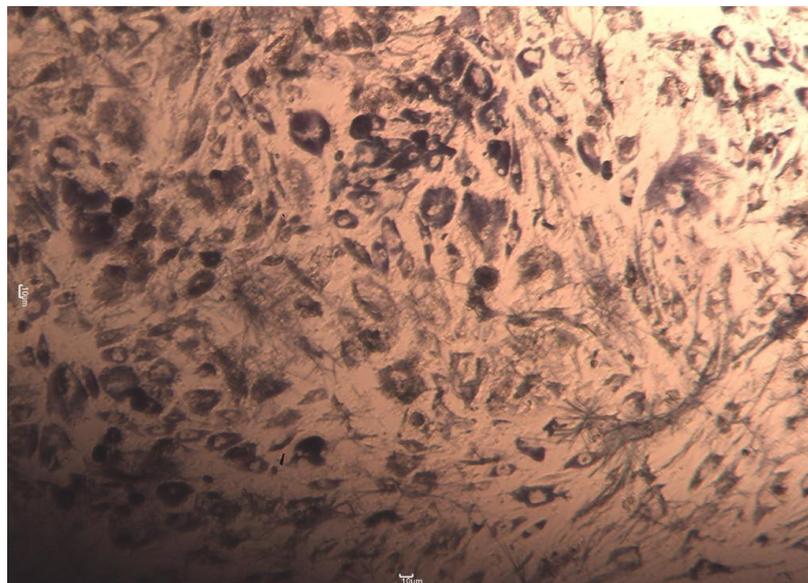


Figura 1 – Fibroblastos corados pelo MTT, observados no MOCF (200x).
Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.

Os fatores de crescimento têm interferência direta no metabolismo celular, controlando o comportamento das células, através da regulação da sua diferenciação e crescimento. Estas substâncias influenciam também o crescimento de outras células [9].

Relativamente à sua ação sobre a matriz extracelular, promovem a síntese de diversos componentes, tais como várias fibras, nomeadamente colagénio e proteoglicanos, assim como glicoproteínas. Têm ainda a capacidade de digerir a matriz extracelular, ou parte dos seus componentes de forma a reciclá-la. É-lhes, assim, possível controlar quer a composição que a quantidade de matriz presente no local alvo do procedimento [10].

A ação destas células não se faz sentir, de uma forma particularmente evidente, nos primeiros dias, após uma intervenção, mas sim numa fase seguinte, procedendo à regeneração propriamente dita. [9]

2.2.2. Macrófagos

Os macrófagos são células envolvidas na resposta imunitária, migrando para os locais onde a resposta, e, conseqüentemente, a sua ação, sejam necessárias. Chegam ao local através dos vasos sanguíneos e, chegados ao tecido conjuntivo, denominam-se monócitos, que se diferenciam então em macrófagos [11].

Estas células são muito utilizadas em ensaios *in vitro*, pois são relativamente fáceis de obter e têm várias funções muito relevantes para vários tipos de trabalhos laboratoriais (Figura 2).



Figura 2—Macrófagos observados ao MOCF (100x).
Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.

No organismo constituem a primeira resposta a um agente detetado, iniciando o seu combate e sinalizando o agente alvo para outras células com diferentes funções na resposta inflamatória, regulando ainda a sua atuação [12]. Interagem ainda com outras células dos tecidos circundantes, tais como os fibroblastos, as células principais do tecido conjuntivo (Figura 3).

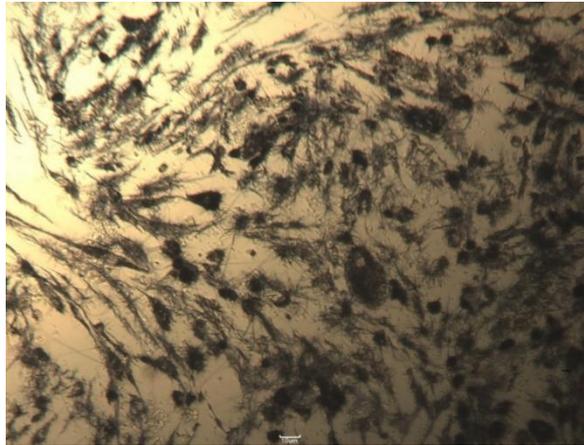


Figura 3 - Co-cultura corada com MTT ao MOCF (100x).
Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.

2.2.3. Dente

O dente deve também ser abordado neste capítulo, já que está diretamente relacionado com a aplicação dos *scaffolds* em estudo, além de ter sido também a fonte dos fibroblastos obtidos para a realização dos ensaios *in vitro*. O objetivo dos *scaffolds* não é substituir o dente propriamente dito mas sim permitir uma melhor regeneração a nível ósseo das zonas onde se insere – mandíbula ou maxilar – já que estas estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento, funcionamento e manutenção dentários.

2.2.3.1. Funções do dente

A dentição humana tem como funções principais ajudar na mastigação, proteger e dar suporte aos tecidos moles, obter uma boa estética facial, contribuem para uma boa função respiratória e fonadora. O dente aloja-se no alvéolo dentário, sendo ancorado por Fibras colagénicas que constituem o ligamento periodontal. Este ligamento

tem de conseguir resistir a todas as forças e tensões a que o dente está sujeito durante o ato de mastigar, deglutir, falar e respirar [13].

2.2.3.2. Anatomia do dente

O dente é composto por 4 diferentes tipos de tecido: polpa, dentina, esmalte e cimento, dispostos em camadas por uma ordem e localização muito específicas (Figura 4).

A polpa é um tecido mole e constitui a parte orgânica do dente, localizada no interior da câmara pulpar. É neste tecido que se encontram as células estaminais do dente, fibroblastos e odontoblastos, assim como vasos sanguíneos e nervos. É a parte “viva” do dente e que dói pela presença de nociceptores (recetores de dor). Os odontoblastos permitem a produção de polpa dentária e, assim, a sua renovação [14].

A revestir a polpa, encontra-se a dentina, uma camada mais rígida, que encapsula a polpa na coroa dentária. Na continuação da dentina, mas no sentido descendente para a raiz, existe o cimento (parte mais externa do dente na raiz). Uma vez que a raiz se encontra dentro do alvéolo dentário e está recoberto pela gengiva, não é suposto ser exposto [14].

Já na coroa dentária existe o esmalte, a camada exterior, que está em contato direto com a cavidade oral, sendo responsável pela resistência propriamente dita do dente à mastigação e outros movimentos dentários. É um tecido de grande dureza, sendo mesmo o mais duro do corpo humano. Além disso tem de estar adequado às condições intraorais de pH e ataque microbiano [13].

Os tecidos descritos organizam-se para formar as 2 principais zonas do dente: a coroa e a raiz. A porção intra oral visível da parte externa do dente é designada coroa, isto é, aquela que se vê e que apresenta formatos variados consoante cada tipo de dente, de acordo com a sua função [15].

A porção inferior, denominada raiz, permite a ancoragem do dente no osso alveolar, a sua nutrição e dá suporte ao dente. Os dentes centrais e laterais, respetivamente, incisivos e caninos têm apenas uma raiz. Para posterior os dentes pré-

molares têm duas raízes e os molares podem ter três, quatro ou até mais raízes. A união das duas porções é feita através da linha cervical, como se vê na Figura 4 (adaptada de [16]).

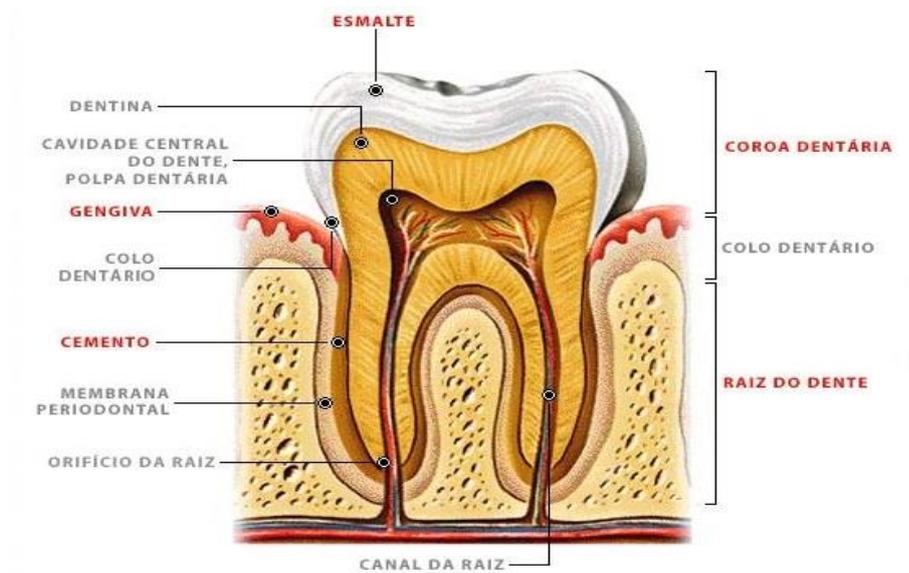


Figura 4 - Esquema de corte de um dente molar, identificando as estruturas e tecidos de acordo com o nível anatômico (adaptada de [16]).

2.2.3.3. Dentes usados no trabalho

Embora existam, como já foi referido, vários tipos de dentes: incisivos, caninos, molares e pré-molares, para a obtenção dos fibroblastos utilizados nos ensaios *in vitro*, foram selecionados dentes molares jovens, extraídos por motivos ortodônticos (por exemplo dentes inclusos, falta de espaço) sem cárie e com ápex radicular recém-formado. Dentes de dentição definitiva de jovens adolescentes possuem bolsas radiculares maiores e uma quantidade ainda razoavelmente grande de polpa. Nos dentes de adultos totalmente formados, como os dentes do siso, as células estaminais que se pretendem obter, para serem diferenciadas em células produtoras de osso, já não são tão numerosas, o que reduz a eficácia do processo.

2.2.4. Osso

Importa caracterizar brevemente o tecido ósseo, já que é o alvo de substituição e promoção de regeneração em zonas lesadas, particularmente as anteriormente referidas. O tecido ósseo dá essencialmente suporte ao dente, mas, para além desta função mais

óbvia, serve como um banco de minerais, bem como fonte de células estaminais mesenquimatosas (que se podem diferenciar em osteoblastos e fibroblastos) e células responsáveis pela hematopoiese [17].

As células estaminais da papila apical (SCAP – *stem cells from apical papilla*) são células de um tecido em desenvolvimento e são mais robustas que as células estaminais da polpa dentária (DPSC – *dental pulp stem cells*) em termos de capacidade de duplicar a população, taxa de proliferação, atividade de telomerase e capacidade de migração celular. No entanto, as SCAP existem em muito menos número que a DPSC e são mais difíceis de isolar [18].

2.2.5. Modelo Animal

O rato é o modelo experimental animal mais utilizado a nível laboratorial para estudos *in vivo*. Uma das principais características que fazem com que seja o modelo animal de maior relevo é a proximidade da sua anatomofisiologia e código genético com o humano. É um animal de fácil manuseamento e manutenção em instalações dedicadas, sendo económico e reproduz-se com grande facilidade, permitindo a cada nova ninhada a obtenção de um número considerável de novos indivíduos, o que associado às razões já apresentadas torna o rato um modelo muito útil à ciência [19][20].

Os animais são mantidos em gaiolas em condições controladas de temperaturas a rondar os 24°C e humidade relativa de 70% e período de luz/escuro. As gaiolas estão inseridas num sistema constituído por um suporte e sistema de tubagem e controlo de entrada e saída de ar, permitindo manter as condições estáveis adequadas e limpas. As gaiolas são lavadas com detergentes “*foamless*”, que promovem a sua limpeza e desinfeção sem provocar lesões nos animais.

A alimentação é feita sob a forma de pepitas de ração sólida esterilizada, adequada às suas necessidades nutricionais e, na maioria dos casos, bebem água acidificada.

As instalações onde os ratos são mantidos devem ser submetidas a aprovação por parte de autoridades competentes, isto é, serem certificadas, fazendo-se controlos

posteriores para assegurar o cumprimento dos regulamentos e verificar o bem estar animal, de acordo com Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto (proteção e bem estar animal para fins de investigação) [21].

2.2.6. Técnica histológica

A técnica histológica é o conjunto de operações que tem como principal objetivo transformar células e tecidos em preparações para serem observadas ao microscópio. Neste estudo importa referir a técnica histológica de rotina para obter preparações definitivas. As etapas necessárias ocorrem em fases sucessivas de acordo com os princípios fundamentais da técnica histológica. Estas etapas incluem a fixação, desidratação, incorporação num meio adequado, seccionando em amostras mais finas para permitir a observação por transiluminação e coloração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo irão abordar-se todos os materiais e métodos utilizados neste trabalho. Inicialmente, irá abordar-se o tipo de produção dos *scaffolds* assim como os materiais utilizados e o respetivo protocolo.

3.1. Materiais utilizados na produção dos *scaffolds*

3.1.1. Poli(caprolactona)

A policaprolactona (PCL) foi um dos primeiros polímeros a ser sintetizado no início de 1930. É um polímero biodegradável com uma elevada resistência mecânica e baixa taxa de degradação. Considera-se geralmente que a degradação, resistência mecânica e biocompatibilidade da PCL proporcionam a sua utilização em aplicações na Engenharia de Tecido Ósseo [23].

Este composto é um polímero cristalino hidrofóbico. A sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento do peso molecular. Apresenta um ponto de fusão relativamente baixo (59-64°C) e uma temperatura de transição vítrea de -60°C [23]. Cada método de produção afeta o peso molecular resultante, a distribuição de peso molecular, a composição de grupo final e a estrutura química dos copolímeros [23]. É possível observar a reação de polimerização para a preparação da PCL na Figura 5 [24].

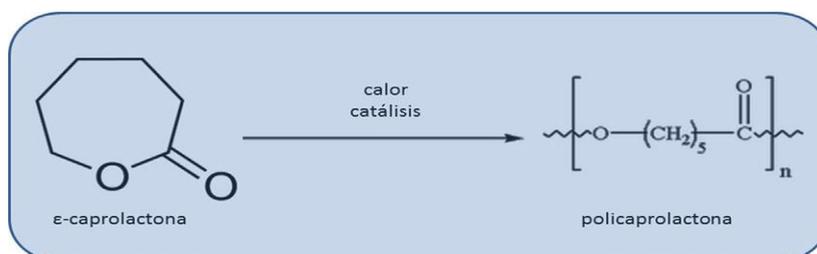


Figura 5 – Reação de produção da PCL (retirado de [24]).

A PCL utilizada [CAPA 6500 a partir de Perstorp (Reino Unido)] apresenta um peso molecular de 5×10^4 g/mol.

3.1.2. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite (HA) foi extensivamente estudada com o objetivo de se criar um material para substituição óssea, uma vez que é o componente presente em maior concentração no osso. A fórmula da HA é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$ (Figura 6 [25]) [26].

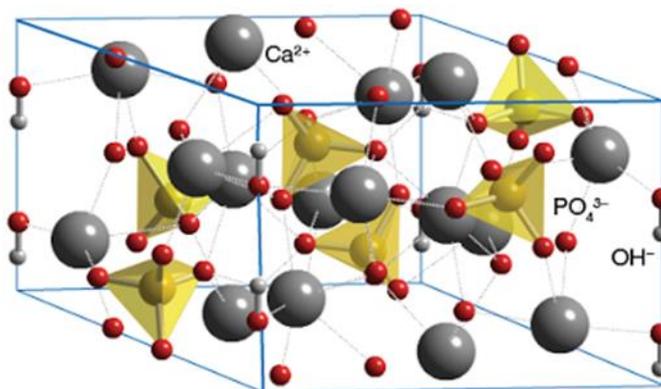


Figura 6 – Estrutura da Hidroxiapatite (retirado de [25])

Pertence à classe dos materiais biocerâmicos, apresentando uma grande osteocondutividade e biocompatibilidade, além de ser um material bioativo, uma vez que consegue criar uma ligação química de forma direta com os tecidos vivos. A HA consegue ainda induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos [27].

Existem dois tipos de HA: natural e sintética. A HA sintética é caracterizada por possuir a composição química das matérias-primas a partir das quais foi produzida. Já na HA natural não acontece o mesmo, uma vez que ela é sujeita a alterações de estrutura devido às temperaturas elevadas utilizadas com o objetivo de reduzir os riscos de transmissão de doenças [28].

Para este trabalho, a HA natural foi obtida através da calcinação de ossos de bovinos a 600°C e a HA sintética foi comprada à Altakit Company (Aveiro, Portugal), com um tamanho médio das partículas de 5 µm.

3.2. Obtenção das células pretendidas

Qualquer um dos tipos celulares utilizados neste trabalho (macrófagos peritoneais de rato, fibroblastos humanos e células osteogénicas) requerem métodos específicos para cultura *in vitro*. São mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada (95% de humidade relativa) e rica em 5% de CO₂, numa incubadora apropriada (Hera Cell 150-Thermo elétron corporation, EUA) que regularmente é revista por uma empresa certificada (Certilab: 06-10960, Portugal).

3.2.1. Macrófagos

A colheita de macrófagos humanos é obrigatoriamente feita em meio hospitalar a partir de lavados de cavidades (por exemplo: alveolares) ou cirurgias abdominais (quer por laparoscopia quer por via aberta convencional) ou ainda por centrifugação de grandes quantidades de líquidos de derrames (por exemplo: pleurais ou abdominais). Os protocolos hospitalares de rotina não preveem a recolha destes fluidos. Para este efeito é obrigatório existir um protocolo de colaboração entre a unidade hospitalar e a unidade de investigação. Este protocolo existe entre o Instituto de Biofísica e os CHUC, no entanto não é de fácil execução, pois as recolhas dependem da marcação dos procedimentos cirúrgicos e nem em todos os casos é possível a obtenção dos lavados/fluidos biológicos. Por outro lado, é necessário o consentimento informado dos doentes em tempo útil para o ensaio de investigação. Além disso, uma vez que a técnica implica a manipulação de fluídos biológicos humanos, é necessário ter extremo cuidado, pois pode haver uma contaminação biológica para o utilizador. Os doentes do foro cardio-respiratório são tipicamente submetidos a este tipo de procedimentos em situações de patologias que envolvam dificuldade respiratória. Os doentes são todos sujeitos a análises criteriosas para avaliar o estado imunológico e patologias passíveis de transmissão, mas enquanto em situações de fibrose pulmonar ou *doença pulmonar obstrutiva crónica* (DPOC), por exemplo, muito dificilmente implicam contaminação dos manipuladores; já doentes com tuberculose ou outras patologias contagiosas não. Por outro lado, dado o interesse que os serviços de Cirurgia revelaram

quando cedem estas amostras, para terem a noção da resposta dos doentes, os macrófagos deixam de poder ser utilizados em número suficiente para os ensaios de investigação. Além disso, a obtenção de um número muito menor de macrófagos em casos de menor gravidade clínica, mas muito mais correntes, também dificulta a programação e execução de estudos¹. Estudos anteriores demonstraram que usar macrófagos humanos ou de rato é indiferente nos testes de citotoxicidade de biomateriais [29].

Também foi comprovado que é indiferente usar macrófagos peritoneais de rato frescos ou congelados (-80°C pelo menos até 4 meses ou a -190°C pelo menos até 2 anos pós-congelação) [30].

Desta forma, no Instituto de Biofísica passou a fazer-se a recolha de macrófagos peritoneais de rato (*Wistar* ou RNU normais) para posteriores estudos *in vitro*, uma vez que estes têm um papel relevante na resposta imunológica inata, tal como mencionado anteriormente [30].

Inicialmente procedeu-se à ocisão do animal através do deslocamento cervical². O segundo passo consistiu em colocar o rato dentro de uma câmara de fluxo laminar (Holten Lamin Air, HB2448, Dinamarca, certificada pela Certilab) esterilizada por luz ultravioleta (U.V.). É crucial efetuar a limpeza da câmara com álcool a 75º, assim como passar (aspergir) com álcool a 75º todos os materiais utilizados dentro desta câmara, bem como os ratos no seu suporte, para realizar a colheita de células.

¹ No caso de um doente com um tumor de um órgão da cavidade abdominal a recolha proporciona muito mais células num pequeno volume de fluido de lavagem do que no caso de um doente que coloca uma banda gástrica. Por outro lado o tipo de cirurgia (laparoscópica ou convencional) fornece também um número muito diferente de células e dados não publicados de um trabalho de investigação conjunta do Instituto de Biofísica - AC Santos - e do Serviço de Cirurgia Prof. Doutor G. Tralhão.

² De acordo com o anexo II do Decreto-Lei Português nº 113/2013 [21].

Para se proceder à recolha dos macrófagos peritoneais injetaram-se cerca de 20 ml de tampão fosfato estéril³ na cavidade peritoneal, usando uma agulha 25G x 1", 0,5 × 25 mm (T.Terumo® Neolus, 25 G×5/8" 0,5×16mm NN-2516R, Bélgica), acoplada a uma seringa de 10 ou 20 ml (TSE, BD Discardit™II, 20 ml 0905, Espanha). A inserção da agulha deve realizar-se com o bisel virado para a face superior e de modo a não atingir nenhum órgão interno, para tal levanta-se uma prega de pele e parede muscular e punciona-se neste espaço. É necessário garantir que o líquido não seja injetado entre a pele e a parede muscular, mas sim atravesse estas estruturas e se distribua por baixo do *epiplon* [29].

Seguidamente, massajou-se a zona abdominal do animal de forma a que as células fossem atraídas mecânica e quimiotaticamente para o exterior dos vasos sanguíneos e tecidos e recolheu-se suspensão celular (PBS + células sanguíneas – linha fagocitária, eritrócitos, plaquetas) com uma seringa de 1 ml (T.Terumo®Syringe,U-100 insulina 1 ml SS+01H1, Bélgica), acoplada a uma agulha 19G x 1", 1,1 × 25 mm (T.Terumos® Neolus, 19 G×1" 1.1×25mm NN-1925R,Bélgica), Colocou-se o fluído recolhido em *Falcons* estéreis de 15 ml (Sarstedt, 120×17mm 62.554.502, Alemanha) [29].

Tipicamente recolhia-se esta suspensão celular de vários animais, pelo que os tubos eram colocados, até ao passo seguinte, num contentor com gelo picado, para inibir a degradação enzimática.

Para se obterem apenas as células da suspensão procedeu-se à sua centrifugação a 1 100 rpm e uma temperatura de 4°C durante 10 minutos (Heraeus, Multifuge 1L-R, Alemanha, certificada pela Certilab, Portugal). Assim, foi possível separar o sobrenadante do *pellet*. Numa sala de cultura celular, dentro de outra câmara de fluxo laminar (Holten Lamin Air, HB2448, Dinamarca, certificada pela Certilab, Portugal), em condições estéreis, descartou-se o sobrenadante, reservando-se o *pellet*. Este tipo de células requer, de acordo com as indicações da bibliografia da área RPMI – 1640 estéril como meio de cultura (Sigma, R0883, RU). Ao meio RPMI é adicionado FBS (Soro Fetal Bovino) a 10% de FBS (FBS, Sigma, F7524,

³ Este tampão fosfato é preparado com NaH₂PO₄ 10 mM (Panreac, 1319651211, Espanha), KCl 2,7 mM (Sigma, P9333, EUA), NaCl 137 mM (Sigma, S7653, EUA), KH₂PO₄ 1,8 mM (Merck, 6580) e água ultrapura, para perfazer 500 ml e ajustado para pH 7,4. O tampão é colocado num frasco *Schott* de 500 ml estéril (Duran, 00361668,Alemanha), rotulado, com a rolha protegida com papel de alumínio e com fita de segurança para autoclavagem e vai a esterilizar por autoclave.

EUA), 1% de L -glutamina (Sigma, G7513, EUA) e 1% de solução antibiótica com penicilina - estreptomicina (Pen - Strep, Sigma, A5955, EUA). Esta mistura passa a designar-se meio RPMI 1640 completo 10% [31].

Ressuspendeu-se o *pellet* através da adição de 1 ml deste meio de cultura. Recolheram-se 10 µL de suspensão celular para um *ependorf* estéril de 1,5 ml. Já fora da câmara de fluxo laminar adicionaram-se 10 µl de azul tripano a 4% (Sigma, T8154). Utilizou-se este corante uma vez que este tem a capacidade de atravessar a membrana das células não viáveis. No entanto, com os macrófagos acontece o contrário porque, tal como mencionado anteriormente, têm a função de fagocitar, não se tornando desta forma azuis. Após homogeneização recolheram-se 10 µl da mistura que se colocaram numa câmara de contagem de células (câmara de *Neubauer* (Neubauer-improve,0640030, Alemanha)), para observação ao microscópio ótico de contraste de fase (Nikon Eclipse, TS100). Deste modo verificou-se se haveria ou não alguma contaminação com bactérias (devido a problemas não visíveis a olho nu na recolha) e a quantidade relativa de eritrócitos e plaquetas. Se houvesse contaminação o tubo *Falcon* correspondente seria descartado da experiência e a suspensão destruída com hipoclorito de sódio.

Esta nova suspensão celular colocou-se em caixas de cultura estéreis (de fundo plano para células aderentes) de 6 poços (Corning Inc Costar®, 6 well cell Flat Bottom 3516, EUA). Adicionou-se mais 1 ml de meio RPMI-1640 completo e colocou-se numa estufa humidificada (95% de humidade de relativa) a 37°C e 5% CO₂ de um dia para o outro, com o objetivo de separar os macrófagos das restantes células recolhidas, uma vez que estes são aderentes e as restantes não. Para poder trabalhar com os macrófagos é necessário descolá-los do fundo dos poços e o método utilizado para tal pode ser mecânico, usando um raspador estéril (Sarstedt, Cell Scraper 25 cm 83.1830, EUA). Retirou-se o meio adicionado na véspera, colocou-se 1 ml de meio novo completo a cada poço, efetuaram-se movimentos circulares suaves mas homogéneos para descolar a maioria das células aderentes. A nova suspensão foi recolhida com a ajuda de uma pipeta *Gilson* de 1 000 µl (Gilson, Pipetman Neo F144566, França), com pontas estéreis (Sarstedt, Popette tip 1000 I 70.762, Alemanha), para um *Falcon* estéril de 15 ml para se proceder a uma centrifugação nas condições anteriormente referidas.

Dentro da câmara de fluxo voltou a separar-se o sobrenadante do *pellet* e colocou-se novamente 1 ml do mesmo meio de cultura completo de forma a ressuspender este *pellet*. Mais uma vez, colocaram-se 10 μl de suspensão celular num *ependorf* estéril, adicionaram-se 10 μl de azul tripano a 4% (Sigma-Aldrich, T0776,EUA) e procedeu-se à contagem de células na câmara de *Neubauer* para observar ao microscópio ótico de contraste de fase. A câmara de *Neubauer* é uma lâmina para observação ao microscópio, que permite fazer a contagem de células por unidade de volume de uma suspensão. Na câmara existem duas áreas marcadas com uma profundidade definida (1 mm) onde se coloca uma amostra para se proceder à sua leitura. É possível observar no centro dessas áreas muitas linhas perpendiculares umas às outras que definem 4 quadrantes, sendo, desta forma, possível determinar a concentração celular num determinado volume. Assim, é possível saber qual a concentração de células na quantidade total pretendida. Inicialmente, coloca-se a amostra entre a câmara e a lamela e observa-se ao MOCF. Quando existem 200 células em cada quadrado pequeno, a contagem torna-se difícil, sendo melhor proceder à sua diluição. Faz-se a contagem nos quatro quadrantes e calcula-se a média. Para fazer a leitura segue-se um trajeto serpenteante no esquema dos 16 quadrados de cada quadrante (Figura 7), contando o número de células presentes em cada um desses quadrados, desde que não estejam sobre as linhas de separação dos quadrados. Uma vez que o volume de cada quadrante é de $0,1 \text{ mm}^3$, o número total de células por quadrante irá ser a $\times 10^4 / \text{ml}$ [29], [30].

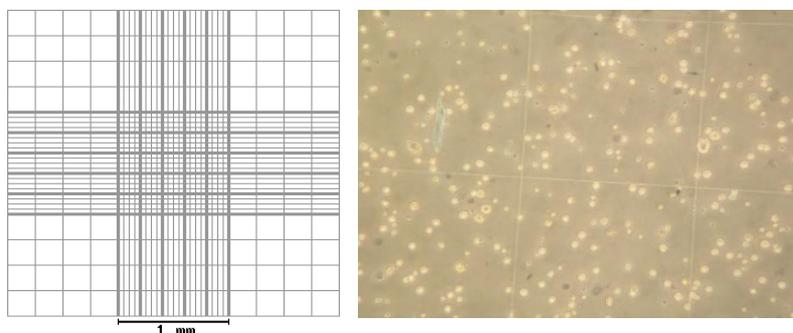


Figura 7 – À esquerda: esquema de Câmara de *Neubauer*. À direita: imagem obtida por MOCF a 100x, utilizando câmara de *Neubauer*. foto do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.

Desta forma, determinou-se o número de células viáveis presentes. Se não se pretendessem usar de imediato, os macrófagos podiam ser criopreservados em tubos específicos para esse fim (Sarstedt, 72380992, Alemanha) juntamente com DMSO (dimetilsulfóxido) estéril a 10% (Sigma, D2650, EUA). Utilizou-se DMSO uma vez que é um agente criopreservante e faz com que a água presente nas células não cristalize de forma tão rápida. Assim, as células conseguem sobreviver mais facilmente a temperaturas muito baixas [29].

Os tubos de criopreservação já com as células, devidamente identificados⁴, foram colocados numa arca frigorífica dedicada apenas a este fim (Thermo Scientific, Hera freeze HFUT serves, HFU3001V63, EUA) a -80°C e, caso não se previsse a utilização destas células em experiências dentro de 3 a 4 meses, os tubos eram transferidos no máximo até 3 semanas para uma câmara de azoto líquido (-190°C) (ThermoNorma, Cryoplus 1, EUA) e registada a sua alocação nas *racks* de armazenamento numa folha apropriada.

3.2.2. Fibroblastos

Os fibroblastos utilizados neste trabalho são fibroblastos humanos isolados e cultivados a partir da polpa dentária, obtidos através da colaboração com o Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Tal como mencionado anteriormente, os fibroblastos são as principais células do tecido conjuntivo e podem ser encontrados em muitas áreas do organismo.

Os fibroblastos foram cultivados inicialmente em frascos de 25 cm² (Corning Inc Corning®Flask, 430639, EUA) e depois de 75 cm² (Corning Inc Costar®, 430641U, EUA) com meio DMEM (gibco® 1x, 11966-025, RU) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich®, F7524, EUA), 1% de L-glutamina (biowest, L-Glutamine 100x, 200 Mm X0550-100, RU) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Lonza, Pen/Strep Amphotericin B (100x) 17-745E, EUA), isto é DMEM completo nas condições referidas anteriormente para os macrófagos, na estufa dedicada (Thermo Electron Corporation, Hera Cell 150, EUA). Foram-se

⁴ No rótulo escreve-se o tipo de célula, número de células no volume contido, data de criopreservação e o nome do investigador. Regista-se num caderno o *stock* deste tubos de criopreservação para utilização futura.

observando ao MOCF e mudando o meio⁵ até as células atingirem cerca de 70% de confluência, descolaram-se usando um método enzimático e transferiram-se para novos frascos. Para descolar os fibroblastos aspira-se todo o meio com o pipetador automático (Gilson®, pipetting Aid 08033, França) acoplado a pipetas de vidro estéreis (VWR®, Pasteur Pipettes 612-107, EUA) e depois colocam-se nesses frascos 6 a 7 ml de uma solução de tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich®, Trypsin-EDTA solution T4049-500ml, EUA). Estes frascos recolocam-se na estufa (nas condições já descritas), tendo sido, como sempre, aspergidas com álcool a 75°, durante cerca de 10 minutos. A reação vai sendo controlada ao MOCF. Quando a maioria das células está em suspensão, de forma a inativar a reação enzimática, acrescentam-se 1 a 2 ml de meio de cultura (neste caso DMEM completo) e recolhe-se a suspensão para *Falcons* estéreis de 15 ml. Estes tubos são centrifugados nas condições já referidas. Caso não sejam necessários para experiências programadas dentro de 1 a 1,5 meses, os fibroblastos também podem ser criopreservados seguindo um protocolo idêntico ao dos macrófagos, diferindo apenas no meio usado. Para tempos mais longos devem ser conservados a -190°C na câmara de azoto líquido (ThermoNorma, Cryoplus 1, EUA).

3.2.3. Osteoblastos e células do osteossarcoma

Os osteoblastos resultaram da diferenciação de células estaminais colhidas da polpa dentária de dentes imaturos (colaboração com o Departamento de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra). O dente foi extraído e lavado 2x com solução salina estéril de Hank's complementada com 10% Pen/Strep (Lonza, Pen/Strep Amphotericin B (100x) 17-745E, EUA) e 20% de fungizona (gibco®, Fungizone® Amphotericin B 250µg/ml, RU). No caso de dentes imaturos é necessário abrir delicadamente o dente com uma broca e

⁵ Tanto o RMPI como o DMEM são vermelhos (embora de cores ligeiramente diferentes), uma vez que contêm vermelho de fenol. Este componente funciona como indicador de pH. À medida que as células vão crescendo ou dividindo-se vão libertando substâncias do seu metabolismo que acidificam o meio, tornando-o alaranjado ou amarelado.

retirar a polpa. No caso dos germes dentários trabalha-se com a colheita total. A amostra dentária foi transportada num meio específico DMEM-KO⁶.

As células estaminais da polpa dentária (DPSC) (ou dos germes dentários) foram isoladas enzimaticamente. Desta forma, colocou-se a amostra durante 1 h a 37°C numa solução de digestão [3 mg/ml de colagenase do tipo I (ThermoFisher, 17100017, EUA), 4 mg/ml de dispase (Merck, 42613.33.2, EUA) em 4 ml de PBS estéril, 100 U/ml de penicilina com 100 µg/ml. Filtrou-se a solução com um filtro de 20 µm (Whatman, FP 30/0.2 CA-S/G9933530, EUA). a amostra foi colocada numa peneira estéril de 70 µm (BD Falcon, 1/ea, 352350, EUA). O filtrado recolhido foi lavado duas vezes com meio DMEM (Hyclone, Logan, UT, EUA) e centrifugado (nas condições já referidas).

Colocaram-se as células em frascos de cultura de 25 cm² (Corning, 14831, EUA) na estufa, nas condições já descritas, para se dividirem ao longo do tempo. Quando atingiram cerca de 70% de confluência foram-se descolando (segundo o protocolo enzimático já descrito) até se obterem vários frascos.

Efetou-se um protocolo específico para descartar a maioria das células que se dividiram (fibroblastos) e para recuperar as células estaminais mesenquimatosas. As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas [32]. Preparou-se o anticorpo primário STRO-1 [Invitrogen, 39-8401, EUA] a 1:50 (STRO-1:suspensão celular, em PBS com FBS a 5%) e incubaram-se as células 30 minutos com agitação (2-8°C). Lavaram-se as células adicionando 1-2 ml de tampão PBS por cada 10⁷ células, centrifugou-se (1 100 rpm durante 10 min) e aspirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 80 µl de tampão por cada 10⁷ células e adicionaram-se 20 µl de Ig M (imunoglobulina M) *anti-mouse microbeads* (R&D Systems, MAB1038, EUA) por 10⁷ células no total (misturar bem) e incubar 15 minutos (2-8°C). Lavaram-se as células adicionando 1-2 ml tampão por cada 10⁷ células e centrifugou-se a 1 100 rpm durante 10 min. Descartou-se o sobrenadante. Ressuspenderam-se as células em 500 µl de tampão. Colocou-se a coluna no suporte magnético (MACS, Biotec, Miltenyi, Alemanha). A seguir lavou-se a coluna (MACS, 120-000-475, Alemanha) com 3 ml de tampão e aplicou-se a suspensão celular (3x). Recolheram-se as

⁶ 1 ml FBS, 100 µl Pen/Strep, 100 µl Glutamina, 10 µl Fungizone e 8,8 ml DMEM.

células não marcadas na parte de baixo da coluna para um tubo *Falcon* esterilizado. Lavou-se a coluna mais 3 vezes com 3 ml de tampão e continuou-se a recolher o lavado. Tirou-se a coluna do separador magnético e colocou-se um tubo para a colheita das células marcadas. Pipetou-se tampão para a coluna e, assim, as células marcadas, retidas na coluna, separam-se (STRO-1 \oplus) ao pressionar o *plunger* (êmbolo) na coluna. Centrifugou-se o volume recolhido (1 100 rpm, 5 minutos). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de tampão. Colocaram-se as células num frasco de cultura de 75 cm² que se colocou na estufa (nas mesmas condições já referidas nos outros protocolos).

Devido a problemas externos ao trabalho, as células estaminais que estavam em crescimento perderam-se. Como tinha ficado um frasco das células da mistura inicial por ter poucas células mesenquimatosas (essencialmente fibroblastos e poucas células estaminais), decidiu-se, mesmo assim, tentar efetuar o protocolo da sua diferenciação em osteoblastos [31]. Preparou-se uma solução com volume final de 10 ml em meio DMEM completo a 20% de FBS, à qual se adicionaram:

- L-glutamina (200 mM) a 1% (Sigma, G7513, EUA);
- dexametasona (Oradexon, 5 mg/ml, Alfa Aesar, 76185 Alemanha) 12,5 μ l;
- vitamina C (Vitamina C-R, 500 mg, CONFAR, Portugal) 100 μ l;
- vitamina D (Vigantol, 0,5 mg/ml, Merck, 9881706, EUA) 100 μ l;
- glicerofosfato (Sigma, G9891, EUA) 500 μ l.

Desta forma, obtiveram-se osteoblastos que cresceram muito lentamente (como é típico destas células mesmo *in vivo*), em número muito escasso. Assim, não foi possível utilizá-los nos testes *in vitro*. A partir das pesquisas bibliográficas efetuadas, verificou-se que a nível internacional o problema da obtenção e do crescimento muito lento é comum a todos os grupos de investigação, pelo que normalmente trabalham com linhas de osteossarcoma [32].

Como alternativa, obteve-se uma alíquota de uma linha de osteossarcoma (MNNG/HOS) fornecida pelo grupo de investigação de Farmacologia do IBILI-FMUC. Apesar de ser uma linha celular maligna (normalmente as células malignas multiplicam-se mais rapidamente do que as células benignas), o seu período de crescimento é bastante lento, tal como previsto pelo comportamento *in vivo* de um tumor ósseo humano. Neste contexto

apenas se puderam realizar dois ensaios com esta linha mas com um número reduzido de amostras, que não permitiu efetuar estudos estatísticos.

3.3. Produção dos Scaffolds

Os *scaffolds* foram produzidos através de uma bioextrusora desenvolvida pelo Instituto Politécnico de Leiria (IPL). Este equipamento permite um processo de fabricação aditiva em que, camada a camada, se vai construindo o *scaffold* pretendido [33].

A bioextrusora possui dois sistemas de deposição diferentes: um de rotação para a deposição de vários materiais e outro para uma deposição unimaterial. O equipamento é constituído por 3 unidades para a produção do *scaffold*, controlo de temperatura e de velocidade de rotação (Figura 8) [34].



Figura 8 – Bioextrusora do CDRSP – IPL (retirado de [35]).

A bioextrusora, que podemos ver na Figura 8 (retirada de [35]) é comandada por um *software* desenvolvido em linguagem Matlab, que permite definir os parâmetros pretendidos do *scaffold* a produzir, tais como a porosidade, espessura e velocidade de sedimentação.

Este trabalho inclui-se num projeto mais vasto em desenvolvimento no DEQ, tendo-se produzido os *scaffolds* com as mesmas características dos anteriormente usados: espessura de 0,84 mm e espaçamento entre camadas que constituem a peça (ST) de 0,28 mm (valor fixo). Desta forma, o *scaffold* tem 3 camadas, uma vez que $0,84/0,28 = 3$. De referir que a primeira camada corresponde à camada zero. Assim, o *scaffold* tem, no total, 4 camadas.

Desta forma, será possível estudar a citotoxicidade e adesão celular devidos às características dos *scaffolds*. No Quadro 1 é possível observar as características do material testado. Podem ser constituídos apenas por PCL ou por PCL + HA natural ou sintética a 10% ou 25%, respectivamente. A espessura do filamento é de (300 μm ou 600 μm) assim como a geometria (45° ou 90°).

Quadro 1 – Quadro de apresentação das 20 diferentes formulações dos *scaffolds* estudados.

FORMULAÇÃO		
Composição	Espessura de filamento (μm)	Ângulo (°)
PCL	300	45
		90
	600	45
		90
PCL + HAN(10%)	300	45
		90
	600	45
		90
PCL + HAN(25%)	300	45
		90
	600	45
		90
PCL + HAS(10%)	300	45
		90
	600	45
		90
PCL + HAS(25%)	300	45
		90
	600	45
		90

Estas características foram determinadas de forma a testar qual será o melhor material para regeneração óssea no que diz respeito à composição o *scaffold* pode ser constituído apenas por HA natural ou sintética, a 10% ou a 25%, o que confere grande resistência ao material, ou então também pode ter incorporada PCL, para que o material possua características elásticas e não fique quebradiço. Escolheu-se a parte inorgânica

porque é menos reativa em termos de indução de resposta imunitária. Selecionaram-se estas duas percentagens, 10 e 25, uma vez que se fosse em maior concentração o material ficava quebradiço e perdia muita elasticidade; quanto à espessura do filamento e à geometria do *scaffold*, para facilidade de produção, foram escolhidos quadrados de 30 x 30 x 1 mm, sendo o tamanho do poro de 350 μm . A orientação das fibras escolhida foi 90° ou 45°, assim como também os filamentos têm 300 μm ou 600 μm .

Integrado no projeto mais abrangente onde, como já foi referido, esta dissertação se insere, o grupo efetuou a caracterização destes *scaffolds* recorrendo a várias técnicas [36], o que consolida os resultados deste trabalho:

- por espectro de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR, do inglês *Fourier transform infrared-attenuated total reflectance*) para confirmar as suas composições químicas e avaliar possíveis alterações químicas provocados pelas condições de processamento;

- a arquitetura dos *scaffolds* e a morfologia da superfície dos filamentos foram observadas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*);

- a porosidade foi determinada com um picnómetro de Hélio;

- recorreu-se ainda à análise termogravimétrica, para determinar a percentagem real de hidroxiapatite (HA) presente nos *scaffolds*;

- bem como à calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) para determinar as propriedades térmicas;

- as propriedades mecânicas foram também estudadas através de testes de compressão uniaxial.

3.4. Esterilização dos *Scaffolds*

A produção ocorreu a temperaturas elevadas e tal seria suficiente para que os *scaffolds* ficassem estéreis, se a bioextrusora estivesse dentro de uma câmara de fluxo e os

quadrados produzidos fossem armazenados em contentores estéreis. Depois seriam cortados em círculos, também em ambiente estéril e ficavam prontos a aplicar. No entanto, a realidade foi outra e nenhum dos passos decorreu em ambiente esterilizado e controlado, tornando-se necessário esterilizar os *scaffolds*. Tal como foi dito anteriormente, neste trabalho esterilizaram-se os *scaffolds* através de dois métodos: esterilização por óxido de etileno e esterilização por radiação gama, métodos muito utilizados para a esterilização de material médico.

Seguidamente descreve-se resumidamente cada um dos métodos de esterilização.

3.4.1. Óxido de Etileno

O método de esterilização por óxido de etileno é, atualmente, o mais utilizado a nível hospitalar. Este tipo de esterilização permite destruir uma larga gama de agentes patogénicos, sendo a sua eficácia dependente de vários fatores como a humidade, temperatura e tempo de exposição [2].

O óxido de etileno é um gás incolor, inflamável e explosivo, com a fórmula química geral C_2H_4O , que é produzido quando o etileno (C_2H_4) e o oxigénio (O_2) reagem sobre um catalisador de prata a 200-300°C [2]. Este processo decorre dentro de equipamentos dedicados, seguindo protocolos sensivelmente idênticos em todos os laboratórios. Este método de esterilização foi efetuado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra de acordo com o seguinte protocolo numa câmara 130LF da Matachana:

- a câmara foi regulada entre 37°C e 55°C e uma humidade entre 40% e 90% (obtida colocando água no seu interior);
- colocou-se o gás dentro da câmara (de acordo com a capacidade do equipamento) durante 3h 45 min;
- de seguida fez-se a remoção do gás residual e dos seus subprodutos tóxicos com um fluxo de ar quente à pressão atmosférica durante 8h 15 min.

Para se verificar facilmente se o material foi esterilizado com nível de segurança, colam-se fitas de garantia de esterilidade que ficam com riscas a preto (originalmente são creme) .

3.4.2. Radiação Gama

A radiação gama é também um método de esterilização que vem sendo mais utilizado nos últimos anos para material médico.

Para verificar a eficácia da esterilização por gama, contaminaram-se artificialmente amostras de dois tipos de *scaffolds* artificialmente aproximadamente com 106 UFC de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e, posteriormente, irradiaram-se todas as amostras a 25 kGy. A irradiação foi feita na câmara PRECISA22 – câmara de irradiação experimental de Co-60 (IRIS, CTN/IST). A irradiação foi efetuada com rotação e em simultâneo para 10 amostras, colocadas em tubos de 15 ml (tipo *Falcon*), como vemos na Figura 9. Para verificar a dose a que as amostras foram expostas foram colocados 3 dosímetros (Amber 3042 lote X, Harwell) por cada dose de irradiação, procedendo-se então à leitura da absorvância dos dosímetros, após irradiação, com um espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Japão) e respetiva espessura com um medidor de espessuras (Mitutoyo 7360, Japão).



Figura 9 – Foto da Câmara PRECISA22, à esquerda. Foto das amostras dentro da câmara.

Após a irradiação foram adicionados a cada uma das amostras 10 ml meio de cultura líquido - Tryptic Soy Broth (TSB; Merck, EUA). Os ensaios foram efetuados em condições assépticas numa sala limpa com classificação ISO 5 [ver Anexo C].

3.5. Estudos *in vitro*

Os ensaios de cultura *in vitro* permitem testar de forma facilitada linhas, celulares específicas. É possível efetuar avaliações quantitativas e qualitativas, uma vez que estes testes são realizados em condições estéreis. São os primeiros testes a ser realizados, de forma a testar os materiais e células pretendidos para posteriormente, caso estes testes deem resultados favoráveis, se prossiga para estudos *in vivo*. Nos testes *in vitro*, uma vez que são realizados em ambiente estéril, conseguem controlar-se vários parâmetros e, assim, diminuir o número de amostras a utilizar nos estudos *in vivo*, como é requerido pelo princípio dos 3 R's [37].

3.5.1. Métodos de trabalho

O objetivo deste trabalho é testar *scaffolds* com características diferentes e analisar a sua citotoxicidade e melhores condições de adesão celular para macrófagos, fibroblastos e células osteogénicas.

As experiências foram realizadas em caixas de cultura de 48 poços (Costar®, Corning Incorporation, 3548, EUA). Uma vez que todas as caixas de cultura têm poços de forma circular foi necessário cortar os *scaffolds* em círculos de 1 cm de diâmetro. Assim, foi possível colocá-los dentro de cada poço com a ajuda de uma lâmina de bisturi (*KATO*, nº22, Índia) ou agulha 25G (T.Terumo® Neolus, 25 G×5/8" 0,5×16mm NN-2516R, Bélgica) esterilizadas.

Neste trabalho, como anteriormente referido, os *scaffolds* foram esterilizados por óxido de etileno e por radiação gama, métodos previamente descritos.

Utilizaram-se suspensões celulares nos respetivos meios de cultura, semeando 5×10^4 células/ml quando se usaram macrófagos peritoneais, $1,3 \times 10^4$ células/ml para os fibroblastos humanos e $2,6 \times 10^4$ células/ml para as células osteogénicas (linha de osteossarcoma). No caso da co-cultura de macrófagos e fibroblastos, utilizaram-se estas

mesmas concentrações relativas das suspensões de ambos os tipos celulares, uma vez que os macrófagos não têm a capacidade de se dividir *in vitro*, contrariamente aos fibroblastos. Assim, obteve-se uma proporção de aproximadamente 1 fibroblasto para 5 macrófagos.

Testou-se a proliferação celular e a citotoxicidade em diferentes tempos, tendo em conta que, segundo estudos anteriores [38] [39], os macrófagos apresentam melhores resultados quando os testes são avaliados às 72 horas, no caso dos fibroblastos às 168 horas e para a co-cultura de macrófagos e fibroblastos às 72 horas e às 168 horas. No caso das células osteogénicas, uma vez que estas apresentam um crescimento bastante lento, os testes *in vitro* decorreram até às 360 horas. Estes resultados são mais favoráveis nestes tempos específicos, uma vez que, tal como dito anteriormente, os macrófagos são as primeiras células a chegar ao local de infeção, contrariamente aos fibroblastos que atuam mais tarde, uma vez que têm o papel de regenerar a matriz extracelular. Além disso os fibroblastos estabilizam as suas funções e crescimento (por exemplo na cicatrização de uma ferida) precisamente pelas 168 horas [40]. Desta forma, é fácil entender o porquê dos macrófagos serem estudados às 72 horas e os fibroblastos às 168 horas. Para tentar conciliar o tempo na co-cultura destes dois tipos celulares, testaram-se, nestas condições, alguns *scaffolds* às 120 horas, uma vez que é o tempo limite de macrófagos ativos em monocultura e o início da estabilização dos fibroblastos. No entanto, verificou-se que, na presença dos fatores de crescimento sintetizados pelos fibroblastos, os macrófagos conseguiam responder com acuidade às 168 horas [40].

Testaram-se os três tipos celulares em tempos diferentes, tentando simular o melhor possível *in vitro* o que se passaria no organismo, para tentar prever o comportamento *in vivo*, numa fase posterior. Assim, colocaram-se os *scaffolds* nas caixas, de acordo com uma distribuição pré-estabelecida, para serem incubados com os tipos celulares selecionados, em mono ou co-cultura. O volume total colocado em cada poço foi de 300 µl.

Todos os procedimentos dos protocolos de cultura celular e incubação dos *scaffolds* foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar em condições de esterilidade. Colocaram-se as suspensões celulares diretamente sobre os *scaffolds*, previamente colocados nos poços. Nos testes que envolveram macrófagos, primeiro

colocaram-se 75 µl de suspensão de macrófagos peritoneais de rato e depois perfizeram-se os 300 µl com RPMI completo a 10%; para os fibroblastos humanos, colocaram-se 150 µl de suspensão celular e 150 µl de meio DMEM completo a 10%; no caso da co-cultura de macrófagos peritoneais de rato e com fibroblastos humanos, colocaram-se 75 µl de suspensão de macrófagos peritoneais e 150 µl de suspensão de fibroblastos humanos, perfazendo igualmente os 300 µl com DMEM completo a 10%. Por fim, quando se utilizaram células osteogénicas, colocaram-se 150 µl de suspensão celular e 150 µl de meio RPMI completo a 10%.

É importante referir que em todas as experiências se efetuaram grupos de controlo para os referidos tipos celulares, utilizando as mesmas concentrações por poço. As células foram colocadas diretamente sobre o fundo dos poços, uma vez que estas caixas de cultura são apropriadas para células aderentes.

3.5.2. Teste do MTT

De modo a determinar a viabilidade celular, ou seja a proliferação celular e a citotoxicidade dos materiais utilizados nos estudos *in vitro*, utilizou-se o ensaio de MTT. Quantificou-se quanto do MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH (atividade mitocondrial das células viáveis), levando à formação de cristais de *formazan* de cor azul, por quebra do anel de tetrazólio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio. No passo final deste teste, as células são destruídas por ação do isopropanol ácido e os cristais de *formazan* são libertados para a solução, que é homogeneizada. O resultado é medido por espectrofotometria, sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis [41].

Em condições estéreis, retirou-se o meio de cada poço e, de seguida, colocaram-se 270 μ l de meio de cultura e 30 μ l de MTT (0,5 mg/ml) homogeneizando bem (Sigma, M2128, EUA). A caixa de cultura permaneceu no escuro, nas condições de cultura dentro da estufa, durante 4 horas. É possível observar as diferentes tonalidades de cor na Figura 10.

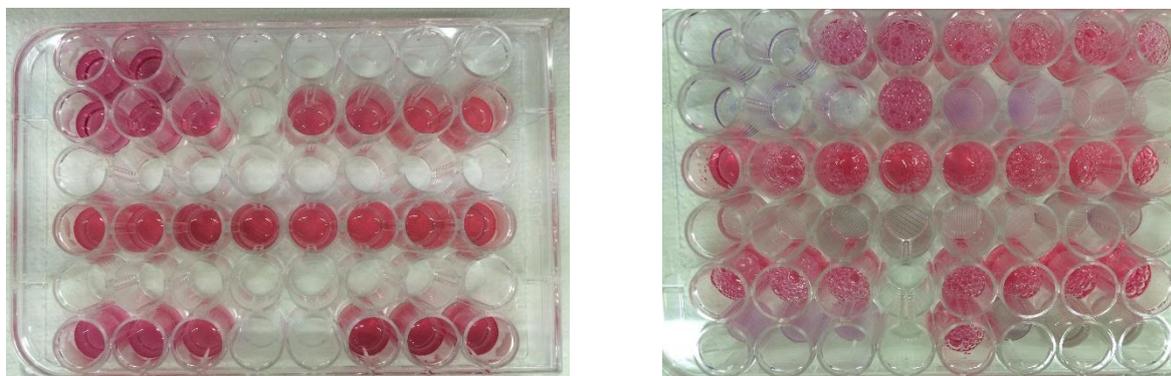


Figura 10 – Caixas de 48 poços após realização do MTT, onde podemos ver as diferentes tonalidades, à esquerda temos os poços com os *scaffolds* e o MTT e à direita temos os poços já sem líquido.

No último passo retirou-se a solução contida em cada poço e adicionaram-se 150 μ l de isopropanol ácido [ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, H1758, EUA) em isopropanol 0,04 M (Sigma-Aldrich, 278475, EUA)]. Esperaram-se 15 minutos e mediu-se a absorvância usando um espectrofotómetro (Figura 11). Selecionaram-se dois canais para efetuar a leitura no intervalo entre os dois comprimentos de onda de referência do corante (MTT): 570 nm e 620 nm.



Figura 11 - Equipamento para ler testes de ELISA.

3.6. Estudos *in vivo*

Tal como mencionado anteriormente, caso os resultados dos estudos *in vitro* sejam favoráveis, prossegue-se para os estudos *in vivo*, conseguindo utilizar um menor número de animais. Nestes estudos *in vivo* testaram-se alguns dos *scaffolds* através da sua implantação num modelo experimental animal. O rato é o modelo animal mais utilizado em laboratório, dado que a sua manipulação é fácil, a temperatura corporal e valores de bioquímica sanguínea são muito semelhantes aos do ser humano, assim como a fisiologia e compartilha também grande parte do código genético. Uma das estirpes de ratos mais utilizada é a *Wistar*, uma vez que tem várias características adequadas para estes ensaios (tamanho, peso, preço, facilidade de manutenção sem condições especiais, etc.) (Figura 12) (retirado de [20]).

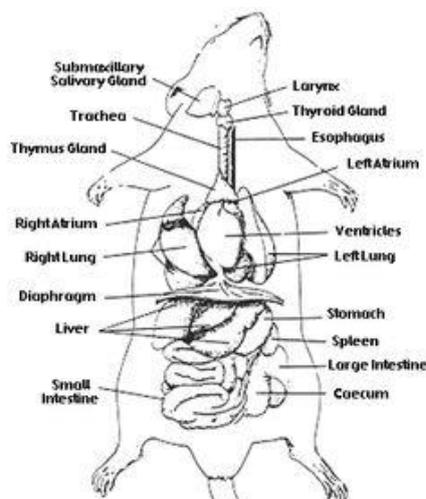


Figura 12 – Esquema anatômico de um rato Wistar (retirado de [20]).

Com base nestas informações anatómicas foi possível injetar o PBS estéril na cavidade abdominal dos animais e recolher os lavados peritoneais com o maior cuidado possível para não haver perfuração de órgãos maciços (por exemplo: baço e fígado) ou do intestino, o que leva a descartar os lavados peritoneais devido a contaminação microbiológica.

A inserção e recolha dos *scaffolds* no dorso também teve em conta estes conhecimentos, no que se refere ao tipo e densidade de pêlos e espessura das camadas da derme para programar a realização da tricotomia e sutura. A remoção dos pêlos é importante para a pequena cirurgia e para a técnica histológica.

3.7. Estudos histológicos

Dado que a gengiva é constituída essencialmente por tecido conjuntivo, a implantação dos *scaffolds* foi efetuada no tecido celular subcutâneo do dorso, para tentar simular o ambiente da sua futura utilização.

Para se proceder ao implante subcutâneo é necessário realizar uma mini intervenção cirúrgica, utilizando material cirúrgico devidamente esterilizado [42].

Foram selecionados 10 tipos de *scaffolds* para os estudos *in vitro*: 6 que, de acordo com as características, apresentaram melhores resultados e 4 que apresentaram resultados menos favoráveis:

Estavam disponíveis 28 ratos *Wistar*, 19 fêmeas e 6 machos (com peso médio a variar dentro dos parâmetros normais durante o período de estudo). Fizeram-se grupos de animais de idades sensivelmente idênticas por tipo de *scaffold*.

Para poder iniciar o procedimento cirúrgico é obrigatório anestésiar o animal. Injetou-se, por via intramuscular, na coxa - 0,3 ml por cada 100 g de peso - uma mistura de uma solução 3:1 de quetamina (Hikma Farmacêutica S.A, cetamina IM 500 mg/10 ml, Portugal) e clorpromazina (Largactil® 5 mg/ml, Laboratórios Vitória, 9.977.827, Portugal) usando uma agulha 25G acoplada a uma seringa de 2,5 ml (Terumos®, 177714, Bélgica).

Com esta dosagem anestésica cada rato ficou cerca de 1 hora sob anestesia e pôde ser sujeito à cirurgia para implantação dos *scaffolds*. Desinfetaram-se as áreas a ser tricotomizadas com uma solução espuma de iodopovidona (Egrema, Paracelsia, 0670, Espanha). Fez-se a tricotomia em zonas específicas do dorso do rato, como é possível observar no esquema da Figura 13.



Figura 13 - Tricotomia realizada no dorso do rato, em áreas específicas para posterior implantação subcutânea do *scaffold*.

Realizou-se o procedimento cirúrgico dentro de uma câmara de fluxo laminar, tendo-se aspergido todo o material utilizado com álcool a 75°, assim como o próprio animal, ficando o rato posicionado em decúbito ventral. Desinfetaram-se as áreas

tricotomizadas com uma solução dérmica iodo povidona (Egrema, Paracelsia, 0670, Espanha). Todo o material cirúrgico utilizado foi sujeito a esterilização (por óxido de etileno ou radiação gama, conforme o fornecedor) para garantir que não ocorreria nenhuma infecção devido a este parâmetro. Foram feitas as incisões nessas mesmas zonas, para aceder ao tecido celular subcutâneo, tendo-se descolado as estruturas para criar uma bolsa.

Cada tipo de *scaffold* foi inserido na bolsa criada. No quadrante superior esquerdo apenas se criou uma bolsa para simular as mesmas condições de descolamento de estruturas, servindo este quadrante de controlo em todos os grupos de animais. No quadrante superior direito colocou-se o *scaffold* selecionado esterilizado por óxido de etileno e no quadrante inferior direito colocou-se o mesmo tipo de *scaffold* esterilizado por radiação gama. É possível observar de que forma se colocaram os *scaffolds* nos ratos da Figura 14.

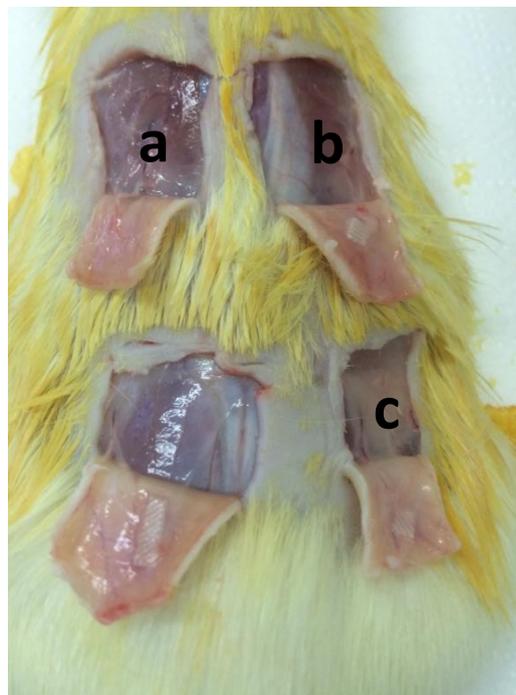


Figura 14- Esquema de colheita dos *scaffolds* no rato realizados nos estudos *in vivo*:
(a) controlo (corte sem colocação de material); (b) *scaffold* esterilizado por
óxido de etileno; (c) *scaffold* esterilizado por radiação gama.

No final desinfetaram-se as áreas suturadas com a solução dérmica de iodopovidona. Colocou-se o animal novamente na gaiola, envolvido numa fralda para

proteção e aquecimento (a anestesia provoca hipotermia), para quando acordasse estar no seu meio. Os animais tinham ração e água *ad libitum*. Os animais foram pesados antes da experiência e semanalmente usando uma balança adequada (Seca, modelo 734, serie 1/1, Alemanha).

Passados 30 dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Cumpriram-se todas as regras do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto (proteção e bem estar animal para fins de investigação) [21]. Também é importante salientar que se seguiu o Princípio dos 3R's que envolve 3 regras básicas quando há o envolvimento de animais em estudo [37]. Deve-se **Reduzir** o menor número de animais o mais possível. Foram estudados 4 animais por grupo, em vez dos 10 que como era antes aceite internacionalmente; tentar **Substituir** os animais por modelos alternativos de investigação. Neste estudo os *scaffolds* foram testados primeiro *in vitro* para depois, consoante os resultados, testar *in vivo*. Além disso, utilizaram-se ratos em vez de animais de maior porte; e também **Refinar**, isto é, aperfeiçoar todos os processos envolvidos durante as experiências para que os resultados sejam mais fidedignos e não seja necessário utilizar mais animais para substituição de indivíduos [37].

Dado o tempo decorrido entre o implante e a recolha dos *scaffolds*, o pêlo dos animais cresceu nas áreas previamente tricotomizadas, sendo necessário refazer a tricotomia, nas condições referidas anteriormente. Seguidamente os *scaffolds* foram encontrados através da palpação e, com o material cirúrgico esterilizado atrás referido, foram colhidos “quadrados” de pele com os *scaffolds*, de modo a ter-se uma amostragem do *scaffold*/local por ele ocupado e tecidos circundantes.

Estas amostras foram fotografadas e colocadas em cassetes para histologia (PrintMate™ Embedding Cassettes, A84810048, EUA) (Figura 15) e colocados em recipientes com tampa roscada contendo formol neutro tamponado a 10% (Sigma, 252549, EUA).



Figura 15 - Cassete de fixação utilizada para os estudos histológicos (PrintMate™ Embedding Cassettes, A84810048).

Dada a estreita colaboração existente com o Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pôde fazer-se o estudo histológico destas amostras.

A técnica histológica compreende vários passos sequenciais devido às características dos tecidos, dos reagentes e do equipamento. O primeiro passo é a fixação, dado que se pretendem preservar as células o mais próximo de como existiam no momento de recolha. As células/tecidos têm cerca de 60% de água e, por isso, usa-se uma solução aquosa com as características necessárias para parar a ação enzimática e conseguir uma preservação rápida [22]. Cada uma das amostras foi fixada pelo menos durante 1 semana a 4°C e só depois seccionada a meio na vertical (fica metade do *scaffold* em cada parte) e a fixação continua pelo menos por mais 2 a 4 dias. O fixador substitui toda a água do material biológico. O que se pretendeu foi realizar histologia convencional, ou seja, realizar cortes finos (3 a 5 µm de espessura) em *paraplast* (Sigma, P3568, EUA). O *paraplast* não é miscível em água, o que implica ter de se fazer uma sequência de passos em que o material é sucessivamente transferido para soluções aquosas de álcool com graduação crescente até

ao álcool absoluto (70 a 100°). O protocolo escolhido foi determinado pela Técnica do referido laboratório de Patologia Experimental: começa em álcool a 60° e termina em álcool absoluto (Aga, UN1170, Portugal). O álcool a 100° tem de ser substituído por um hidocarboneto aromático (2 x) foi usado xilol (Sigma-Aldrich, 534,056, EUA) com o qual o *paraplast* é miscível. O último passo é colocar as amostras em *paraplast* a 56-58°C (é sólido à temperatura ambiente) das 17 h até ao dia seguinte. No dia seguinte foi feita a inclusão do material em recipientes retangulares de inox (Thermo Fisher Scientific, Mini Metal Base Mold, Leica Biosystems, EUA) com as dimensões da tampa da cassette de fixação. Coloca-se o *paraplast* no estado líquido dentro do molde, que se desloca para cima de uma placa arrefecida para solidificar uma “crosta” fina que prende o fragmento de tecido de modo a não perder a orientação de inserção. Os blocos de inclusão são mantidos a 4°C. para facilitar o passo seguinte. Desta forma, as amostras estavam prontas para ser seccionadas com um micrótomo (Leica RM 2155, Leica, Portugal) (cortes de 3 a 5 µm de espessura) e serem transferidas para lâminas (previamente revestidas com uma camada fina de cola biológica [Poly-L-Lysine solution, 0.1% em água (Sigma Aldrich, p8920, EUA) e secas pelo menos 24 h] num banho de água termostaticado a 37°C (Tissue-water bath 6951, Newcomersupply, EUA). As lâminas com os cortes histológicos foram secas durante 24 h numa estufa a 37°C, para não se descolarem das lâminas nos passos seguintes.

A técnica de coloração tem de iniciar-se com um processo de desparafinização (retirar o *paraplast* e substituí-lo por água – já que os corantes são aquosos/alcoólicos) e colocam-se as lâminas dentro de cestos de vidro apropriados para caber dentro de tinas de vidro. A sequência é composta por 2 tinas com xilol, 2 tinas com álcool a 100%, 2 tinas com álcool a 95%, 1 tina com álcool a 70%, 1 tina com água da torneira corrente. As amostras estão prontas para serem coradas. A técnica de coloração efetuada foi hematoxilina-eosina (técnica de rotina). A hematoxilina (Sigma-Aldrich, MHS1, EUA) e um corante básico que cora os núcleos celulares e organitos acídicos e a eosina (Sigma-Aldrich, HT110280, EUA) é um corante ácido que cora os citoplasmas. Tipicamente cora-se com hematoxilina (usou-se a hematoxilina de Mayer [44]) durante 7 a 10 min, banho de água corrente 10 min e eosina durante 5 minutos. Passa-se por álcool a 70° e refaz-se o percurso nas tinas atrás usadas para que as lâminas desidratem e fiquem em xilol, prontas a ser tornadas em preparações

definitivas. Para tal é necessário proteger os cortes histológicos nas lâminas com uma lamela colada com uma cola sintética (DPX Mountant for histology, Sigma-Aldrich, 44581, EUA). As preparações secam, na estufa durante 24 h, limpam-se e ficam prontas para ser visualizadas ao microscópio ótico.

Fez-se a sua observação primeiro à lupa ótica e depois ao microscópio ótico, acoplados a um sistema computadorizado de fotografia para registar os resultados obtidos (Nikon Eclipse digital photo capturing system, Nikon, Japão).

4. ANÁLISE DE RESULTADOS

4.1. *In vitro*

Os dados recolhidos das experiências *in vitro* permitiram realizar um estudo estatístico tendo como objetivo determinar qual o melhor tipo de esterilização para os *scaffolds*. Estes dados pretendem confirmar resultados anteriores e descobrir novas possíveis tendências [38] [39].

O teste de comparação utilizado para determinar para cada caso a melhor esterilização foi o de *Mann-Whitney*, já que permite comparar dois grupos de valores. Os resultados foram obtidos através do IBM SPSS Statistics, versão 23, e analisados ao nível de significância de 0,05.

Os resultados apresentam-se como a comparação percentual com o valor máximo obtido para a mediana de cada formulação, ou seja, o tipo de esterilização com um valor de mediana superior para cada formulação obtém o valor de 100%, tomando o valor do outro tipo de esterilização a forma de percentagem por comparação com o máximo.

Nas secções seguintes as tabelas apresentam os resultados referidos, que podem também ser observados nos respetivos gráficos. Os suportes gráficos serão previamente comentados.

Os quadros com os valores de p para cada formulação encontram-se no Anexo A, estes valores são, na esmagadora maioria dos casos, superiores ao limite desejado de 0,05 ($p < 0,05$), muito por causa do número de amostras ser relativamente reduzido.

4.1.1. Monocultura de Fibroblastos

A melhoria geral da esterilização por óxido de etileno aos 7 dias parece existir, ainda que não se atinja significância estatística (Quadro 2). Contudo, dada a dimensão da amostra, parece importante salientar o padrão consistente de melhores resultados com óxido de etileno, ainda que não se atinja a significância estatística.

No caso dos *scaffolds* constituídos unicamente por PCL vê-se que há em ambos os tempos, uma tendência para a radiação gama ser o melhor método de esterilização, no entanto as diferenças são reduzidas no geral. Talvez as reconhecidas alterações da estrutura causadas pela radiação gama na PCL, sejam mais notórias quando este é material único e sejam benéficas para a cultura de fibroblastos [43]. Quanto às restantes formulações não parece haver tendências claras.

Quadro 2 – Quadro de comparação percentual entre tipos de esterilização para fibroblastos.

FORMULAÇÃO			Duração (dias)			
			3		7	
Composição	Espessura de filamento (μm)	Ângulo ($^{\circ}$)	Esterilização (%)			
			OE	γ	OE	γ
PCL	300	45	96,18	100,00	98,17	100,00
		90	75,14	100,00	61,14	100,00
	600	45	85,82	100,00	100,00	74,78
		90	100,00	89,29	93,51	100,00
PCL + HAN(10)	300	45	100,00	94,90	100,00	98,41
		90	100,00	89,58	96,88	100,00
	600	45	100,00	82,87	60,11	100,00
		90	65,47	100,00	92,19	100,00
PCL + HAN(25)	300	45	100,00	97,66	10,47	100,00
		90	87,39	100,00	100,00	62,38
	600	45	73,33	100,00	100,00	92,54
		90	100,00	84,62	100,00	84,96
PCL + HAS(10)	300	45	100,00	83,59	100,00	92,31
		90	100,00	98,62	84,24	100,00
	600	45	80,43	100,00	100,00	89,17
		90	55,80	100,00	100,00	92,00
PCL + HAS(25)	300	45	87,76	100,00	93,94	100,00
		90	100,00	98,83	100,00	76,67
	600	45	60,70	100,00	100,00	77,85
		90	100,00	57,31	100,00	67,52
Comparação Geral(%)			50,00	50,00	55,00	45,00

Relativamente à porosidade, parece haver uma propensão para óxido de etileno ser o melhor método para os *scaffolds* com poros maiores e de o contrário acontecer para os que têm poros mais pequenos (Gráfico 1), ainda assim seriam precisos mais valores para podermos confirmar.

Observando o gráfico para PCL+HAS(25), o método de esterilização que obteve melhor resultados é o oposto para 45° e 90°. Nota-se também que a esterilização por radiação gama é a melhor para os casos dos *scaffolds* PCL+HAS(10) – 600. Já o óxido de etileno parece ser benéfico para os *scaffolds*: PCL+HAN(10) -300, PCL+HAS(10) - 300.

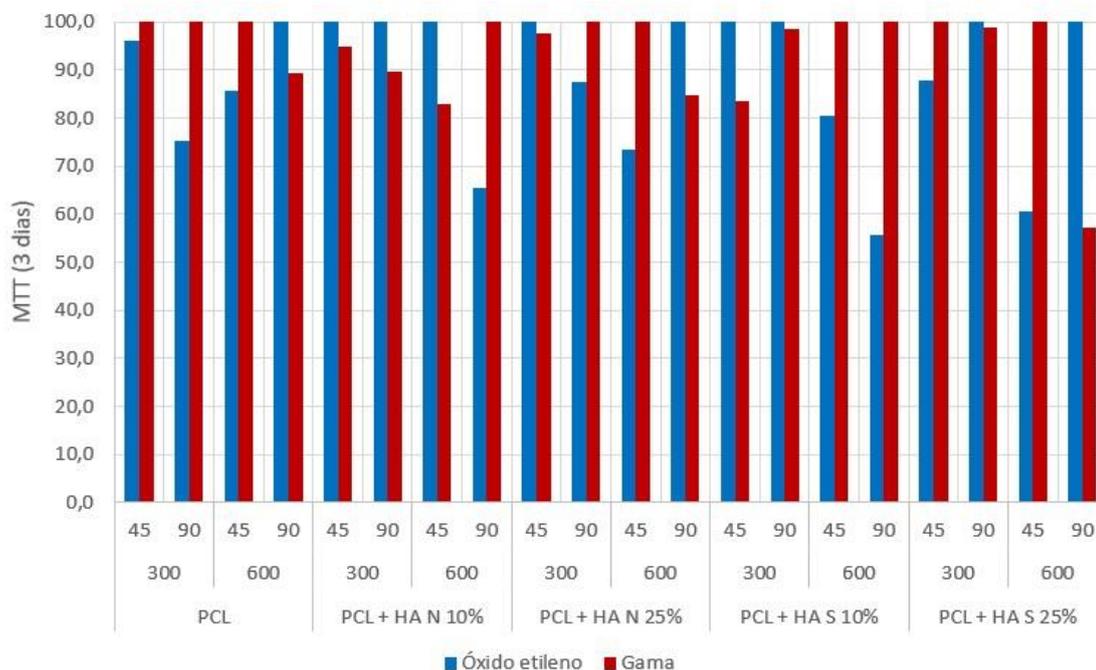


Gráfico 1 – Gráfico relativo ao desempenho biológico das esterilizações dos *scaffolds* em cultura de fibroblastos com o tempo de 3 dias.

No gráfico relativo aos 7 dias (Gráfico 2) existe um resultado (PCL+HAN(25)-300-45) que evidencia um desequilíbrio anormal, facto que pode resultar em parte de um número de amostras reduzido e deve ter ocorrido algum erro. Observa-se que a radiação gama é melhor para os scaffolds: PCL-300 e PCL+HAN(10)-600; e que o óxido de etileno é superior para PCL+HAN(25)-600, PCL+HAS(10)-600 e PCL+HAS(25%)-600.

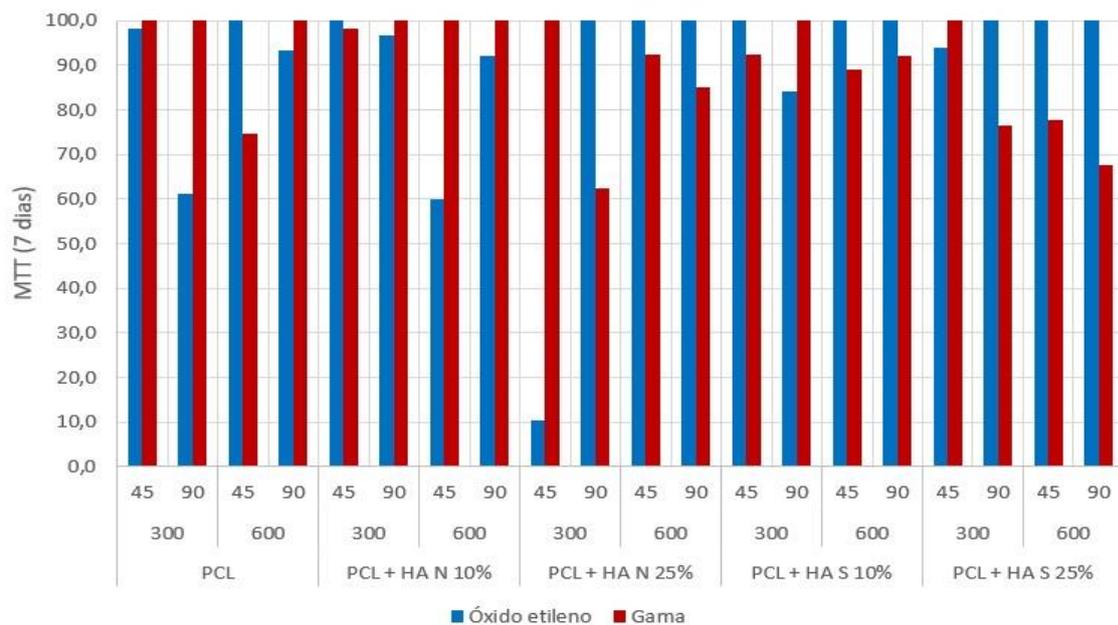


Gráfico 2 – Gráfico relativo ao desempenho biológico das esterilizações dos scaffolds em cultura de fibroblastos com o tempo de 7 dias

4.1.2. Monocultura de Macrófagos

Para os macrófagos são apresentados apenas dados relativos à duração de 3 dias de experiência, já que é o tempo ideal para se testar este tipo celular. Vê-se no quadro que para o caso destes a tendência é muito clara, segundo os resultados a esterilização por radiação gama torna os *scaffolds* mais propícios à sobrevivência dos macrófagos. Este facto estará relacionado com as alterações físicas que a radiação gama provoca nestes materiais. A irradiação leva à libertação de partículas e aumenta a taxa de degradação, o que aumentará a superfície de ataque a que os macrófagos têm acesso (células fagocíticas) [43].

De salientar que em dois dos três casos em que o óxido de etileno obteve melhores valores as formulações têm o nível mais elevado de HA(25%) e maior espessura do filamento (menos poros) (Quadro 3).

Quadro 3 – Quadro de comparação percentual entre tipos de esterilização para macrófagos.

FORMULAÇÃO			Duração (dias)	
			3	
Composição	Espessura de filamento (μm)	Ângulo ($^{\circ}$)	Esterilização (%)	
			OE	γ
PCL	300	45	92,26	100,00
		90	66,85	100,00
	600	45	69,28	100,00
		90	89,02	100,00
PCL + HAN(10)	300	45	98,99	100,00
		90	100,00	89,10
	600	45	75,26	100,00
		90	52,21	100,00
PCL + HAN(25)	300	45	94,15	100,00
		90	89,90	100,00
	600	45	55,61	100,00
		90	100,00	98,82
PCL + HAS(10)	300	45	90,91	100,00
		90	77,78	100,00
	600	45	73,33	100,00
		90	45,51	100,00
PCL + HAS(25)	300	45	99,00	100,00
		90	98,40	100,00
	600	45	71,90	100,00
		90	100,00	73,46
Comparação Geral (%)			15,00	85,00

O Gráfico 3 para os macrófagos evidencia graficamente a ideia de que a esterilização por radiação gama leva vantagem no que diz respeito à viabilidade de culturas de macrófagos. São muito poucos, apenas 3 (PCL+HAN(10)-300-90, PCL+HAN(25)-600-90 e PCL+HAS(25)-600-90), os casos em que a técnica de óxido de etileno obteve melhores resultados.

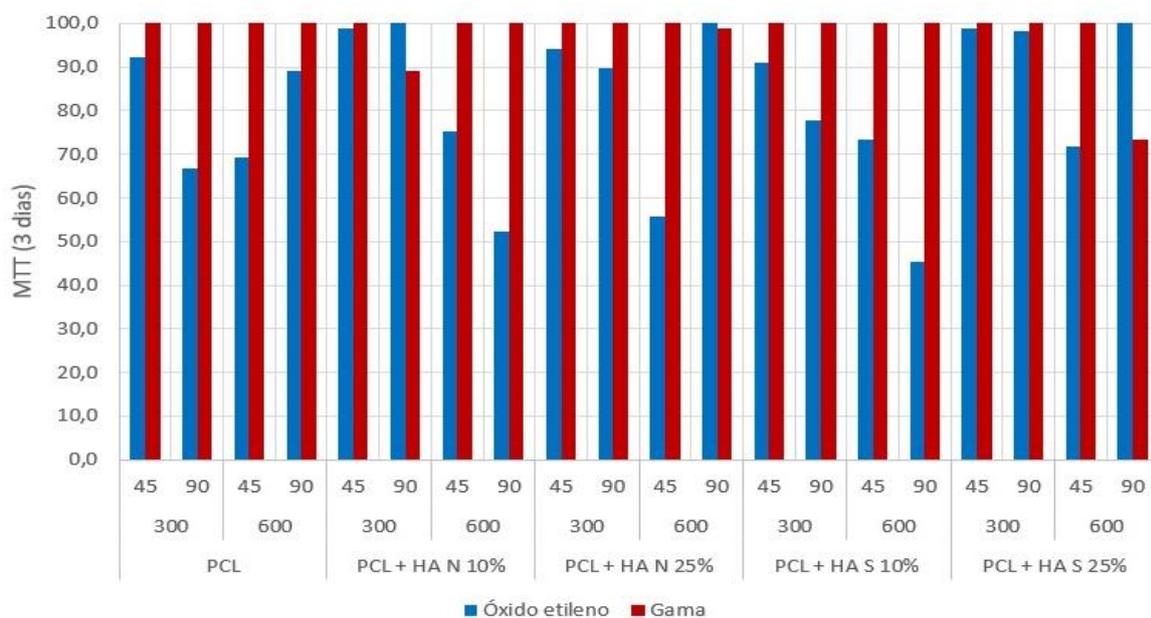


Gráfico 3 – Gráfico relativo ao desempenho biológico das esterilizações dos scaffolds em cultura de macrófagos com o tempo de 3 dias.

4.1.3. Co-Cultura

Relativamente à co-cultura, os resultados obtidos assemelham-se aos resultados apresentados para os fibroblastos, no que diz respeito ao equilíbrio entre as técnicas de esterilização (Quadro 4). Este facto, pode sugerir que os fibroblastos têm uma maior influência no resultado do MTT relativo à co-cultura do que os macrófagos. Apesar de ter sido usada uma proporção de 5 macrófagos para 1 fibroblasto, é de lembrar que os macrófagos não se dividem *in vitro*, só em condições muito específicas, os fibroblastos por sua vez, proliferam e sendo células com prolongamentos de dimensões razoáveis recobrem a estrutura do *scaffold*.

Quadro 4 – Quadro de comparação percentual entre tipos de esterilização para co-cultura.

FORMULAÇÃO			Duração (dias)			
			3		5	
Composição	Espessura de filamento (μm)	Ângulo ($^{\circ}$)	Esterilização (%)			
			OE	Υ	OE	Υ
PCL	300	45	77,06	100,00	100,00	100,00
		90	66,67	100,00	93,79	100,00
	600	45	100,00	86,86	86,73	100,00
		90	44,44	100,00	100,00	83,82
PCL + HAN(10)	300	45	100,00	83,41	100,00	96,63
		90	100,00	68,42	98,93	100,00
	600	45	72,89	100,00	100,00	81,67
		90	58,54	100,00	93,88	100,00
PCL + HAN(25)	300	45	100,00	98,96	91,35	100,00
		90	87,28	100,00	83,90	100,00
	600	45	70,20	100,00	88,89	100,00
		90	100,00	68,31	88,46	100,00
PCL + HAS(10)	300	45	100,00	82,72	100,00	95,95
		90	100,00	89,33	83,80	100,00
	600	45	92,72	100,00	100,00	86,27
		90	67,24	100,00	100,00	84,42
PCL + HAS(25)	300	45	100,00	99,01	100,00	88,67
		90	91,75	100,00	70,71	100,00
	600	45	62,92	100,00	100,00	98,08
		90	100,00	76,80	100,00	97,37
Comparação Geral (%)			45,00	55,00	45,00	55,00

Parece não haver nenhum padrão óbvio na distribuição dos resultados, para os 3 dias de experiência com co-cultura (Gráfico 4). No entanto podem-se tecer-se algumas considerações para casos específicos.

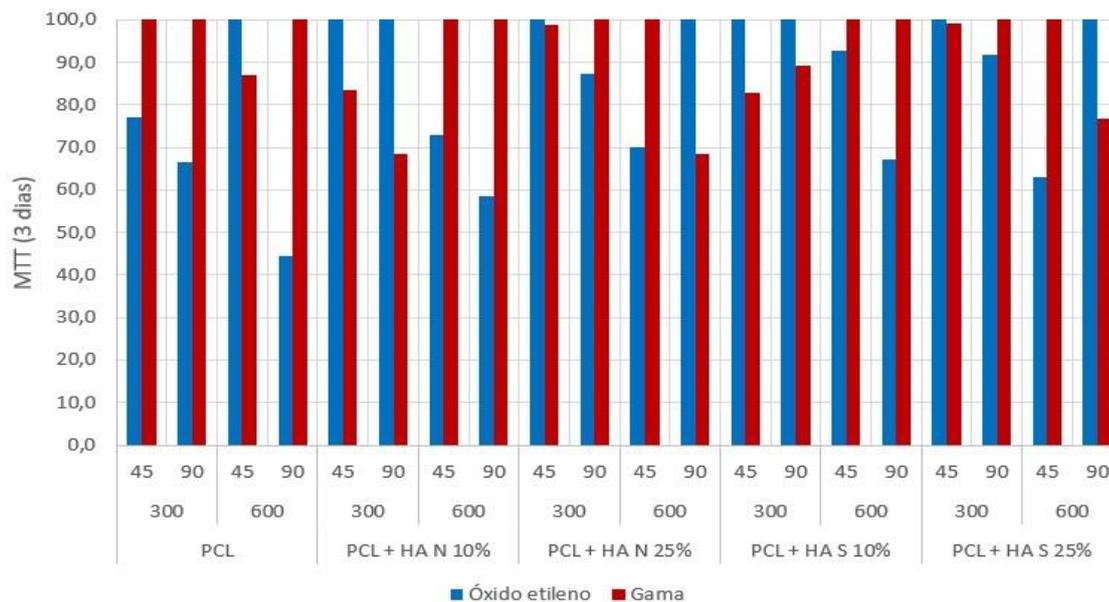


Gráfico 4 – Gráfico relativo ao desempenho biológico das esterilizações dos scaffolds em co-cultura com o tempo de 3 dias

PCL+HAN(10)-300-45 e 90 obteve melhores resultados para a esterilização por óxido de etileno, mas para 600-45 e 90 já foi a radiação gama, tal como para PCL+HAS10)-300-45 e 90 obteve melhores resultados o óxido, mas para 600-45 e 90 é melhor gama.

PCL+HAN(25)-300 45 e 90 e PCL+HAS(25)-300-45 e 90 não revelam uma preferência por nenhum dos tipos de esterilização e têm um comportamento semelhante entre HAN e HAS para 600 45 e 90 de PCL+HA quer N(25) quer S(25) o padrão é semelhante embora um pouco mais alta para 600-90 de S(25) para gama.

É notório que para 5 dias (Gráfico 5) os resultados são bastante mais homogêneos entre os vários tipos de *scaffold*. Nesta fase os macrófagos deveriam começar a estar menos ativos, no entanto, os fatores de crescimento produzidos pelos fibroblastos mantêm-nos em boas condições. Por sua vez, os fibroblastos encontram-se já num nível de atividade considerável [11].

Os valores para 5 dias de experiência obtidos nos *scaffolds* com hidroxiapatite natural são melhores tendencialmente para o caso da radiação gama, enquanto que nos dos *scaffolds* com hidroxiapatite sintética há uma tendência para serem melhores no caso do óxido de etileno.

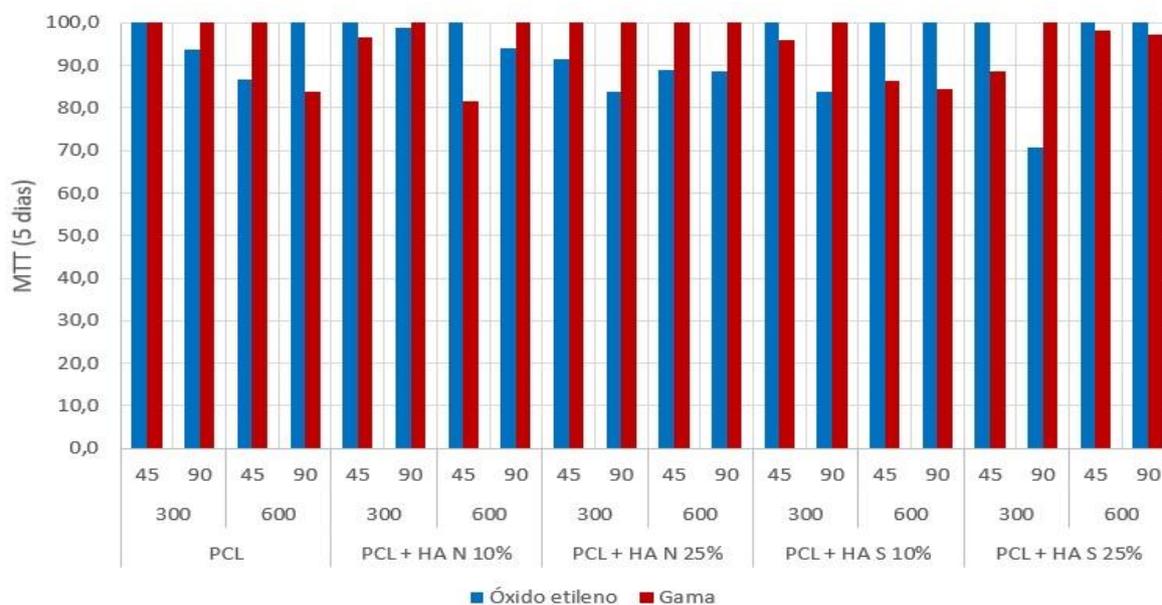


Gráfico 5 – Gráfico relativo ao desempenho biológico das esterilizações dos *scaffolds* em co-cultura com o tempo de 5 dias

4.2. *In vivo*

A avaliação do *scaffolds in vivo* foi feita através da implantação de pequenos pedaços de alguns dos *scaffolds*. Estes foram selecionados mediante os resultados obtidos nas experiências *in vitro*, tendo sido utilizados aqueles cujos resultados se encontraram nos extremos, isto é, os que tiveram melhor e pior desempenho. Ao todo testaram-se 10 tipos de *scaffolds*.

Foram utilizados numa primeira fase 20 ratos *Wistar* e posteriormente mais ratos do mesmo tipo. Os implantes permaneceram nos animais 30 dias, após os quais foi feita a sua análise histológica.

Foram testados 10 tipos de *scaffolds*, 6 dos tipos de *scaffold* escolhidos tinham obtido bons resultados para os ensaios *in vitro*:

- PCL + HAN(25%) – 300 μ m – 90°
- PCL + HAN(10%) – 300 μ m – 45°
- PCL + HAS(10%) – 300 μ m – 45°
- PCL + HAS(25%) – 600 μ m – 45°
- PCL + HAS(25%) – 300 μ m – 90°
- PCL + HAS(25%) – 300 μ m – 45°

4 dos tipos escolhidos obtiveram resultados abaixo da média:

- PCL + HAS(10%) – 300 μ m – 90°
- PCL – 600 μ m – 90°
- PCL + HAN(25%) – 600 μ m – 90°
- PCL + HAS(25%) – 600 μ m – 90°

Para efeitos de controlo foram consideradas bolsas efetuados como se fosse feita a implantação de *scaffolds*, mas sem que o mesmo acontecesse, para assim ter um termo de comparação com uma cicatrização normal da incisão e reorganização dos tecidos.

4.2.1. Controlo

Para termo de comparação é apresentada de seguida a Figura 16, que corresponde a uma das zonas da bolsa de controlo, isto é, sem qualquer tipo de implante. Macroscopicamente não era observável qualquer cicatriz na zona externa e na zona interna visualizava-se uma ligeira opacificação serosa. Observando a preparação histológica ao microscópio ótico, corada com a coloração de rotina (hematoxilina-eosina) registou-se a presença de uma ligeira fibrose e quantidade muito baixa de infiltrado inflamatório, como seria de esperar. Apresenta-se apenas um exemplo do controlo, pois os resultados obtidos foram sempre semelhantes (*Scaffold* PCL + HAN(10%) - 300 μ m - 45°). Podem identificar-se várias estruturas normais da pele: (a) folículos pilosos, (b) fibras de colagénio, (c) base das glândulas sebáceas, (d) tecido celular subcutâneo e (e) miofibras.

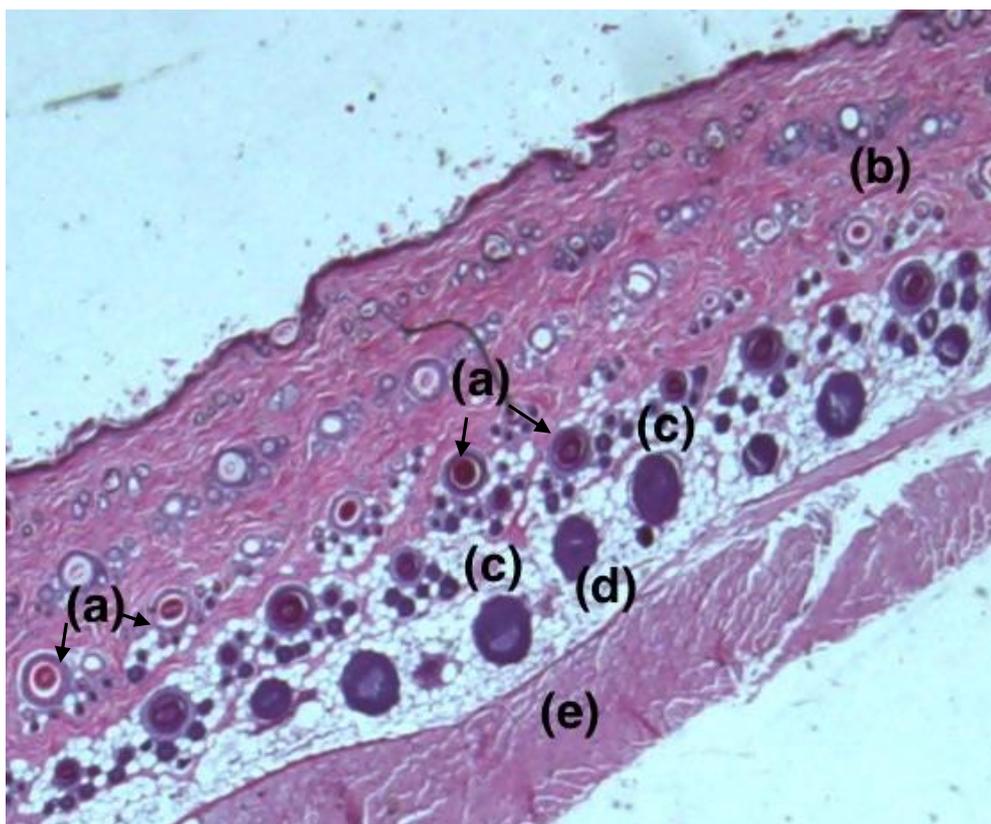


Figura 16 – Imagem de controlo obtida com lupa ótica e ampliação 5,5x, onde se podem ver: (a) folículos pilosos, (b) fibras de colagénio, (c) base das glândulas sebáceas, (d) tecido celular subcutâneo e (e) miofibras.

4.2.2. Scaffold PCL + HAS(25%) – 300 μ m – 45°

4.2.2.1. Óxido de Etileno

Na Figura 17 pode ver-se que o tecido conjuntivo invadiu o *scaffold* (h), é evidente a vascularização (i) e depósitos de grandes quantidades de hidroxiapatite (g), como seria de esperar dada a elevada quantidade presente no *scaffold*. A quantidade de infiltrado inflamatório na fibrose (f) é reduzida, ainda que seja mais evidente do que nos casos de controlo.

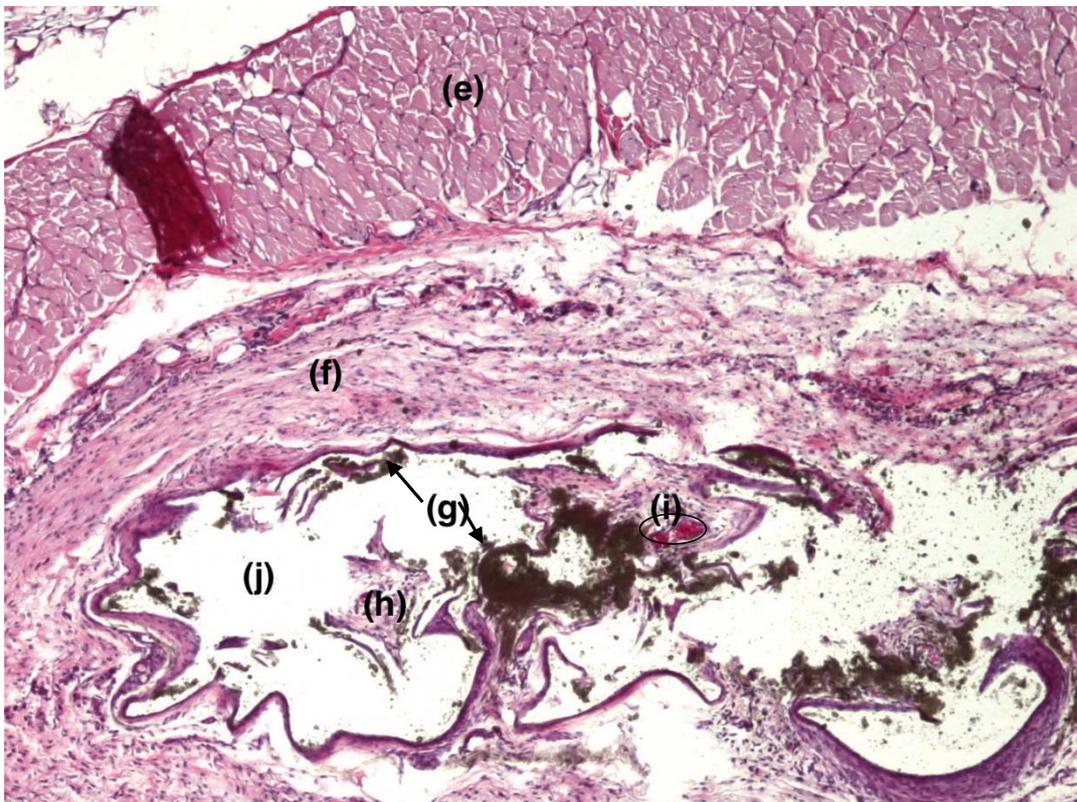


Figura 17 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 300 μ m – 45° obtida ao microscópio ótico com ampliação 40x, em que são visíveis (e) miofibras, (f) fibrose, (g) depósitos de hidroxiapatite, (h) tecido conjuntivo que invadiu o *scaffold*, (i) vasos sanguíneos e (j) zona previamente ocupada pela PCL do *scaffold*. Nota-se a presença de infiltrado inflamatório mas em quantidade reduzida.

4.2.2.2. Radiação Gama

Na Figura 18 é possível notar a presença de uma quantidade de infiltrado inflamatório superior ao encontrado para o mesmo tipo de *scaffold* quando esterilizado por óxido de etileno, isto apesar de a quantidade não ser muito elevada.

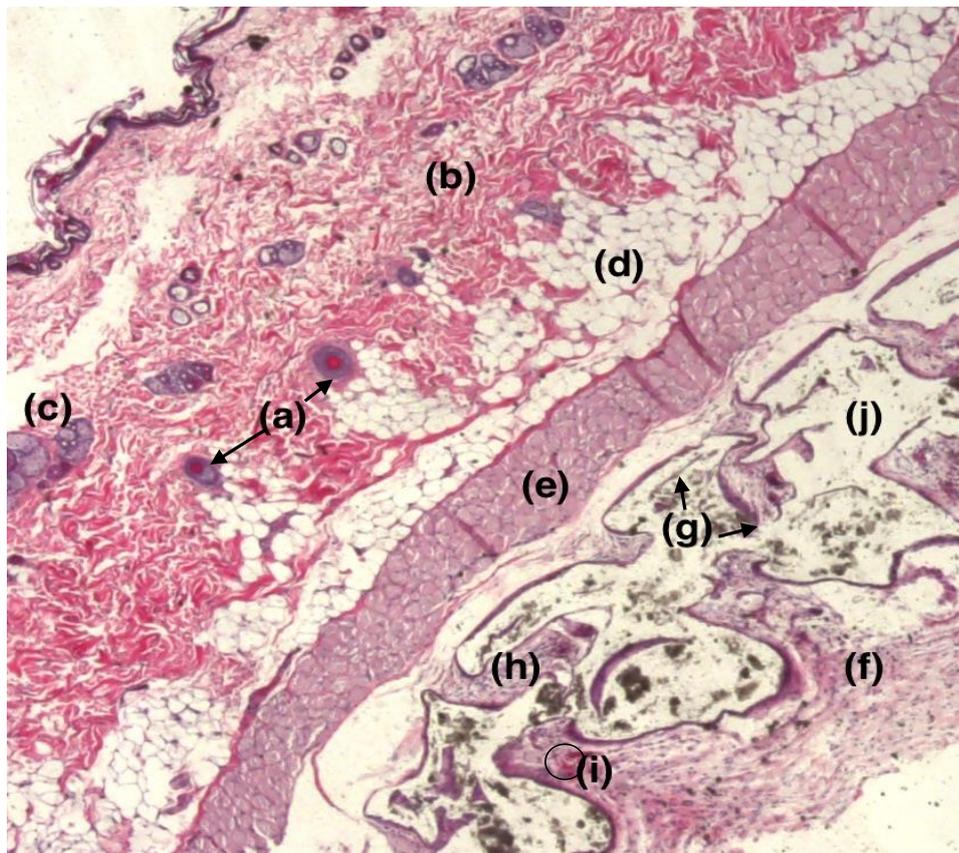


Figura 18– Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 300 μ m – 45° obtida por microscopia ótica com ampliação 20x, em que se podem observar (a) folículos pilosos, (b) fibras de colagénio, (c) glândulas associadas aos folículos, (d) tecido celular subcutâneo, (e) miofibras, (f) fibrose com algum infiltrado inflamatório, (g) depósito de hidroxiapatite, (h) tecido conjuntivo que invadiu o *scaffold*, (i) vasos sanguíneos e (j) zona previamente ocupada pela PCL do *scaffold*.

4.2.3. Scaffold PCL + HAS(10%) – 300 μ m – 90°

4.2.3.1. Óxido de Etileno

A Figura 19 permite observar em detalhe a zona de implantação do pedaço do *scaffold*, onde se vê com maior pormenor as estruturas que vêm sendo identificadas, assim como, a presença de infiltrado inflamatório com alguma quantidade.

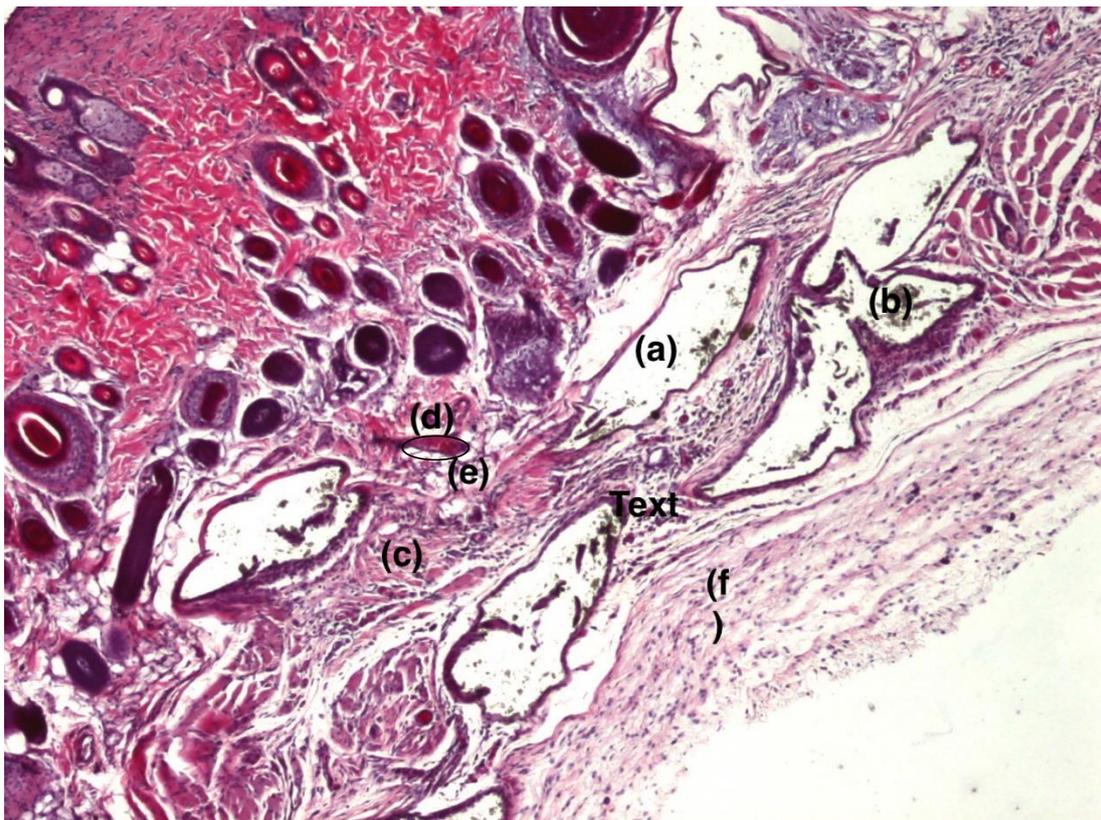


Figura 19 - Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300 μ m – 90° obtida ao microscópio ótico com ampliação de 40x onde são evidentes **(a)** espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, **(b)** depósitos de hidroxiapatite, **(c)** tecido conjuntivo, **(d)** vaso sanguíneo, **(e)** tecido celular subcutâneo invasor, **(f)** fibrose com algum infiltrado inflamatório.

4.2.3.2. Radiação Gama

Na Figura 20 é notória uma quantidade relativamente elevada de infiltrado inflamatório o que evidencia uma reação do organismo ao *scaffold*. O nível de hidroxiapatite depositada é moderado, o que condiz com o facto da quantidade presente no *scaffold* em questão ser de apenas 10% e existirem neovasos sanguíneos.

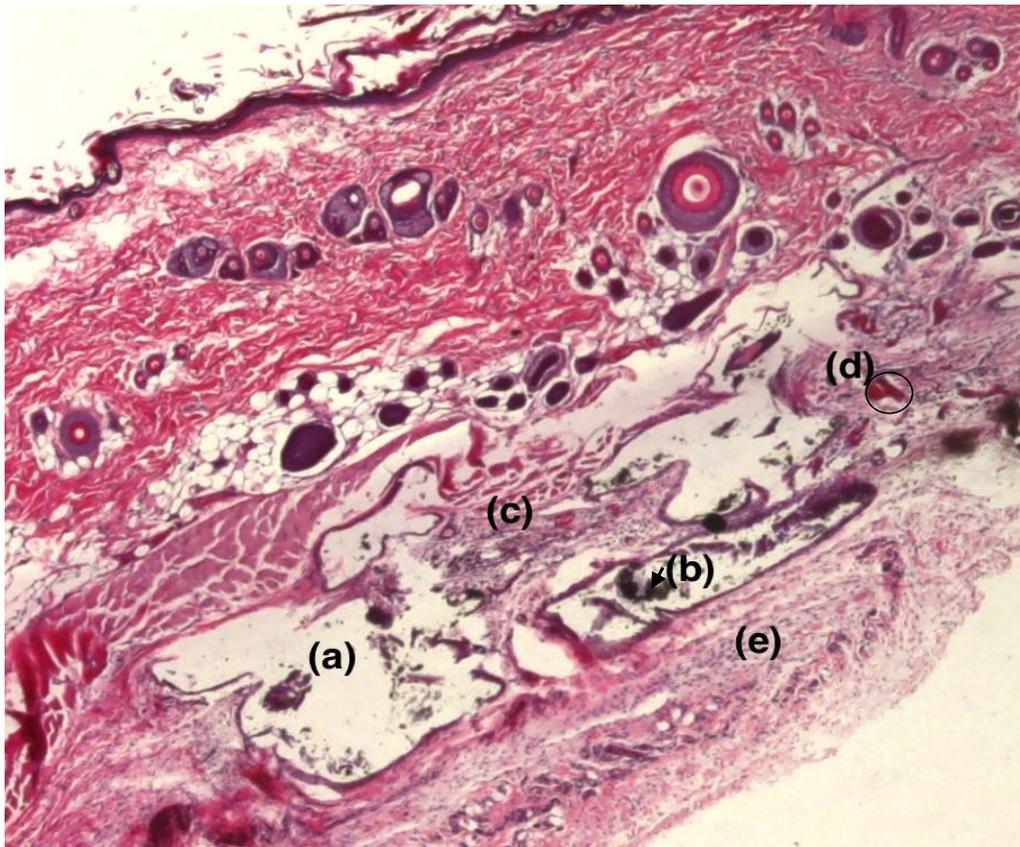


Figura 20 - Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300 μ m – 90° obtida com microscópio ótico e ampliação 20x, em que estão presentes (a) espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor, (d) vaso sanguíneo, (e) fibrose com mais infiltrado inflamatório.

4.2.4. Scaffold PCL + HAS(25%) – 600µm – 45°

4.2.4.1. Óxido de Etileno

Na Figura 21 nota-se a presença de fibras musculares que começam a invadir a zona onde foi feita a intervenção, bem como uma fibrose bastante afastada dessa mesma zona, e ainda, níveis de infiltrado bastante baixos. Observa-se vascularização na zona afetada.

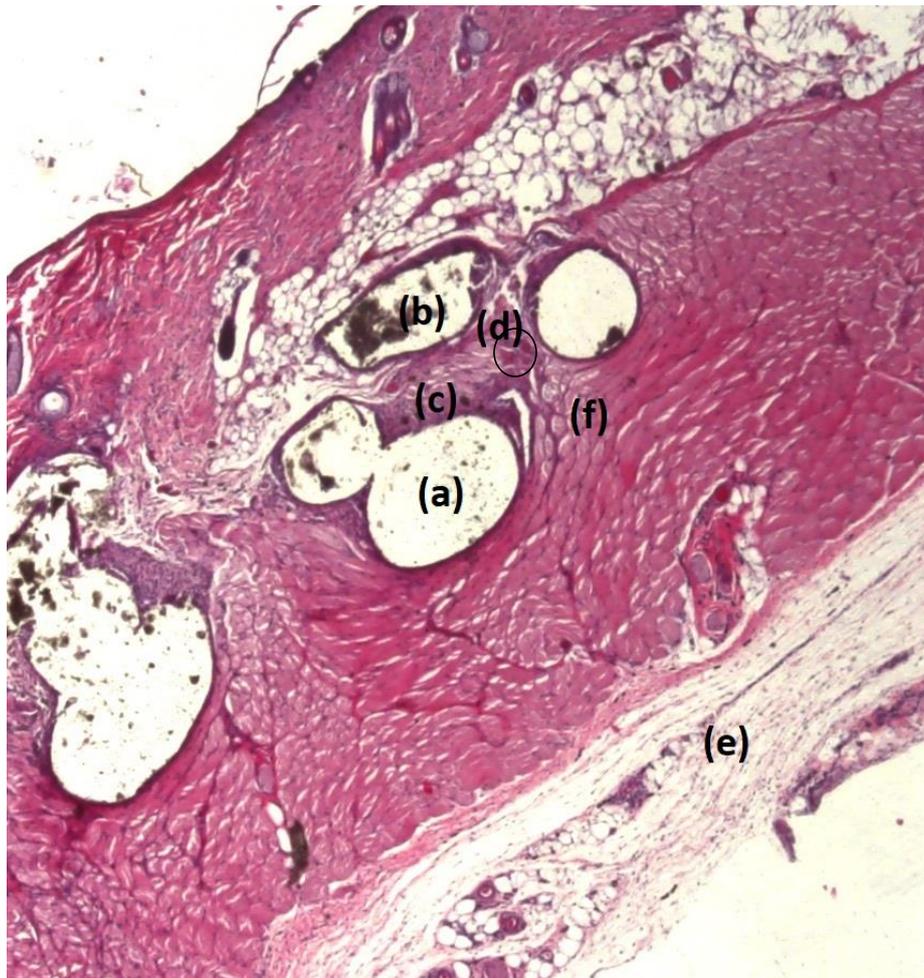


Figura 21 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%)–600µm–45° obtida com microscópio ótico a 20x em que se pode observar (a) espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor, (d) vasos sanguíneos, (e) fibrose afastada do *scaffolds* com pouco infiltrado inflamatório, (f) miofibrilas a invadir a zona do *scaffold*.

4.2.4.2. Radiação Gama

A Figura 22 apresenta uma grande ocupação da zona do *scaffold* por uma zona de fibrose mais desordenada muito junto à zona intervencionada. Há alguma deposição de hidroxiapatite e um vaso sanguíneo bem evidente.

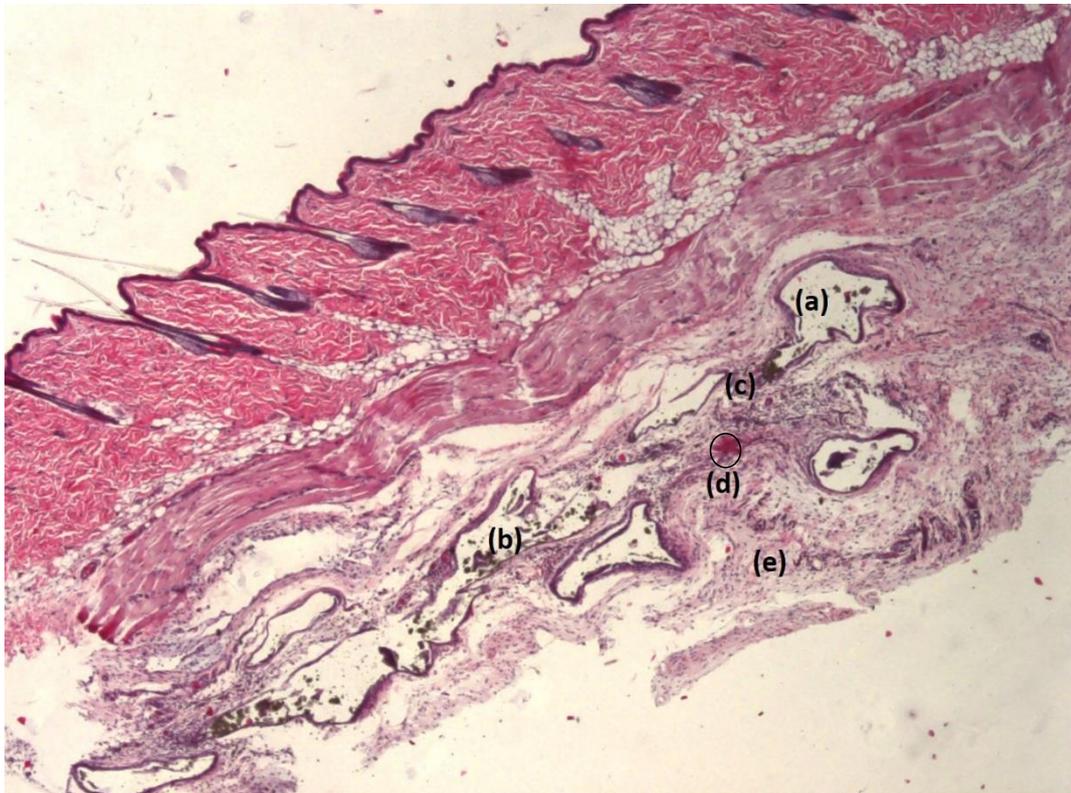


Figura 22 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 600 μ m – 45° obtida através de microscópio ótico com ampliação 20x em que se observa (a) espaço previamente ocupado pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor, (d) vaso sanguíneo, (e) fibrose muito próxima da zona com bastante infiltrado inflamatório.

4.2.5. Scaffold PCL – 600 μ m – 90°

4.2.5.1. Óxido de Etileno

Na Figura 23 é evidente a ausência de depósitos de hidroxiapatite, já que se trata de um *scaffold* composto unicamente por PCL, vendo-se uma vasta zona de fibrose com bastante infiltrado.

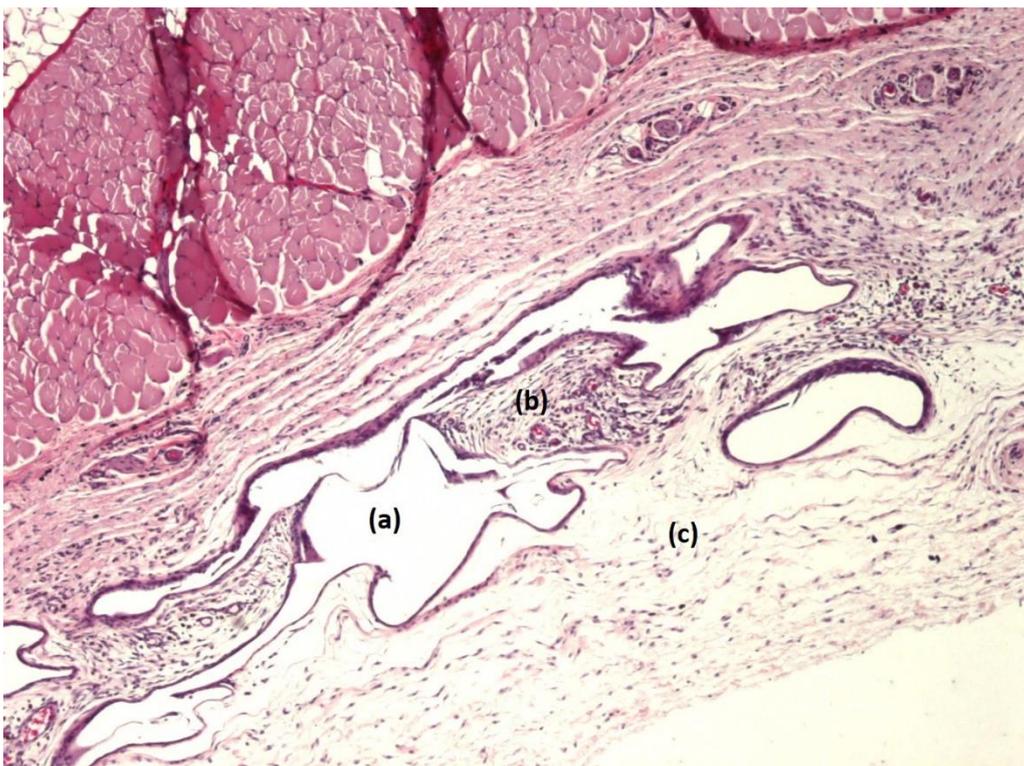


Figura 23 - Imagem do *scaffold* PCL – 600 μ m – 90° obtida com microscópio ótico a 40x em que se observa (a) espaço deixado livre pelo *scaffold* (só PCL), (b) tecido invasor com bastante infiltrado inflamatório e (c) zona de fibrose com algum infiltrado.

4.2.5.2. Radiação Gama

Na Figura 24 evidencia-se uma zona superior com estruturas em evidentes, como os folículos pilosos e glândulas sebáceas associadas, nota-se de novo a óbvia ausência de hidroxiapatite e uma zona de fibrose bem próxima do local alvo e com algum infiltrado inflamatório.

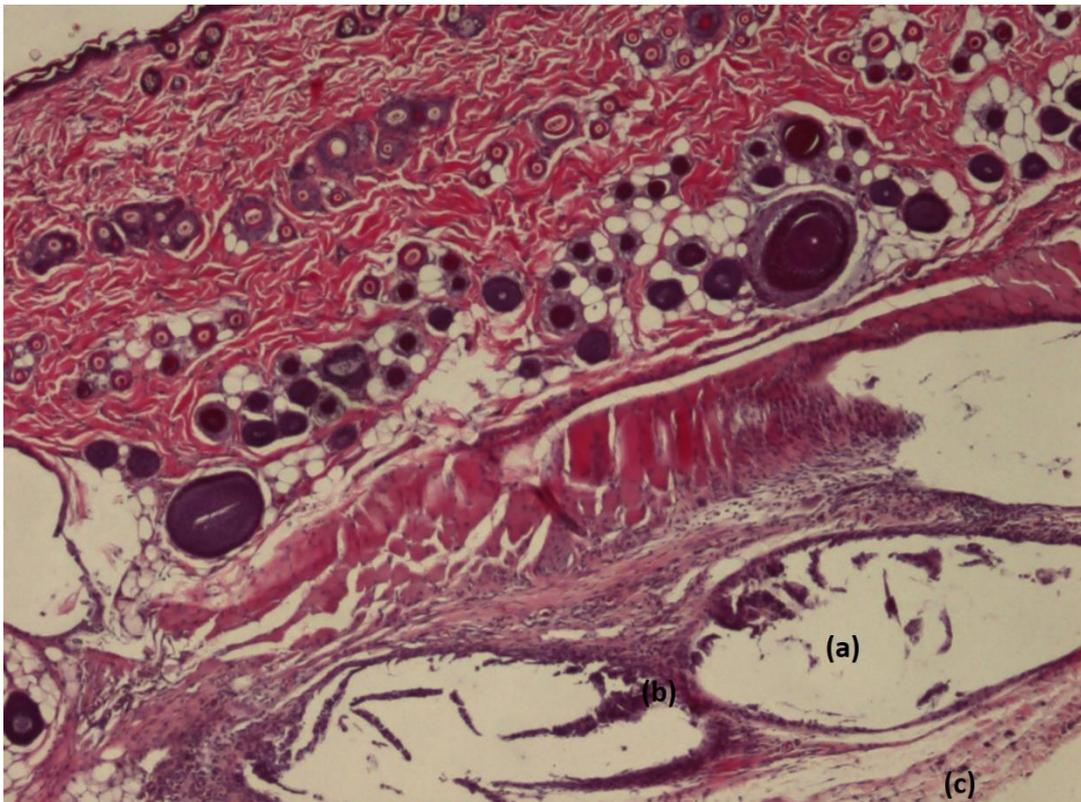


Figura 24 - Imagem do *scaffold* PCL – 600 μ m – 90° obtida ao microscópio ótico a 40x em que se nota **(a)** espaço deixado vago pela PCL, **(b)** tecido conjuntivo que invadiu o *scaffold* e **(c)** fibrose associada à implantação.

4.2.6. Scaffold PCL + HAN(25%) – 300 μ m – 90°

4.2.6.1. Óxido de Etileno

No presente caso (Figura 25), observa-se um grande vazio deixado livre pelo *scaffold* devido ao processamento, deste modo, não se nota vascularização e, apesar de se tratar de uma formulação com elevada quantidade de hidroxiapatite, não são notórios grandes depósitos desta pois foi afastada ao montar a lamela com a cola sintética sobre o corte que é de si mais espesso.

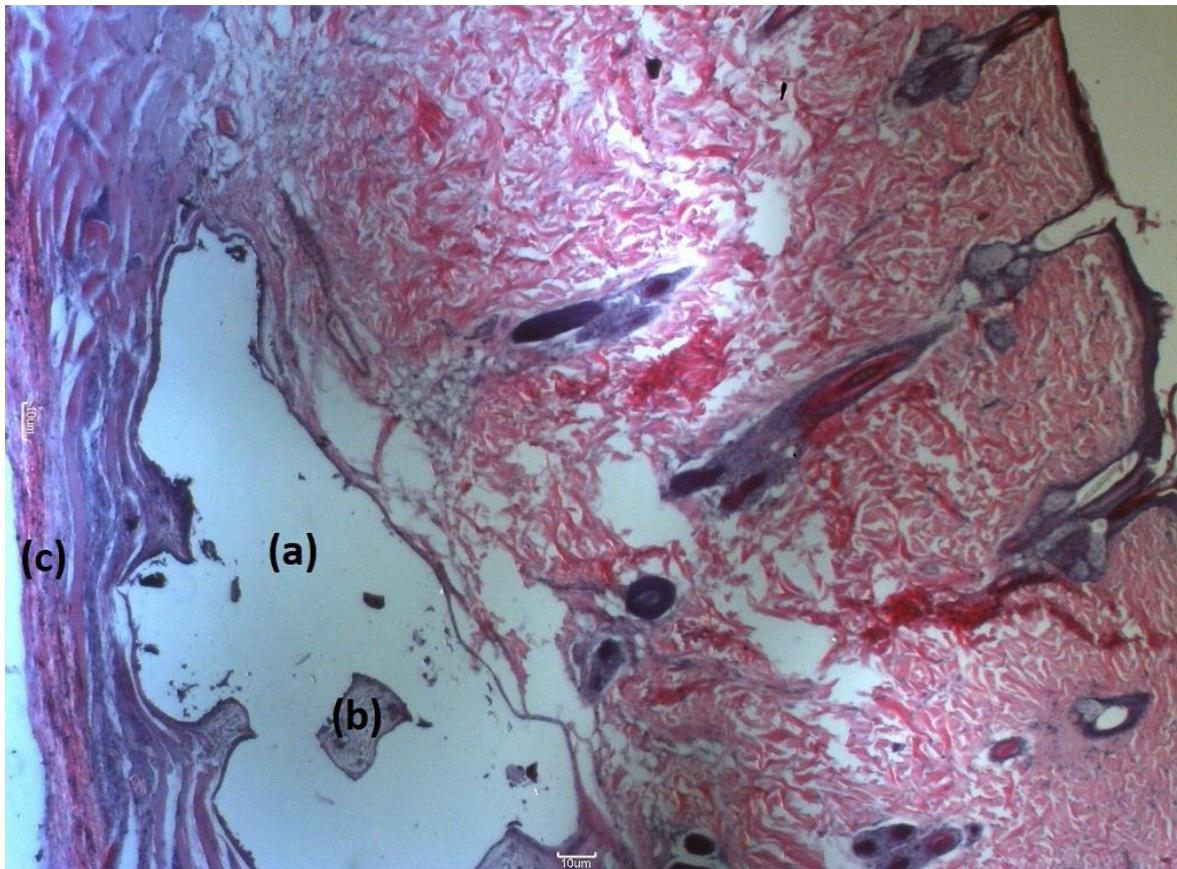


Figura 25 - Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 300 μ m – 90° obtida por microscopia ótica a 40x em que se vê (a) espaço deixado livre pela PCL do *scaffold*, (b) tecido conjuntivo invasor, (c) zona de fibrose.

4.2.6.2. Radiação Gama

No caso da Figura 26, já são evidentes os depósitos de hidroxiapatite e consegue-se ver bem a forma do *scaffold*. No corte não está presente uma grande faixa de fibrose, daí ser difícil avaliar a quantidade de infiltrado inflamatório.

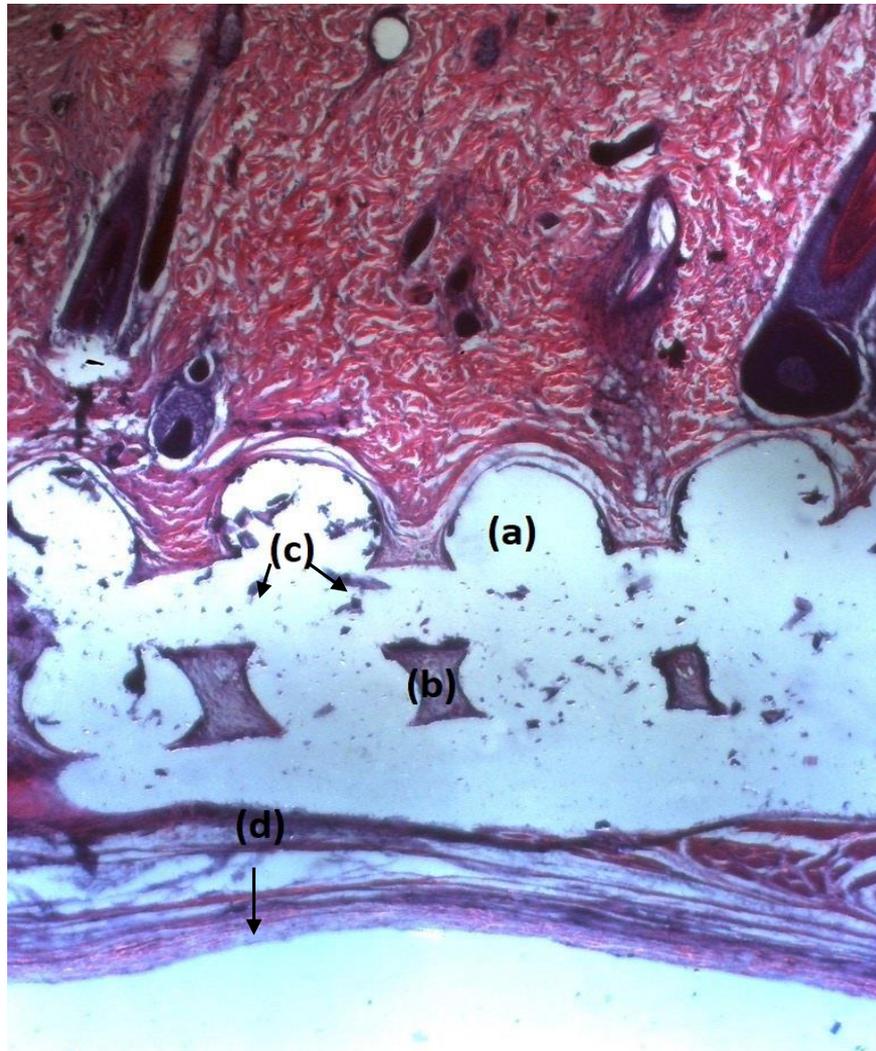


Figura 26 – Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 300 μ m – 90° obtida com microscópio ótico a 40x em que se pode observar (a) espaço deixado livre pela PCL do *scaffold*, (b) tecido conjuntivo invasor, (c) depósitos de hidroxiapatite e (d) fibrose com infiltrado inflamatório.

4.2.7. Scaffold PCL + HAS(10%) – 300 μ m – 45°

4.2.7.1. Óxido de Etileno

Na Figura 27 encontra-se algum depósito de hidroxiapatite e também bastante tecido conjuntivo infiltrado na zona onde estava o *scaffold*. Mais uma vez não existe uma zona muito distinta de fibrose mas parece haver algum infiltrado inflamatório.

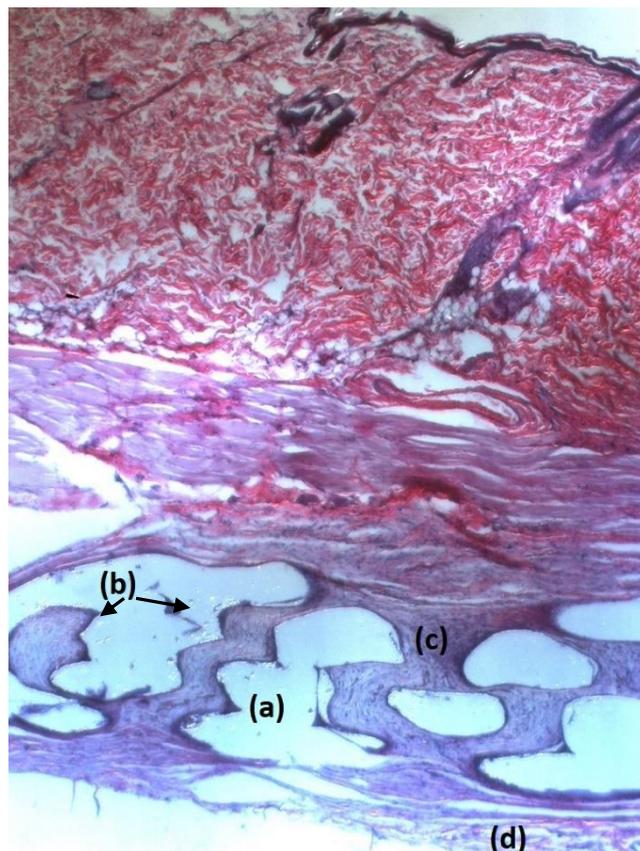


Figura 27 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300 μ m – 45° obtida por microscópio ótico a 40x em que se observa (a) espaço deixado livre pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo que invadiu e contém infiltrado, (d) zona de fibrose circundante.

4.2.7.2. Radiação Gama

A Figura 28 mostra moderados depósitos de hidroxiapatite e uma considerável zona de fibrose onde parece haver bastante infiltrado inflamatório, até na zona infiltrada no *scaffold*, em que a zona de fibrose parece fazer fronteira com miofibrilas.

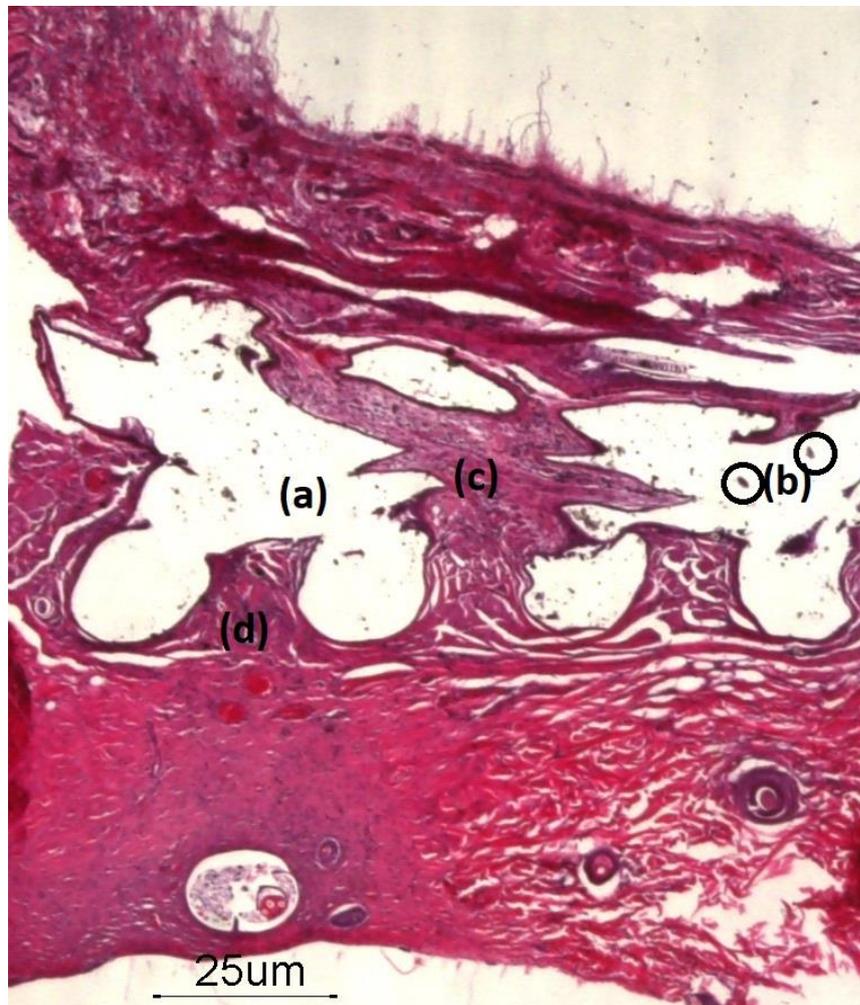


Figura 28 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(10%) – 300µm – 45° obtida com microscópio ótico a 40x com (a) espaço deixado livre pelo *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor e acima de (d) o início da zona de fibrose com bastante infiltrado inflamatório.

4.2.8. Scaffold PCL + HAN(25%) – 600 μ m – 90°

4.2.8.1. Óxido de Etileno

O manuseamento das amostras em que o *scaffold* tem níveis mais altos de hidroxiapatite tende a ser mais difícil, de modo a que para este caso (Figura 29) a zona onde esteve o *scaffold* acabou por se soltar do corte histológico fotografado. São visíveis fibras de colagénio e miofibras aparentemente algo desorganizadas, mas não é possível concluir acerca da quantidade de infiltrado inflamatório e fibrose, e portanto acerca da resposta ao *scaffold*.



Figura 29 – Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 600 μ m – 90° obtida com microscópio ótico a 20x em que se pode observar (a) fibras de colagénio, (b) miofibras algo desorganizadas, (c) zona onde estaria o *scaffold* e (d) vaso sanguíneo.

4.2.8.2. Radiação Gama

Na Figura 30 observa-se a zona onde esteve o *scaffold*, vendo-se que houve bastante invasão de tecido conjuntivo, havendo também bastante infiltrado inflamatório, assim como uma zona de fibrose circundante. Como seria de esperar, é evidente uma grande deposição de hidroxiapatite, que se “esfarela” ao montar a lamela.

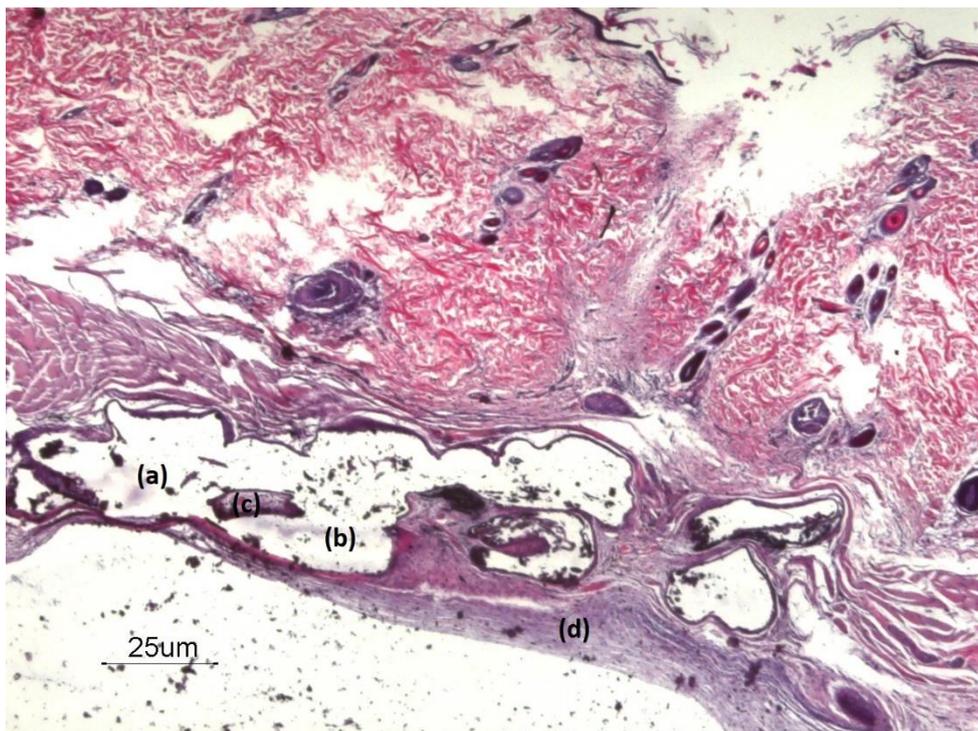


Figura 30 – Imagem do *scaffold* PCL + HAN(25%) – 600 μ m – 90 obtida com microscópio ótico a 40x em que se observa **(a)** espaço deixado pela PCL, **(b)** depósitos de hidroxiapatite, **(c)** tecido conjuntivo invasor com bastante infiltrado inflamatório e **(d)** fibrose circundante com inflamatório.

4.2.9. Scaffold PCL + HAS(25%) – 600µm – 90°

4.2.9.1. Óxido de Etileno

Na Figura 31 observa-se o espaço deixado livre pela PCL a ser bastante invadido por tecido conjuntivo em que se nota algum infiltrado inflamatório. Existem miofibrilhas próximas da zona intervencionada, assim como tecido celular subcutâneo e alguma fibrose mais profunda.

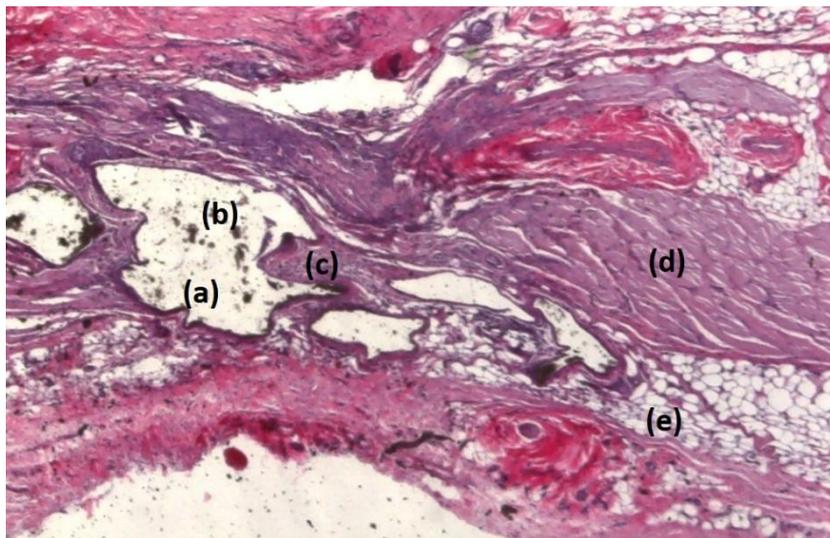


Figura 31 – Imagem do *scaffold* PCL+HAS(25%)–600µm–90° obtida com microscópio óptico e ampliação 20x onde se observa (a) espaço deixado vago pela PCL, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor com infiltrado inflamatório, (d) miofibrilas e (e) tecido celular subcutâneo.

4.2.9.2. Radiação Gama

Na Figura 32 vê-se uma reação inflamatória bastante evidente, com a presença de bastante infiltrado inflamatório no tecido invasor e circundante. Os depósitos de hidroxiapatite não são tão evidentes.

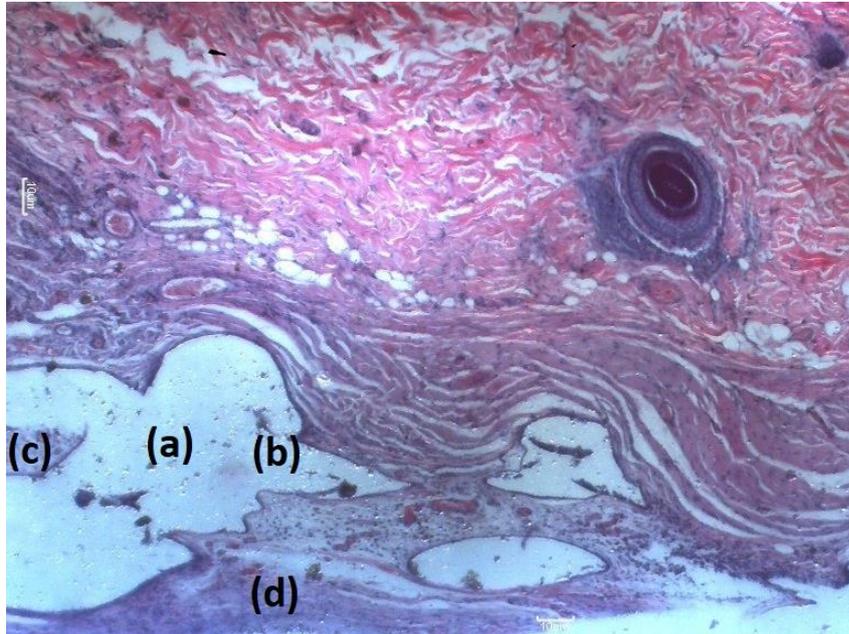


Figura 32 - Imagem do *scaffold* PCL+ HAS(25%)–600 μ m–90° obtida por microscopia ótica a 20x em que se observa (a) espaço deixado vago pela PCL do *scaffold*, (b) depósitos de hidroxiapatite, (c) tecido conjuntivo invasor e (d) zona de fibrosa, em que acima podemos ver bastante infiltrado inflamatório.

4.2.10. Scaffold PCL + HAS(25%) – 300µm – 90°

4.2.10.1. Óxido de Etileno

A Figura 33 também não dá muita informação acerca do infiltrado inflamatório. Terá sido mais um caso de rutura dos tecidos que estavam duros evido à abundância de hidroxiapatite durante a técnica histológica. Contudo, houve uma boa deposição de hidroxiapatite

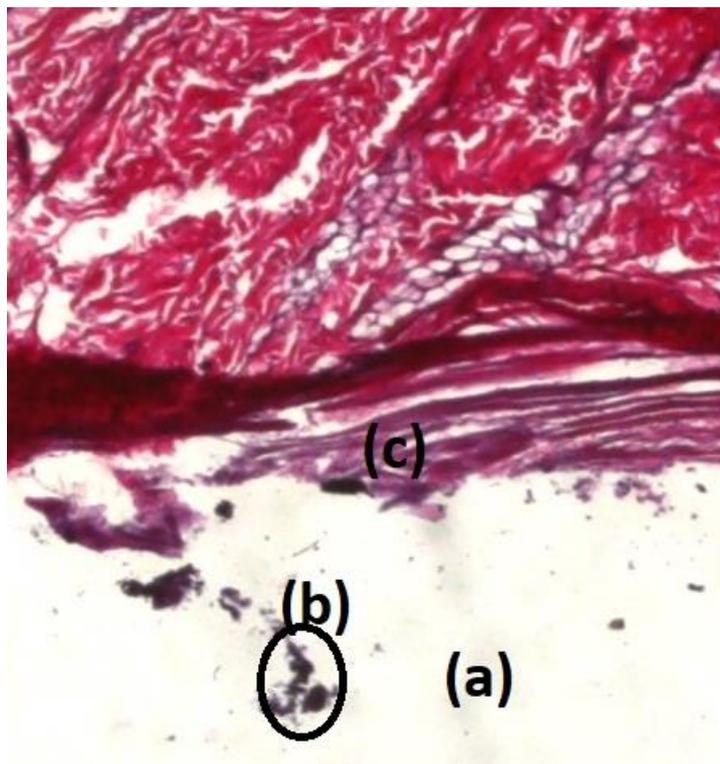


Figura 33 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 300µm – 90° obtida por microscópio ótico a 20x onde se observa (a) espaço deixado vago pela PCL, (b) grandes depósitos de hidroxiapatite e (c) tecido conjuntivo que estaria a tentar invadir.

4.2.10.2. Radiação Gama

Na Figura 34 observa-se uma grande quantidade de infiltrado inflamatório que evidencia uma forte reação à implantação, que está presente, quer no tecido conjuntivo que se infiltrou no *scaffold*, quer na zona inferior de fibrose. Nota-se ainda uma deposição considerável de hidroxiapatite.

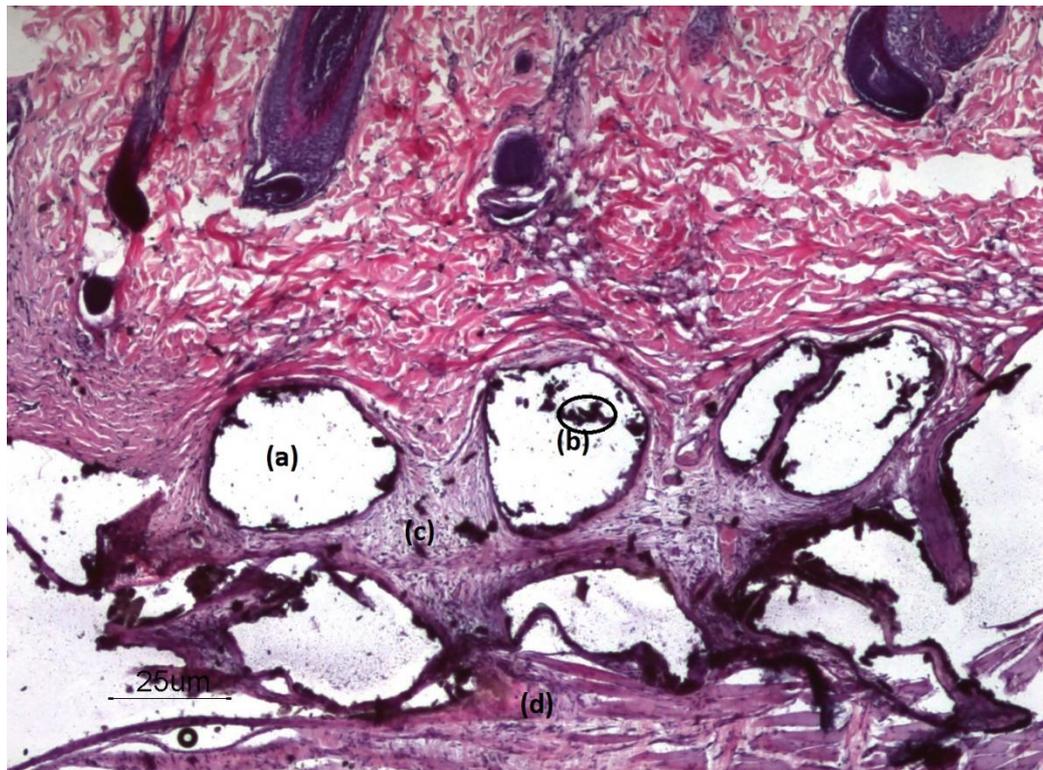


Figura 34 – Imagem do *scaffold* PCL + HAS(25%) – 300µm – 90° obtida por microscópio ótico a 20x em que se observa **(a)** espaço deixado livre pela PCL, **(b)** grande depósito de hidroxiapatite, **(c)** tecido conjuntivo invasor com bastante infiltrado inflamatório e **(d)** zona de fibrose com bastante infiltrado também.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. Conclusões

No que diz respeito à monocultura de macrófagos, os dados apresentaram uma clara tendência deste tipo celular para preferir *scaffolds* esterilizados por radiação gama. A degradação do material causada por este tipo de esterilização será responsável por este comportamento dos macrófagos (células fagocíticas) que vão atacar estes produtos de degradação, o que os mantém ativos. Dois dos únicos 3 casos (em 20) cujos resultados foram melhor com óxido de etileno, têm 25% de hidroxiapatite na sua constituição.

Relativamente à monocultura de fibroblastos, os resultados são, no geral, muito semelhantes, porém, é evidente que a esterilização por radiação gama se apresenta como melhor alternativa no caso dos *scaffolds* compostos unicamente por PCL. Este facto dever-se-á às alterações provocadas pela irradiação na PCL. Estas serão mais óbvias nos casos em que a PCL foi utilizada isoladamente. Os *scaffolds* com maior porosidade obtiveram, no geral, melhores resultados quando esterilizados por óxido de etileno ao fim de 3 dias. Aos 5 dias não se observam padrões muito evidentes, mas pode dizer-se que quando a hidroxiapatite é sintética ou natural na maior concentração, obtiveram-se melhores resultados com a esterilização por óxido de etileno.

Os resultados alcançados a nível da co-cultura são semelhantes aos obtidos para a monocultura de fibroblastos. Regista-se um equilíbrio muito grande entre os dois tipos de esterilização. A dominância dos fibroblastos, no que toca aos resultados, dever-se-á ao facto de este tipo celular proliferar e se caracterizar por possuir prolongamentos de dimensões razoáveis que revestem a superfície dos *scaffolds*. Por seu lado, os macrófagos normalmente não se dividem *in vitro* e tendem a tornar-se menos ativos em poucos dias. Comparando os valores para 5 dias de experiência com os de 3 dias, observa-se que para 5

dias os resultados são mais homogêneos. De referir ainda que *scaffolds* com hidroxiapatite natural na sua constituição parecem ser favorecidos pela esterilização por radiação gama. Aqueles que contêm hidroxiapatite sintética na sua constituição parecem ter tendência a ter um melhor desempenho quando esterilizados por óxido de etileno.

Nenhuma das 10 formulações testadas *in vivo* se revelou tóxica para os tecidos, uma vez que não ocorreram fenómenos de rejeição nem reação inflamatória exagerada do material implantado. Nem sempre se confirmam, para os ensaios *in vivo*, os bons resultados obtidos *in vitro* para alguns dos *scaffolds*. A complexidade de um organismo vivo torna difícil prever o seu comportamento face aos *scaffolds* implantados. Contudo, na maior parte dos casos, os *scaffolds* mais promissores cumpriram com as expectativas. Pôde ser observada uma boa adaptação dos tecidos aos *scaffolds*, ou seja, o modelo *in vivo*, é um bom prolongamento do estudo *in vitro*, dado o local de implantação (subcutâneo). Na generalidade dos cortes histológicos observa-se o desenvolvimento de neovasos no interstício dos *scaffolds*, o que será um bom prognóstico para uma possível aplicação biológica dos *scaffolds*.

Não foi possível testar os *scaffolds* em conjunto com células produtoras de osso em monocultura e cultura acoplada nos ensaios *in vitro*, se assim fosse, poder-se-iam obter previsões mais acertadas relativamente ao sucesso de cada *scaffold in vivo* no tecido ósseo.

Comparando os resultados *in vivo* para os tipos de esterilização observa-se que, na maioria dos casos, a esterilização por óxido de etileno teve um desempenho biológico mais satisfatório. Esta conclusão pode ser retirada da análise das imagens dos cortes histológicos, em que se observam reações inflamatórias menos intensas aos *scaffolds* esterilizados por óxido de etileno. A intensidade da resposta inflamatória pode ser avaliada observando a quantidade de infiltrado inflamatório presente na zona intervencionada.

Em suma, pode assumir-se que não devem ser desconsideradas formulações com base apenas nos resultados *in vitro* obtidos. Será sempre importante continuar a expandir a estatística dos ensaios *in vitro*. Tudo fica em aberto para futuros ensaios incluindo células produtoras de osso, isoladas e combinadas com os tipos celulares já testados.

5.2. Perspetivas Futuras

No que diz respeito aos scaffolds estudados e sua esterilização há ainda muitos testes a fazer para se perceber melhor como tentar selecionar uma formulação para um estudo animal experimental de implantação no osso. Só nesta perspetiva se poderá avançar para uma hipotética aplicação em humanos.

Um estudo interessante a realizar seria a avaliação da alteração das propriedades mecânicas de *scaffolds* produzidos com outras dimensões (8 mm de espessura) quando esterilizados por cada um dos tipos de esterilização utilizados.

Há também que referir que se deveria aumentar a amostragem *in vitro* para qualquer um dos tipos de células testadas (macrófagos e fibroblastos) e co-cultura, para se obter um *n* (numero de amostras) superior e, assim, obter uma melhor validação estatística.

Ainda *in vitro*, seria importante realizar ensaios com células produtoras de osso. As células estaminais mesenquimatosas que lhes dão origem são muito difíceis de extrair e propagar. A metodologia para a sua diferenciação em células produtoras de osso está no bom caminho de refinamento, mas são necessários vários casos para realizar testes. Estas células produtoras de osso seriam depois utilizadas em ensaios de monocultura, em co-cultura com cada um dos dois tipos celulares já testados (macrófagos e fibroblastos) e, finalmente, em tri-cultura (macrófagos, fibroblastos e osteoblastos).

In vivo existem também várias perspetivas para trabalhos futuros. Para além de aumentar o número de implantações subcutâneas para cada formulação e tipo de esterilização, poder-se ia testar a reação inflamatória para menores (como 7 dias) e maiores (como 3 e 6 meses) períodos de experiência, podendo, assim, obter-se uma melhor ideia da resposta do organismo aos implantes.

Idealmente, os ensaios *in vivo* deveriam ser realizados através de implantações ósseas, já que o material testado tem por objetivo substituir e melhorar a regeneração deste tipo de tecido. Na posse dos resultados dos novos testes mecânicos poder-se-iam

programar ensaios *in vivo* com implantação em fêmur de rato para testar a sua integração/substituição óssea. A implantação seria em fêmur de rato já que é o osso maior do corpo do animal (tal como num humano) e as forças a que está sujeito (sendo um animal saltador) pode, de certa forma, simular as tensões a que a zona da mandíbula se encontra exposta durante a mastigação [44] [45]. Com facilidade se poderiam cortar estruturas semelhantes a parafusos ou até falhas ósseas de outros formatos, sem comprometer a sua integridade, mas acautelando o bem-estar animal.

Outra hipótese futura será proceder a modificações de superfície dos scaffolds para melhorar as condições de adesão e proliferação celular (já vista de alguma forma quando se usou a esterilização por plasma que tornou a superfície mais hidrofílica) e testá-los de novo quer em *in vitro*, quer *in vivo*. Porque não realizar tratamento de superfície aplicando sistemas de libertação controlada de substâncias, tais como fatores de crescimento, BMPs, fármacos (ex: anti-inflamatórios).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. Langer and D. A. Tirrell, "Designing materials for biology and medicine," *Nature*, vol. 428, no. 6982, pp. 487–492, 2004.
- [2] G. C. C. Mendes, T. R. S. Brandão, and C. L. M. Silva, "Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review," *Am. J. Infect. Control*, vol. 35, no. 9, pp. 574–581, 2007.
- [3] J. M. Anderson, A. Rodriguez, and D. T. Chang, "Foreign body reaction to biomaterials," *Semin. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 86–100, 2008.
- [4] S. Yang, K.-F. Leong, Z. Du, and C.-K. Chua, "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 6, pp. 679–689, 2001.
- [5] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [6] M. Pei, J. Seidel, G. Vunjak-Novakovic, and L. E. Freed, "Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 294, no. 1, pp. 149–154, 2002.
- [7] N. Sugita, Y. Moriguchi, M. Sakaue, D. Hart, and Y. Yasui, "Optimization of human mesenchymal stem cell isolation from synovial membrane: Implications for subsequent tissue engineering effectiveness," *Regenerative*, vol. 5, pp. 79–85, 2016.
- [8] H. Fernandes, L. Moroni, C. van Blitterswijk, and J. de Boer, "Extracellular matrix and tissue engineering applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, p. 5474, 2009.
- [9] R. Costa-Almeida, R. Soares, and P. L. Granja, "Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2017.
- [10] S. Ghanaati, I. Willershausen, M. Barbeck, R. E. Unger, M. Joergens, R. A. Sader, C. J. Kirkpatrick, and B. Willershausen, "Tissue reaction to sealing materials: different view at biocompatibility," *Eur. J. Med. Res.*, vol. 15, no. 11, pp. 483–92, 2010.
- [11] A. L. Mescher, "Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration," *Regeneration*, vol. 4, no. 2, pp. 39–53, 2017.
- [12] T. J. Koh and L. A. DiPietro, "Inflammation and wound healing: the role of the macrophage," *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 13, no. 2008, p. e23, 2011.
- [13] R. C. Scheid, *Woelfel's Dental Anatomy*, 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [14] "The Roles and Structure of Teeth | Lion Corporation." [Online]. Available: <http://www.lion.co.jp/en/oral/role/01.htm>. [Accessed: 12-Aug-2017].
- [15] "tooth | anatomy | Britannica.com." [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/tooth-anatomy>. [Accessed: 15-Aug-2017].
- [16] "Sistema Digestório | Esquadrão do Conhecimento." [Online]. Available: <https://esquadraodoconhecimento.wordpress.com/ciencias-da-natureza/biologia/biologiasistema-digestivo/>. [Accessed: 21-Aug-2017].
- [17] R. D'Aquino, G. Papaccio, G. Laino, and A. Graziano, "Dental pulp stem cells: A promising tool for bone regeneration," *Stem Cell Rev.*, vol. 4, no. 1, pp. 21–26, 2008.
- [18] G. T.-J. Huang, T. Yamaza, L. D. Shea, F. Djouad, N. Z. Kuhn, R. S. Tuan, and S. Shi, "Stem/Progenitor Cell-Mediated *De Novo* Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an *In Vivo* Model," *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 2, pp. 605–615, 2010.

- [19] P. Guillén and R. F. Veszteg, "On lab rats," *J. Socio. Econ.*, vol. 41, no. 5, pp. 714–720, 2012.
- [20] "CD® IGS Rat | Charles River." [Online]. Available: <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-igs-rat?loc=PT>. [Accessed: 16-Aug-2017].
- [21] "Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de agosto. D.R. n.º 151, Série I — ICNF." [Online]. Available: <http://www.icnf.pt/portal/icnf/legisl/legislacao/2013/dec-lei-113-2013-de-7-agosto-d-r-151-serie-i>. [Accessed: Sep-2017].
- [22] B. J. D. Survana S., Layton Christopher L., *Bancroft's theory and practice of histological techniques*, Seventh Ed. Curchil Livingstone, 2013.
- [23] M. Barbarisi, G. Marino, E. Armenia, Q. Vincenzo, F. Rosso, M. Porcelli, and A. Barbarisi, "Use of polycaprolactone (PCL) as scaffolds for the regeneration of nerve tissue," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 5, pp. 1755–1760, 2015.
- [24] A. Virna, M. Giménez, M. B. Ruiz-Roso, A. B. Camargoc, D. Kassuhaa, and W. Manucha, "Nanotecnologia, un nuevo paradigma en el tratamiento de la aterosclerosis," *Clin. e invetsigación en Arterioscler.*, no. xx, 2016.
- [25] "FOOD MINERAL: Calcium and phosphorus in human bone." [Online]. Available: <http://www.foodmineral.com/2017/05/calcium-and-phosphorus-in-human-bone.html>. [Accessed: Sep-2017].
- [26] P. M. L. Maisara S.M. Arsad, "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles and β -TCP Particles," *2nd Int. Conf. Biotechnol. Food Sci.*, vol. 7, pp. 184–188, 2011.
- [27] M. G. Raucci, D. Giugliano, M. A. Alvarez-Perez, and L. Ambrosio, "Effects on growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by the strontium-added sol-gel hydroxyapatite gel materials," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 2, 2015.
- [28] M. Figueiredo, A. Fernando, G. Martins, J. Freitas, F. Judas, and H. Figueiredo, "Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone," *Ceram. Int.*, vol. 36, no. 8, pp. 2383–2393, 2010.
- [29] S. A. C. Borges F., "Criação de um banco de macrófagos peritoneais de rato e ratinho," licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública, Instituto Piaget Nordeste, 2009
- [30] S. A. C. Matos C., "Estudos de citotoxicidade num modelo de edema pulmonar agudo & Criação de criobanco de macrófagos e fibroblastos de rato e ratinho," Universidade de Coimbra, Dissertação de Mestrado em Bioquímica, 2011.
- [31] C. M. F. Gomes, M. Welling, I. Que, N. V. Henriquez, G. Van Der Pluijm, S. Romeo, A. J. Abrunhosa, M. F. Botelho, P. C. W. Hogendoorn, E. K. J. Pauwels, and A. M. Cleton-Jansen, "Functional imaging of multidrug resistance in an orthotopic model of osteosarcoma using ^{99m}Tc -sestamibi," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 34, no. 11, pp. 1793–1803, 2007.
- [32] S. R. Martins-Neves, W. E. Corver, D. I. Paiva-Oliveira, B. E. W. M. van den Akker, I. H. Briaire-de-Bruijn, J. V. M. G. Bovée, C. M. F. Gomes, and A. M. Cleton-Jansen, "Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ β -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4," *J. Cell. Physiol.*, vol. 231, no. 4, pp. 876–886, 2016.
- [33] M. Domingos, D. Dinucci, S. Cometa, M. Alderighi, P. J. Bártolo, and F. Chiellini, "Polycaprolactone Scaffolds Fabricated via Bioextrusion for Tissue Engineering Applications," *Int. J. Biomater.*, vol. 2009, pp. 1–9, 2009.
- [34] M. Domingos, F. Chiellini, A. Gloria, L. Ambrosio, P. Bartolo, and E. Chiellini, "Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded poly(ϵ -caprolactone) scaffolds," *Rapid Prototyp. J.*, vol. 18, no. 1, pp. 56–67, 2012.
- [35] "Biofabrication - CDRsp." [Online]. Available: <http://cdrsp.ipleiria.pt/laboratory/biofabrication/>. [Accessed: Sep-2017].

-
- [36] P. Coimbra, J. P. Almeida, A. C. Santos, S. Pereira, H. P. Cunha, B. Oliveiros, and C. Capela, *Characterization of poly (caprolactone)/ hydroxyapatite composite scaffolds produced by a melt extrusion additive manufacturing technique*. 2016.
- [37] P. Flecknell, "Replacement, reduction and refinement," *ALTEX*, vol. 19, no. 2, pp. 73–78, 2002.
- [38] S. Pereira, "From scaffolds to endodontic sealers in dentistry: an in vitro and in vivo approach," Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, 2015.
- [39] C. Silva, "Avaliação do método de esterilização na adesão e proliferação de várias linhas celulares em scaffolds de compositos de poli(e-caprolactona)/hidroxiapatite produzidos por uma técnica de fabricação aditiva," Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, 2016.
- [40] A. Nascimento, "Reconstruction plastique du membre supérieur - investigation anatomique at application chirurgicale et Régénération lymphatique en réimplantations et lambeaux vascularisés dans la chirurgie expérimentale et clinique," Tese de Doutoramento em Ciências da Vida e da Matéria, Especialidade de Ortopedia/Cirurgia Plástica Reconstructiva, da Universidade René Descartes - Paris V (U.F.R. Biomédicale Saints-Pères) e Doctor Communitatis Europæ (Tese de Doutoramento Europeu), 1994.
- [41] R. Hamid, Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh, and P. Bullock, "Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening," *Toxicol. Vitr.*, vol. 18, no. 5, pp. 703–710, 2004.
- [42] B. L. Carlson, J. L. Pokorny, M. A. Schroeder, and J. N. Sarkaria, "Establishment, maintenance and in vitro and in vivo applications of primary human glioblastoma multiforme (GBM) xenograft models for translational biology studies and drug discovery," *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 52, no. 14, pp. 1–14, 2011.
- [43] Z. Dai, J. Ronholm, Y. Tian, B. Sethi, and X. Cao, "Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications," *J. Tissue Eng.*, vol. 7, 2016.
- [44] N. Harada, Y. Watanabe, K. Sato, S. Abe, K. Yamanaka, Y. Sakai, T. Kaneko, and T. Matsushita, "Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold," *Biomaterials*, vol. 35, no. 27, pp. 7800–7810, 2014.
- [45] Y. Li, S. K. Chen, L. Li, L. Qin, X. L. Wang, and Y. X. Lai, "Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials," *J. Orthop. Transl.*, vol. 3, no. 3, pp. 95–104, 2015.

ANEXO A - ESTATÍSTICA

Macrófagos – Valores de p

Formulação			Duração (dias)
Composição	Espessura de filamento	Ângulo (°)	3
			p
PCL	300	45	0,029
		90	0,029
	600	45	0,029
		90	0,267
PCL + HAN(10)	300	45	0,200
		90	0,029
	600	45	0,029
		90	0,004
PCL + HAN(25)	300	45	0,114
		90	0,029
	600	45	0,257
		90	0,343
PCL + HAS(10)	300	45	0,114
		90	0,343
	600	45	0,029
		90	0,029
PCL + HAS(25)	300	45	0,686
		90	0,808
	600	45	0,029
		90	0,029

Fibroblastos – Valores de p

Formulação			Duração (dias)	
Composição	Espessura de filamento	Ângulo (°)	3	7
			p	p
PCL	300	45	1,000	0,533
		90	0,133	0,133
	600	45	0,016	0,333
		90	0,533	0,400
PCL + HAN(10)	300	45	1,000	0,476
		90	1,000	1,000
	600	45	0,343	0,065
		90	0,114	1,000
PCL + HAN(25)	300	45	1,000	0,199
		90	0,133	0,343
	600	45	0,114	0,643
		90	0,171	0,667
PCL + HAS(10)	300	45	0,133	0,010
		90	1,000	0,133
	600	45	1,000	0,286
		90	0,478	1,000
PCL + HAS(25)	300	45	0,629	1,000
		90	1,000	0,038
	600	45	0,007	0,071
		90	0,004	0,071

Co-Cultura – Valores de p

Formulação			Duração (dias)	
Composição	Espessura de filamento	Ângulo (°)	3	5
			p	p
PCL	300	45	0,029	1,000
		90	0,029	0,100
	600	45	0,286	0,100
		90	0,133	0,700
PCL + HAN(10)	300	45	0,029	0,833
		90	0,029	1,000
	600	45	0,029	0,400
		90	0,114	0,833
PCL + HAN(25)	300	45	0,486	1,000
		90	0,029	1,000
	600	45	0,029	0,400
		90	0,029	0,700
PCL + HAS(10)	300	45	0,029	0,700
		90	0,029	1,000
	600	45	0,343	0,100
		90		0,100
PCL + HAS(25)	300	45	0,057	0,100
		90	0,154	0,400
	600	45	0,029	1,000
		90	0,029	0,700

ANEXO B – RELATÓRIO DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NOS SCAFFOLDS

Efeito da esterilização por radiação gama nas propriedades dos scaffolds compósitos de PCL e Hidroxiapatite

Nomenclatura

PCL – Scaffolds de Policaprolactona

PCL-HS – Scaffolds compósitos de PCL/ hidroxiapatite sintética

PCL-HX – Scaffolds compósitos de PCL/ hidroxiapatite xenogénica (natural)

0 – Scaffolds não irradiados

5 - Scaffolds irradiados com 5 kGy

15 - Scaffolds irradiados com 15 kGy

25 - Scaffolds irradiados com 25 kGy

35 - Scaffolds irradiados com 35 kGy

Análises

Análise Termogravimétrica

A percentagem de PCL nos scaffolds e a temperatura de degradação do polímero foram determinadas por termogravimetria (TA Instruments SDT Q600). A perda de massa das amostras em função da temperatura foi observada entre a temperatura ambiente e os 600°C. Para cada composição (PCL, PCL-HS, PCL-HX) foram analisadas as amostras não irradiadas (0 kGy) e irradiadas com 5, 15, 25, e 35 kGy. As amostras não irradiadas foram analisadas em triplicado

Calorimetria Diferencial de Varrimento

A temperatura de fusão e a entalpia de fusão da PCL nos scaffolds foram determinadas por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) (TA Instruments DSC

Q100). As amostras foram analisadas entre os 0° e 100°C, utilizando uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Para cada composição (PCL, PCL-HS, PCL-HX) foram analisadas as amostras não irradiadas (0 kGy) e irradiadas com 5, 15, 25 e 35 kGy. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

O Grau de cristalinidade da PCL (X_c) foi determinado pela seguinte expressão:

$$X_c (\%) = \frac{\Delta H_f}{w_{PCL} \times \Delta H_{PCL}^0} \times 100$$

Onde ΔH_f (J/g) é a entalpia de fusão da PCL nas amostras, w_{PCL} , a fracção mássica de PCL nos scaffolds, e ΔH_{PCL}^0 (J/g) a entalpia de fusão da PCL 100% cristalina (135,4 J/g [1]).

O erro associado ao cálculo de X_c foi calculado pela seguinte expressão:

$$\sigma_{X_c} = \frac{100}{w_{PCL} \times \Delta H_{PCL}^0} \times \sqrt{\sigma_{\Delta H_f}^2 + \frac{\Delta H_f^2}{w_{PCL}^2} \times \sigma_{w_{PCL}}^2}$$

Onde $\sigma_{\Delta H_f}$ é o desvio padrão da entalpia de fusão da PCL em cada scaffold (n=3) e $\sigma_{w_{PCL}}$ é o desvio padrão da fracção mássica de PCL para cada tipo de scaffolds (n=11).

Cromatografia de Exclusão de Tamanhos

A distribuição de pesos moleculares da PLC foi determinada por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) (VISCOTEK GPCMAX-TDA305, Malvern Instruments). Os scaffolds foram dissolvidos em tetrahidrofurano (THF) de forma a obter uma solução de PCL com uma concentração de aproximadamente 10 mg/ml. As soluções obtidas foram filtradas e injectadas, utilizando como eluente THF (1ml/min). O peso molecular médio numérico (M_n), o peso molecular médio mássico (M_w) foram determinados com base numa curva de calibração construído com amostras padrão de poli(estireno). Para cada composição, analisaram-se os scaffolds não irradiados, irradiados com 15 kGy, e irradiados com 35 kGy).

Análise Estatística

Os resultados da temperatura de fusão e do grau de cristalinidade foram avaliados com testes de análise de variância a um factor (one way ANOVA). Nos casos em que os resultados da ANOVA indicaram diferenças estatisticamente significativas, utilizou-se o teste de Holm-Sidak para comparar os resultados dos vários grupos com o grupo controlo (scaffolds não irradiados). Estes testes foram executados com o módulo de estatística do programa Sigma-Plot 12.0. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

As propriedades térmicas da PCL nos scaffolds sujeitos a diferentes doses de radiação são apresentadas na Tabela 1. Para o grupo dos scaffolds sem hidroxiapatite (PCL), e para o grupo dos scaffolds com hidroxiapatite xenogénica (PCL-HX), não há alterações na temperatura de fusão (T_f) ($p= 0,254$ e $p= 145$, respectivamente). Para o grupo dos scaffolds com hidroxiapatite sintética (PCL-HS), a análise ANOVA indicou diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,044$). No entanto, o teste estatístico subsequente não detectou diferenças entre a T_f dos scaffolds irradiados e a T_f dos scaffold não irradiado.

Quanto ao grau de cristalinidade da PCL (X_c), verificou-se que não há alterações estatisticamente significativas em nenhum dos três grupos.

Relativamente à temperatura de degradação da PCL, para os scaffolds só com PCL e os scaffolds PCL-HS, a temperatura de degradação da PCL nos scaffolds irradiados é idêntica à temperatura de degradação dos scaffolds não irradiados. Nos scaffolds com hidroxiapatite xenogénica (PCL-HX), a temperatura de degradação da PCL altera-se significativamente, ocorrendo a uma temperatura cerca de 100°C abaixo da registada para os outros grupos. Isto verifica-se para todos os scaffolds com esta composição – irradiados e não irradiados. A explicação para este resultado estará provavelmente na composição química da hidroxiapatite xenogénica, que possivelmente incorpora pequenas quantidades de outras formas inorgânicas (como por exemplo carbonato de cálcio e óxido de cálcio) que promovem a degradação térmica da PCL.

Tabela 1. Propriedades térmicas da PCL.

DR (kGy)	T _f (°C)	ΔH _f (J/g)	X _c (%)	T _{degradação} (°C)
PCL-0	62,2 ± 0,5	85,0 ± 5,6	64,9 ± 4,5	407,7 ± 1,2
PCL-5	62,9 ± 0,7	85,3 ± 4,8	65,1 ± 3,9	407,8
PCL-15	62,9 ± 0,1	82,5 ± 10,5	62,9 ± 8,1	407,6
PCL-25	63,3 ± 0,6	89,9 ± 1,7	68,6 ± 1,9	406,4
PCL-35	62,6 ± 0,6	94,2 ± 7,5	71,9 ± 5,9	407,2
PCL-HS-0	62,5 ± 0,5	67,7 ± 6,9	63,7 ± 6,6	404,3 ± 0,3
PCL-HS-5	62,5 ± 0,2	79,5 ± 11,4	74,7 ± 10,8	404,2
PCL-HS-15	62,5 ± 0,7	71,3 ± 3,3	67,1 ± 3,3	403,1
PCL-HS-25	63,8 ± 0,8	68,5 ± 1,5	64,4 ± 1,9	404,2
PCL-HS-35	63,7 ± 0,8	67,4 ± 6,5	63,4 ± 6,2	405,8
PCL-HX-0	63,7 ± 1,2	64,5 ± 3,6	64,2 ± 3,8	304,4 ± 1,3
PCL-HX-5	63,4 ± 0,8	62,4 ± 1,9	62,2 ± 2,3	306,6
PCL-HX-15	62,5 ± 0,2	65,8 ± 3,4	65,6 ± 3,6	310,7
PCL-HX-25	62,4 ± 0,1	67,6 ± 1,2	67,4 ± 1,8	306,9
PCL-HX-35	63,4 ± 0,7	66,1 ± 1,3	65,9 ± 1,8	309,7

O peso molecular numérico médio (M_n), o peso molecular mássico médio (M_w), e o índice de polidispersividade (M_w/M_n) da PCL presente nos scaffolds, determinados por cromatografia de exclusão de tamanhos, são apresentados na Tabela 2.

O peso molecular médio mássico da PCL nos scaffolds não irradiados PCL e PCL-HX é de cerca de 73 kDa. Nestes scaffolds, M_w diminui com o aumento da dose de radiação atingindo, para a dose mais elevada, um valor à volta de 60 kDa. Adicionalmente, o índice de polidispersividade (M_w/M_n) é maior para os scaffolds irradiados e aumenta com a dose de radiação. Estes resultados indicam que a radiação gama degrada as cadeias de PCL, conforme o que se encontra descrito na literatura.

Nos scaffolds de PCL-HS, o M_w obtido para os scaffolds não irradiados é significativamente mais baixo do que para os outros dois tipos de scaffolds- cerca de 52 kDa – e curiosamente este valor aumenta ligeiramente para as duas doses de irradiação. No entanto, tal como para os outros dois tipos de scaffolds, o índice de polidispersividade aumento com a dose de radiação. Estes resultados são inesperados. Uma explicação simples e possível é que a PCL utilizada na fabricação dos scaffolds PCL-HS é diferente da utilizada para fabricar os outros scaffolds e, ao que parece, mais resistente a sofrer degradação quando irradiada. De qualquer forma esta análise terá de ser repetida com os scaffolds que serão sujeitos aos ensaios mecânicos.

Tabela 2. Peso molecular médio da PCL.

Scaffolds	M_n (Da)	M_w (Da)	M_w/M_n
PCL-0	42 900	73 700	1,721
PCL-15	38 300	69 800	1,820
PCL-35	32 000	62 600	1,955
PCL-HX-0	41 900	73 400	1,753
PCL-HX-15	36 000	65 300	1,811
PCL-HX-35	30 900	57 900	1,870
PCL-HS-0	30 900	52 600	1,691
PCL-HS-15	30 900	54 500	1,765
PCL-HS-35	30 800	56 000	1,820

Conclusões

As propriedades térmicas da PCL parecem não sofrer grandes alterações devido à radiação gama, isto dentro dos limites investigados. Pelo contrário, a radiação gama afecta o peso molecular o índice de polidispersividade da PCL, pelo menos nos scaffolds PCL e PCL-HX. Resta saber como é que estas diferenças se reflectem nas propriedades mecânicas dos scaffolds.

Referências

- [1] L. A. Bosworth, A. Gibb, S. Downes. Gamma Irradiation of Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Fibers Affects Material Properties but Not Cell Response. *Journal of Polymer Science Part B*, 2012, 50, 870–876 (DOI: 10.1002/polb.23072).

ANEXO C – RELATÓRIO DO CTN



Avaliação da aplicabilidade da radiação gama como método de esterilização de scaffolds - Ensaio microbiológico -

AMOSTRAS

Amostras:

Tabela 1 – Listagem e informação das amostras utilizadas.

Designação	Composição	Peso (g)	Data de análise
1	HA natural (25%); 600 µm; 45º	0,26	2/06/16
2	HA natural (25%); 300 µm; 45º	0,33	2/06/16
3	HA natural (25%); 300 µm; 90º	0,31	19/05/16
4	HA natural (25%); 600 µm; 90º	0,20	2/06/16
5	HA natural (10%); 600 µm; 90º	0,17	2/06/16
6	HA natural (10%); 600 µm; 45º	0,11	19/05/16
7	HA natural (10%); 300 µm; 45º	0,19	19/05/16
8	HA natural (10%); 300 µm; 90º	0,18	2/06/16
9	HA sintética (10%); 600 µm; 90º	0,11	2/06/16
10	HA sintética (10%); 600 µm; 45º	0,15	19/05/16
11	HA sintética (10%); 300 µm; 90º	0,42	2/06/16
12	HA sintética (10%); 300 µm; 45º	0,17	19/05/16
13	HA sintética (25%); 600 µm; 90º	0,18	2/06/16
14	HA sintética (25%); 600 µm; 45º	0,17	19/05/16
15	HA sintética (25%); 300 µm; 90º	0,26	19/05/16
16	HA sintética (25%); 300 µm; 45º	0,13	2/06/16
17	PLC; 600 µm; 90º	0,18	19/05/16
18	PLC; 600 µm; 45º	0,20	19/05/16
19	PLC; 300 µm; 45º	0,28	2/06/16
20	PLC; 300 µm; 90º	0,18	2/06/16

METODOLOGIA

Ensaio de Esterilidade aos scaffolds irradiados a 25 kGy

Amostras:

1-15; 18-20: Tubos com amostras de scaffolds irradiadas a 25 kGy;

16 e 17: Tubos com amostras de scaffolds contaminado artificialmente com aproximadamente 10^5 UFC de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e posteriormente irradiados a 25 kGy.

Irradiações: Posição H:25 cm; P:19 cm (débito de dose 1,51 kGy/h) da PRECISA22 – câmara de irradiação experimental de Co-60 (IRIS, CTN/IST). Irradiação com rotação e em simultâneo para 10 amostras em tubos de 15 ml (tipo falcon).

Dosimetria de rotina: 3 dosímetros Amber 3042 lote X (Harwell) por cada dose de irradiação; leitura da absorvância dos dosímetros após irradiação com espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 e respetiva espessura utilizando o medidor de espessuras Mitutoyo 7360.

Procedimento: Após irradiação foi adicionado a cada uma das amostras de 10 ml meio de cultura líquido - *Tryptic Soy Broth* (TSB; Merck). Os ensaios foram efetuados em condições assépticas numa sala limpa com classificação ISO 5.

Controlos:

Negativo - 10 ml de TSB; (por cada data de ensaio)

Positivo – 10 ml de TSB + 10^6 UFC/ml de *Bacillus subtilis* ATCC 6633; (por cada data de ensaio)

Bacteriostático/Bactericida: 1 item da amostra 17 de scaffolds irradiado a 25 kGy contaminada com 10^6 UFC/amostra de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 + 10 ml de TSB; e 1 item da amostra 16 de scaffolds não irradiada + 10 ml de TSB.

Ambiental – 3 placas de meio de cultura sólido *Tryptic Soy Agar* abertas durante todo o procedimento.

Incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 dias. Após incubação inocular uma alíquota da cultura de cada amostra em placas de meio de cultura sólido *Tryptic Soy Agar* e verificar o número de colónias após 24 horas de incubação a 30°C .

Interpretação dos resultados:

O ensaio de esterilidade é considerado negativo se for verificada a ausência do crescimento microbiano, que para o procedimento experimental utilizado é detetado através da ausência de turbidez no meio de cultura.

A ausência/presença de crescimento microbiano é posteriormente confirmada por cultura em meio de cultura sólido através da deteção de unidades formadoras de colónias.

Adicionalmente, os ensaios de esterilidade só devem ser considerados validados se os controlos apresentarem os seguintes resultados: i) controlo negativo – ausência de crescimento microbiano (meio de cultura translúcido); ii) controlo positivo – presença de crescimento bacteriano após 24 h (meio de cultura turvo); iii) controlo bacteriostático/Bactericida – presença de crescimento bacteriano após 24 h idêntico ao apresentado no controlo positivo (meio de cultura turvo); iv) controlo ambiental – ausência de crescimento microbiano (ausência de colónias de microrganismos no meio de cultura sólido).

RESULTADOS

1) Ensaios de Esterilidade aos scaffolds

As doses médias de radiação gama estimadas para as amostras irradiadas foram de $24,9 \pm 0,2$ kGy. Os resultados obtidos nos ensaios de esterilidade estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados obtidos para os ensaios de esterilidade efectuados ao produto.

Amostra	Crescimento microbiano
1	ND
2	ND
3	ND
4	ND
5	ND
6	ND
7	ND
8	ND
9	ND
10	ND
11	ND
12	ND
13	ND
14	ND
15	ND
16*	ND
17*	ND
18	ND
19	ND
20	ND
* Contaminados artificialmente e irradiados	
Controlo	Crescimento microbiano
Negativo	ND
Positivo	+ (após 24h)
Bacteriostático e Bactericida (Amostra 17/Amostra 16)	+ (após 24h)/ND
Ambiental	ND/ND/ND

Legenda: (ND) não detetado crescimento microbiano

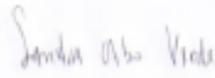
Com base nos resultados obtidos nos controlos efetuados para os ensaios de esterilidade, estes encontram-se validados.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Não foi detetado crescimento microbiano pelo método direto de cultura nas amostras de *scaffolds*, não contaminadas artificialmente e contaminadas com 10^6 UFC/amostra de *B. subtilis*, após irradiação à dose média de radiação gama de 24.9 kGy. Este resultado indica uma redução 6 log UFC/g para a estirpe testada de *B. subtilis* nas condições ensaiadas, porém não demonstra que a dose de esterilização dos *scaffolds* para um Nível de Segurança de Esterilidade de 10^{-6} é 25 kGy (deve ser confirmada a reprodutibilidade dos resultados analisando um maior número de amostras do produto final com uma dimensão padronizada).

C2TN, Sacavém, 22 de Julho de 2016.

Pe'l O Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas


Sandra Cabo Verde