



Catarina Maria Pereira da Costa Sá Silva

***Avaliação da influência do método de  
esterilização na adesão e proliferação  
de várias linhas celulares em scaffolds de  
compósitos de poli(e-caprolactona)/hidroxiapatite  
produzidos por uma técnica de  
fabricação aditiva***

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Setembro, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA





UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

***Avaliação da influência do método de  
esterilização na adesão e proliferação  
de várias linhas celulares em  
scaffolds de compósitos de  
poli(e-caprolactona)/hidroxiapatite  
produzidos por uma técnica de  
fabricação aditiva***

Projeto submetido à Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Catarina Maria Pereira da Costa Sá Silva

*Projeto para obtenção do grau de Mestre realizado sob orientação de:*

Doutora Ana Cristina Aguiar Santos (IBILI-FMUC)

COIMBRA  
Setembro 2016

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

INSTITUTO DE BIOFÍSICA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA, MEDICINA  
DENTÁRIA E CIRURGIA MAXILO-FACIAL



**IPL**

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



Esta cópia do Projeto para a obtenção do grau de Mestre é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da dissertação de Mestrado 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



*“When you wish upon a star  
Makes no difference who you are  
Anything your heart desires  
Will come to you”*

Leigh Harline e Ned Washington





## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram na realização desta dissertação destacando a Doutora Ana Cristina Santos do Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e a Prof.<sup>a</sup> Doutora Margarida Figueiredo e a Doutora Patrícia Coimbra do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. Quero também fazer um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório João Levita, Henrique Cunha e Sara Gemelgo por toda a amizade e apoio que me proporcionaram: fazemos uma grande equipa.

Quero também agradecer ao Diretor Nuno Alves do Centro de desenvolvimento rápido e sustentável do produto e à Mestre Tânia Viana, ambos do Instituto Politécnico de Leiria, por todo o apoio que me deram e pela disponibilidade que ofereceram. À Prof.<sup>a</sup> Doutora Bárbara Oliveiros pela ajuda na análise estatística e interpretação dos resultados. À Técnica de Laboratório Cláudia Brites do Departamento de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela ajuda em toda a técnica histológica, assim como 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. Gostaria também de agradecer à Bolseira Ana Paula Vieira do Grupo Partículas, Polímeros e Biomateriais do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra.

Por fim, quero agradecer a todas as pessoas que, durante estes 5 anos em Coimbra, me proporcionaram a experiência fantástica que vivi. Quero destacar especialmente os meus melhores amigos: Pandora, Ashley, Gouveia, Nuno Pinheiro, Diana Lourenço, Ritinha, Sami, Sara Anjo, Pedro Rocha, Tó, Bruno Cerqueira, Parmalat, Oreo e Lígia Fão. Foram os protagonistas destes 5 anos que me fizeram chegar ao fim com um grande sentimento de paixão por Coimbra.

Ao Zezinho que apareceu na minha vida de paraquedas e que me tem dado toda a força e motivação para continuar a viver a vida a 100% sempre com um sorriso grande.

Quero agradecer a toda a minha família pela disponibilidade e apoio incansável que tiveram comigo: à avó Zé, avó Mira, avô Costa e avô Jorge; à tia, Pê, Magda, Bárbara e Kikas; e aos meus primos Mariana, Beatriz e João.

Quero fazer um agradecimento especial aos meus queridos irmãos Pedrinho e Jojó que estiveram comigo nos bons e maus momentos e, por fim, e para mim de forma mais destacada, aos meus pais, Papá e Mamã, que são a minha fonte de inspiração e o exemplo que eu tenho tomado para toda a minha vida.

## RESUMO

Este projeto tem como objetivo avaliar o desempenho biológico de *scaffolds* para regeneração óssea preparados por um processo de fabricação aditiva. O Instituto Politécnico de Leiria desenvolveu uma bioextrusora que tem como função produzir este tipo de *scaffolds*. Os referidos *scaffolds* são constituídos por uma mistura de policaprolactona e hidroxiapatite, em diferentes percentagens, bem como geometria e porosidade específicas, o que permitirá testar a citotoxicidade e proliferação celulares para vários tipos de células: macrófagos, fibroblastos e células osteogénicas

Testaram-se estas estruturas 3D através de ensaios de cultura celular, concretamente com fibroblastos, macrófagos e células osteogénicas realizando igualmente co-culturas dos dois primeiros tipos de células. Os fibroblastos foram desenvolvidos a partir de polpa de dentes imaturos humanos. Após recolha de germes dentários, as células do tecido ósseo foram diferenciadas a partir de células mesenquimatosas da papila dentária, que podem originar odontoblastos/osteoblastos, através de uma técnica bem estabelecida. Utilizaram-se ainda células osteogénicas de uma linha de osteossarcoma (MNNG/HOS).

Qualquer um dos tipos de células foi semeado, em mono ou co-cultura, sobre os diferentes *scaffolds* esterilizados por plasma ou por óxido de etileno. Os germes dentários e os dentes imaturos foram recolhidos em colaboração com a Área de Endodontia do Departamento de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os macrófagos peritoneais foram recolhidos a partir de ratos usando uma técnica estabelecida pela equipa, pois têm características idênticas aos macrófagos humanos.

A proliferação celular e citotoxicidade foram avaliadas usando o teste de MTT (brometo de 3-(4,5,-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazólio).

Realizaram-se experiências *in vivo*, num modelo animal (rato *Wistar*), de acordo com as normas nacionais e internacionais de experimentação animal. Efetuou-se a implantação cirúrgica de alguns tipos de *scaffolds* esterilizados

Das experiências *in vitro* pôde concluir-se em que os *scaffolds* de PCL + HA 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° e PCL + 300  $\mu\text{m}$  + 90° apresentam características favoráveis ao crescimento de fibroblastos, os *scaffolds* de PCL + HA N 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° e PCL + HA N 25% +300  $\mu\text{m}$  + 90° apresentam características favoráveis ao crescimento de macrófagos e os *scaffolds* de PCL + 600  $\mu\text{m}$  + 45° apresenta características favoráveis ao crescimento de fibroblastos e macrófagos em co-cultura.

Observou-se nas experiências *in vivo* que os *scaffolds* constituídos apenas por PCL apresentam características mais favoráveis à cicatrização e re-estruturação tecidual, seguindo-se a mistura PCL + HA 25% e por fim a mistura PCL + HA a 10%. Pôde ainda concluir-se que,, *in vivo*, os *scaffolds* esterilizados por óxido de etileno apresentam melhores resultados que os *scaffolds* esterilizados por plasma.

A Engenharia de Tecidos poderá vir a ganhar bastante com este tipo de *scaffolds*, uma vez que apresentam várias vantagens relativamente aos métodos convencionais de produção, o que possibilita um alto nível de controlo da sua arquitetura e assegura grande reprodutibilidade.

## .Palavras-Chave

“*Scaffold*”; “Fabricação aditiva”; “Macrófagos”; “Fibroblastos”; “Osteoblastos”; “Engenharia de Tecidos”.

## ABSTRACT

The aim of this project is to evaluate the biological performance of scaffolds, produced by an additive manufacturing process, regarding bone regeneration. The CDRSP - IPL (*Instituto Politécnico de Leiria*) developed the BioExtruder in order to produce this kind of scaffolds. These scaffolds are based upon poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and hydroxyapatite with different percentages, as well as a specific pore geometry and size, allowing us to test the proliferation and cytotoxicity concerning different types of cells: macrophages, fibroblasts and osteogenic cells.

These 3D structures were tested using cell culture assays with macrophages, fibroblasts and osteogenic cells, as monoculture or co-culture of macrophages and fibroblasts. Fibroblasts were harvested and developed from immature human tooth pulp. Tooth germs were harvested to obtain dental papilla, the source of mesenchymal stem cells that can be differentiated into osteoblasts. Both biological materials were obtained following well-established techniques. An osteosarcoma cell line, (osteogenic cells) were also used (MNNG/HOS). All kinds of cells were seeded, as mono or co-culture, over the different types of scaffolds, which were sterilized by ethylene oxide or plasma,

Dental material was provided by Area of Endodontics, Department of Dentistry, University of Coimbra. Macrophages were extracted from *Wistar* rats using a specific protocol improved by the team. These cells have similar characteristics to human macrophages. Scaffolds will be sterilized using different sterilization methods, namely ethylene oxide and plasma.

Cytotoxicity and cell proliferation were evaluated using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide).

From the in vitro experiments it could be concluded that PCL + HA 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° and PCL + 300  $\mu\text{m}$  + 90° scaffolds present better features for fibroblast growth. Whereas the PCL + HA N 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° and PCL + HA N 25% + 300  $\mu\text{m}$  +

90 scaffolds are preferred by macrophages. PCL + 600  $\mu\text{m}$  + 45° scaffolds present very good properties for fibroblast and macrophage co-culture.

In vivo studies showed that PCL scaffolds have very good qualities for tissue healing and restructuring, followed by the mixture of PCL + HA 25% and lastly by the mixture of PCL + HA 10%. It was also possible to determine that scaffolds sterilized by ethylene oxide have a better in vivo performance than the same ones sterilized by plasma.

Tissue Engineering can improve when using this kind of scaffolds, since they present several advantages (for e.g. the high level of control of their architecture and high reproducibility), when compared to conventional methods of production/composition.

## Keywords

“Scaffold”; “Additive manufacturing”; “Macrophage”; “Fibroblasts”; “Osteoblasts”; “Tissue Engineering”.

# ÍNDICE

Glossário.....	19
Índice de Figuras .....	21
Índice de Quadros .....	25
CAPÍTULO 1 - Introdução.....	27
1.1. Contextualização.....	27
1.2. Objetivos .....	28
1.3. Estrutura do Projeto para a obtenção do grau de Mestre.....	29
CAPÍTULO 2 – Fundamentos Teóricos.....	33
2.1. Engenharia de Tecidos .....	33
2.1.1. Biomateriais utilizados em <i>scaffolds</i> .....	35
2.1.2. Metais.....	36
2.1.3. Cerâmicas .....	36
2.1.4. Polímeros.....	37
2.1.5. Compósitos.....	38
2.2. Tipos celulares.....	38
2.2.1. Macrófagos.....	38
2.2.2. Fibroblastos .....	39
2.2.3. Células osteogénicas .....	41
2.2.3.1. Osteoblastos.....	41
2.2.3.2. Células de osteossarcoma .....	43
2.2.4. Células estaminais mesenquimatosas.....	44
2.2.4.1. O dente.....	44
2.3. Cultura celular .....	47
2.4. Técnica histológica .....	48
2.5. Técnicas de esterilização.....	48
2.6. Modelo animal .....	49
CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos utilizados neste Trabalho.....	51
3.1. Materiais utilizados na produção dos <i>scaffolds</i> .....	51
3.1.1. Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) .....	51
3.1.2. Hidroxiapatite.....	52
3.2. Obtenção das células pretendidas .....	52

3.2.1. Macrófagos.....	53
3.2.2. Fibroblastos.....	58
3.2.3. Osteoblastos e células do osteossarcoma .....	59
3.3. Técnica utilizada para a produção dos <i>scaffolds</i> e respetivo <i>Design</i> .....	61
3.4. Esterilização dos <i>scaffolds</i> .....	65
3.4.1. Óxido de Etileno .....	65
3.4.2. Plasma .....	66
3.5. Produção das substâncias pretendidas.....	68
3.5.1. Misturas com 10% de HA (sintética ou natural).....	68
3.5.2. Misturas com 25% de HA (sintética ou natural).....	69
3.6. Estudos <i>in vitro</i> .....	69
3.6.1. Métodos de trabalho.....	70
3.6.2. Teste do MTT.....	74
3.7. Estudos <i>in vivo</i> .....	75
3.8. Estudos histológicos.....	78
CAPÍTULO 4 – Análise de resultados e Conclusões .....	87
4.1. Estudos <i>in vitro</i> .....	87
4.1.1. Estudos estatísticos .....	88
4.1.2. Resultados obtidos .....	92
4.2. Estudos <i>in vivo</i> .....	95
4.2.1. Análise histológica da zona controlo.....	96
4.2.2. Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL + HA N (10%) – 300 µm + 45° (7).....	96
4.2.2.1. Óxido de Etileno .....	97
4.2.2.2. Plasma .....	97
4.2.3. Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL + HA S (10%) – 600 µm + 90° (9) .....	98
4.2.3.1. Óxido de Etileno .....	99
4.2.3.2. Plasma .....	99
4.2.4. Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL + HA S (25%) – 600 µm + 45° (14) .....	100
4.2.4.1. Óxido de Etileno .....	100
4.2.4.2. Plasma .....	101
4.2.5. Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL + HA S (25%) – 300 µm + 45° (16) .....	102
4.2.5.1. Óxido de Etileno .....	103
4.2.5.2. Plasma .....	104
4.2.6. Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL – 600 µm + 90° (17).....	104



4.2.6.1. Óxido de Etileno .....	105
4.2.6.2. Plasma .....	106
4.3. Conclusões e perspectivas futuras .....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109
ANEXOS .....	115
ANEXO A - <i>Output</i> para análise estatística.....	115
ANEXO B - Comparação entre os vários tipos de materiais testados com diferentes tipos celulares e de esterilização .....	183



## Glossário

Acrónimo	Significado
CLO	Clorofórmio
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
DPSC	Células estaminais da polpa dentária
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESB	Sociedade Europeia de Biomateriais
FD	Centros de filamentos
FG	Espaçamento entre filamentos ou dimensão do poro
HA	Hidroxiapatite
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
Ig M	Imunoglobulina M
IPL	Instituto Politécnico de Leiria
LG	Espaçamento entre camadas
MOCF	Microscópio ótico de contraste de fase
MTT	Teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Ob	Osteoblasto
Ot	Osteóide
PCL	Policaprolactona
PGA	Ácido poliglicólico
PLGA	Ácido poli-DL-lático-co-glicólico
RW	Diferença entre diâmetro de filamentos
ST	Espaçamento entre camadas que constituem a peça
U.V.	Radiação Ultravioleta



# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Macrófagos não corados observados ao MOCF (200x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC. ....	39
<b>Figura 2</b> - Fibroblastos corados com MTT observados ao MOCF (200x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC. ....	40
<b>Figura 3</b> – Co-cultura de macrófagos e fibroblastos não corados observados ao MOCF fase (200x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC .....	40
<b>Figura 4</b> - Corte histológico de osso observado ao microscópio óptico (coloração Hematoxilina-Eosina onde se podem observar osteoblastos (Ob) e osteóide (Ot) (retirado de [28]). ....	41
<b>Figura 5</b> - Esquema onde é possível observar os três tipos de células constituintes do tecido ósseo (retirado de [28]). ....	43
<b>Figura 6</b> - <b>a)</b> Rx de um úmero com um tumor do tipo osteossarcoma (retirado de [38]); <b>b)</b> foto de peça cirúrgica de úmero com osteossarcoma (retirada de [33]). ....	44
<b>Figura 7</b> - Divisão anatômica do dente: coroa, colo e raiz (retirada de [35]). ....	45
<b>Figura 8</b> - Divisão estrutural do dente: esmalte, dentina, polpa e cimento (retirada de [35]). ....	46
<b>Figura 9</b> - Esquema de um corte longitudinal de um dente (molar) (retirado de [36]). ....	46
<b>Figura 10</b> - Reação de polimerização para a preparação da PCL pela abertura do anel do monómero de caprolactona [48]. ....	52
<b>Figura 11</b> - <b>A)</b> Câmara de <i>Neubauer</i> (retirada de [56]); <b>B)</b> esquema de quadrantes utilizado na contagem de células ( <i>Neubauer-improve,0640030</i> , Alemanha). ....	57
<b>Figura 12</b> - Bioextrusora (IPL) – é constituída por 3 unidades: <b>A)</b> unidade principal de produção do <i>scaffold</i> ; <b>B)</b> unidade de controlo de temperaturas; <b>C)</b> unidade para controlar a velocidade de rotação. ....	63
<b>Figura 13</b> - <b>a)</b> Esquema que permite observar a diferença entre diâmetro de filamento (RW), distância entre centros de filamentos (FD), espaçamento entre filamentos ou dimensão do poro (FG), espaçamento entre camadas (LG) e ST; <b>b)</b> vista tridimensional do <i>scaffold</i> [69]. ....	65

<b>Figura 14</b> – Equipamento de esterilização por plasma do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. <b>A)</b> colocação dos <i>scaffolds</i> no interior do aparelho, sendo irradiados durante 1 ou 3 minutos em cada uma das suas faces; <b>B)</b> equipamento em funcionamento, com uma pressão de 0,4 mbar. ....	68
<b>Figura 15</b> - Exemplos de dois esquemas utilizados com os <i>scaffolds</i> com diferentes propriedades. É importante referir que todos os <i>scaffolds</i> foram esterilizados ou por óxido de etileno e por plasma. Neste caso nos dois esquemas foram todos esterilizados por óxido de etileno. PCL – 600 $\mu$ m + 90° - Células osteogénicas. ....	73
<b>Figura 16</b> - Caixas de cultura de 48 poços no penúltimo passo do teste de MTT. ....	74
<b>Figura 17</b> - <b>A)</b> equipamento para ler testes de ELISA; <b>B)</b> seleção dos comprimentos de onda de leitura no software do espectrofotómetro; <b>C)</b> quadro de resultados obtidos. ....	75
<b>Figura 18</b> - Esquema representativo da anatomia do animal utilizado nos testes in vivo: o rato (retirado de [85]). ....	738
<b>Figura 19</b> - Tricotomia realizada no dorso do rato, em áreas específicas para posterior implantação subcutânea do <i>scaffold</i> . ....	81
<b>Figura 20</b> - Esquema de implantação subcutânea dos <i>scaffolds</i> no rato realizados nos estudos in vivo: <b>A)</b> controlo (apenas se realizou uma bolsa); <b>B)</b> <i>scaffold</i> esterilizado por óxido de etileno; <b>C)</b> <i>scaffold</i> esterilizado por plasma (CHUC).....	81
<b>Figura 21</b> - Cassete de fixação utilizada para os estudos histológicos (PrintMate™ Embedding Cassettes, A84810048).....	83
<b>Figura 22</b> - Zona A = corte histológico da zona de controlo: <b>A</b> - imagem obtida com lupa ótica com ampliação 5,5 x, onde é possível observar a presença de infiltrado inflamatório no local da incisão; <b>B</b> – imagem obtida com microscópio ótico com ampliação 2x, podendo observar-se mais detalhadamente uma faixa fina de fibrose e pouco infiltrado inflamatório. Observam-se, neste corte, folículos pilosos ( <b>a</b> ) e fibras de colagénio normais ( <b>b</b> ).....	96
<b>Figura 23</b> - Exemplo de animal com implantação do <i>scaffold</i> constituído por PCL + HA N (10%) - 300 $\mu$ m + 45° (rato 1): <b>A)</b> imagem de lupa ótica (ampliação 5,5x) podendo observar-se a presença do <i>scaffold</i> um pouco distorcido; <b>B)</b> imagem ao microscópio ótico com ampliação 2x vendo-se mais em detalhe o espaço ocupado pelo <i>scaffold</i> , assim como a distribuição da fibrose originada. As fibras encontram-se mais desorientadas do que no grupo controlo; <b>C)</b> imagem ao microscópio ótico com ampliação 10x onde se podem observar com mais detalhe os pormenores do tecido envolvente do <i>scaffold</i> , em que se vê o desenvolvimento de um folículo piloso ( <b>a</b> ). ....	97

- Figura 24** - Scaffold constituído por PCL + HA N (10%) + 300  $\mu$ m + 45° (Rato 1) : **A)** imagem de lupa óptica (ampliação 5,5x) podendo observar-se o espaço histológico devido à presença do scaffold;; **B)** imagem microscópica com ampliação 2x que permite observar mais detalhadamente o espaço antes ocupado pelo scaffold, assim como todo o arranjo de fibrose que se encontra mais desorientado (fibras de colagénio em (b))do que o grupo controlo. Também se observam glândulas subcutâneas fibras de colagénio em (b) ; **C)** imagem microscópica com ampliação 4x onde se conseguem observar com mais pormenor os detalhes do tecido envolvente do scaffold, como por exemplo a presença de um neovaso sanguíneo em (c), do que se depreende que houve mais reação inflamatória e tentativa de remodelação: **D)** imagem de microscópio ótico com ampliação 10x do local de implantação do scaffold.....98
- Figura 25** - Scaffold constituído por PCL + HA S (10%) – 600  $\mu$ m + 90° (Rato 5): **A)** imagem de lupa ótica (ampliação 5,5x) onde é possível observar a zona previamente ocupada pelo scaffold, este estava bastante distorcido; **B)** imagem microscópica com ampliação 2x: pode observar-se mais detalhadamente este espaço, assim como todo o arranjo de fibrose que se encontra mais desorientado do que o grupo controlo; **C)** imagem microscópica com ampliação 4x onde se consegue observar melhor os detalhes do tecido envolvente do scaffold, como por exemplo a presença de neovasos sanguíneos em (a) e pêlos em (b). .....99
- Figura 26** - Scaffold constituído por PCL + HA S (10%) – 600  $\mu$ m + 90°(Rato 5): **A)** imagem de lupa ótica (5,5 x) onde é possível observar a presença do espaço ocupado pelo scaffold, estando este bastante distorcido; **B)** imagem microscópica com ampliação 4x onde é possível observar mais detalhadamente o espaço correspondente ao scaffold; vêem-se muitos vasos sanguíneos em (a). Em (b) observam-se fibras de colagénio.....100
- Figura 27** - Scaffold constituído por PCL + HA S (25%) – 600  $\mu$ m + 45° (Rato 12) : **A)** imagem de lupa ótica (5,5x) observando-se a presença do espaço antes ocupado pelo scaffold, estando este bastante intacto; **B)** imagem de microscópio ótico com ampliação 4x onde é possível observar mais detalhadamente este espaço e a reorganização tecidual. Em (a) observam-se fibras de colagénio que acompanham a ondulação das fibras do scaffold). .....101
- Figura 28** - Scaffold constituído por PCL + HA S (25%) – 600  $\mu$ m + 45° (Rato 12) : **A)** Imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível observar a presença correspondente ao espaço do scaffold, estando este rodado e deslocado para um plano mais profundo; **B)** imagem microscópica com ampliação 2x onde é possível observar mais detalhadamente esta zona; **C)** imagem microscópica com ampliação 4x onde se observa o espaço correspondente ao scaffold distorcido. Provavelmente os restos de material que se observam dentro destes espaços correspondem a HA, uma vez que esta é mais dura e não se descalcificou a amostra.....102

**Figura 29** - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (25%) – 300 µm + 45° (Rato 14 ): **A)** imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível observar o espaço correspondente à presença do *scaffold*. Este encontra-se entre o tecido celular subcutâneo e as fibras musculares subjacentes; **B)** imagem microscópica com ampliação 4x onde é possível observar a fibrose ondulante que rodeia o local de implantação do *scaffold*; **C)** imagem microscópica com ampliação 4x onde se observa distorção induzida pela presença do *scaffold* com presença de muita fibrose. ....103

**Figura 30** - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (25%) – 300 µm + 45° (Rato 14 ): **A)** Imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível observar o espaço devido à presença do *scaffold*. Nota-se que as camadas da derme acima do *scaffold* estão com uma coloração mais forte e menos detalhe; **B)** imagem microscópica com ampliação 4x onde se observa que esta coloração mais densa é devida a uma maior espessura do corte, já que o *scaffold* tem 25% de HA. Existe bastante fibrose. ....104

**Figura 31** - *Scaffold* constituído por PCL – 600 µm + 90° (Rato 18 ): **A)** imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível uma grande adesão celular e recuperação da estrutura mais normal à volta do espaço ocupado pelo *scaffold* que até enrolou um pouco); **B)** imagem microscópica com ampliação 2x onde se consegue observar a estrutura tecidual renovada com um aspeto muito semelhante ao tecido normal: **(a)** pode ver-se a derme, **(b)** o tecido celular subcutâneo e **(c)** fibras musculares; **C)** *scaffold* levou a uma boa recuperação da estrutura e as fibras musculares adaptaram-se melhor à face inferior do material. ....105

**Figura 32** - *Scaffold* constituído por PCL – 600 µm + 90° (Rato 18 ): **A)** imagem de lupa ótica (5,5x) onde não se observa presença de espaço devido ao *scaffold*; **B)** imagem microscópica com ampliação 2x onde se consegue observar uma estrutura bastante intacta, apesar de se ter inserido o *scaffold* nesta zona; **C)** imagem microscópica com ampliação 4x. ....106



# Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Tipo de metais utilizados (adaptado de [13]). .....	36
<b>Quadro 2</b> - Exemplos de biomateriais pertencentes aos grupos dos metais, cerâmicas e polímeros (adaptado de [16]). .....	37
<b>Quadro 3</b> - Alguns tipos de esterilização utilizados a nível hospitalar ( <i>adaptado de [39]</i> ). .....	48
<b>Quadro 4</b> - Combinações possíveis das propriedades dos <i>scaffolds</i> : podem ser constituídos apenas por PCL ou por PCL + HA natural ou sintética a 10% ou 25%, respectivamente. O tamanho do poro pode variar (300 $\mu\text{m}$ ou 600 $\mu\text{m}$ ) assim como a geometria (45 ° ou 90 °). .....	64
<b>Quadro 5</b> - Peso dos 20 ratos Wistar utilizados para estudos <i>in vivo</i> . .....	79
<b>Quadro 6</b> - <i>Comparação dos resultados usando Óxido de Etileno e Plasma para a esterilização dos scaffolds</i> . .....	89
<b>Quadro 7</b> - <i>Comparação dos resultados usando Plasma CHUC e DEQ para a esterilização dos scaffolds</i> . .....	92



# CAPÍTULO 1 - Introdução

## 1.1. Contextualização

Desde 1980, a Engenharia de Tecidos tem evoluído exponencialmente como um campo multidisciplinar visando o desenvolvimento de produtos biológicos para substituir ou regenerar tecidos/órgãos disfuncionais [1,2].

Os biomateriais são um elemento importante da Engenharia de Tecidos que podem ser utilizados em dispositivos médicos, tendo características físicas, químicas e biológicas adequadas. Têm como função orientar células para o desenvolvimento de tecidos funcionais através da diferenciação, adesão e migração celular. Os biomateriais devem ser biocompatíveis, ou seja, terem a capacidade de induzir uma resposta apropriada do hospedeiro visando uma aplicação específica [3,4]. Neste projeto, pretende-se desenvolver materiais que desempenhem um papel na regeneração do tecido ósseo.

Com estes biomateriais é possível construir-se *scaffolds*, que são constituídos normalmente por biomateriais poliméricos, proporcionando assim o suporte estrutural para a fixação de células e subsequente desenvolvimento de tecido(s). Desta forma, estes *scaffolds* devem ter as seguintes características:

- **arquitetura:** é importante ter em conta que o *scaffold* irá levar à formação de um tecido novo, facilitando a integração do tecido do hospedeiro após implantação, sendo importante criar um espaço para tal. Também se torna necessário que o *scaffold* mantenha a estabilidade mecânica, sendo preciso desta forma, obter uma estrutura suficientemente porosa. Por fim, é muito importante que os biomateriais sejam biodegradáveis após a implantação, uma vez que o(s) tecido(s) em desenvolvimento substituirá(ão) o *scaffold*;
- **biocompatibilidade:** os biomateriais utilizados têm de ser compatíveis com os componentes celulares dos tecidos e não induzir resposta imune;
- **bioatividade:** os *scaffolds* podem interagir ativamente com os componentes celulares de forma a regular a sua formação, diferenciação e função;

- **biodegradabilidade a longo prazo:** é necessário que o biomaterial se degrade de forma muito lenta para que o organismo tenha tempo de substituir esse mesmo material por componentes celulares do próprio indivíduo que mais tarde formarão o(s) tecido(s) pretendido(s);
- **propriedades mecânicas:** os *scaffolds* devem proporcionar estabilidade mecânica de forma a compensar a disfunção do tecido/estrutura [5].

## 1.2. Objetivos

Em 2015, realizou-se um estudo com o objetivo de avaliar a proliferação celular e a citotoxicidade *in vitro* de *scaffolds* constituídos por policaprolactona (PCL) e *scaffolds* constituídos por PCL, mas com uma certa percentagem de hidroxiapatite (HA) natural ou sintética (10% e 25%). Estes *scaffolds* tinham uma arquitetura específica (300  $\mu\text{m}$  de espessura de filamento e 300  $\mu\text{m}$  e 600  $\mu\text{m}$  de tamanho de poros, podendo variar a sua geometria entre 45° ou 90°). Estes *scaffolds* foram esterilizados por óxido de etileno, uma vez que é o método de esterilização mais utilizado a nível hospitalar. Estudaram-se estes *scaffolds* com dois tipos de células: macrófagos peritoneais de rato e fibroblastos humanos, realizando-se monocultura e co-cultura. Assim, utilizou-se o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), com o objetivo de analisar a citotoxicidade *in vitro*. Desta forma, foi possível determinar a viabilidade celular, quantificando o quanto de MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH formando cristais de formazan. Neste estudo, concluiu-se que os *scaffolds* constituídos por PCL e HA natural são os que apresentam menor citotoxicidade e ainda que, os *scaffolds* com porosidade de 300  $\mu\text{m}$  e geometria de 45° também apresentam menor citotoxicidade, levando a concluir que proporcionam uma maior adesão e proliferação celular [6].

Desta forma, quis dar-se continuidade a este estudo, envolvendo mais um tipo celular com potencialidade osteogénica: realizando para tal testes de cultura celular. O óxido de etileno é o método mais utilizado para esterilização em aplicações médicas. É um gás que deixa alguns resíduos que podem provocar reações imunológicas e, assim, foi também selecionada uma outra técnica de esterilização usada para material mais

delicado: plasma, sendo também um dos objetivos desta dissertação comparar a esterilização por óxido de etileno e por plasma (usando o gás oxigénio ou o peróxido de hidrogénio).

O principal objetivo do presente trabalho é estudar a citotoxicidade do material composto por PCL ou PCL com HA em diferentes percentagens, tendo como finalidade a aplicação em Medicina Dentária, nomeadamente na regeneração de tecido ósseo da mandíbula e/ou do maxilar.

### 1.3. Estrutura do Projeto para a obtenção do grau de Mestre

#### Capítulo 1: Introdução

No capítulo 1, aborda-se a contextualização deste trabalho assim como os seus objetivos. Pretende explicar-se de forma resumida como está dividido este projeto e quais são os principais temas abordados neste trabalho.

#### Capítulo 2: Fundamentos Teóricos

Neste capítulo irá abordar-se inicialmente o que é a Engenharia de Tecidos e de que forma é que este trabalho se enquadra no âmbito deste domínio.

Explica-se como é idealmente um *scaffold*, assim como os critérios que definem se determinado material é indicado para colocação na cavidade oral.

Também são mencionados os biomateriais utilizados nos *scaffolds* e quais as características de cada um deles, para depois, num capítulo posterior, se entender a escolha de PCL e HA.

Como se pretendem avaliar a proliferação celular e a citotoxicidade do(s) material(ais), um dos tópicos descritos neste capítulo é a caracterização dos tipos celulares que se pretendem estudar: macrófagos, fibroblastos e células osteogénicas,

sendo estes dois últimos obtidos da polpa de dentes e germes dentários, ou uma linha de osteossarcoma, o que também é importante indicar.

Uma vez que são utilizados dois métodos diferentes para esterilizar os *scaffolds*, neste segundo capítulo pretende explicar-se muito resumidamente em que consiste a esterilização.

### Capítulo 3: Materiais e Métodos utilizados neste trabalho

Este capítulo está dividido em duas grandes partes: os testes realizados *in vitro* e *in vivo*. No primeiro caso, explica-se quais os métodos de trabalho utilizados, assim como todos os protocolos seguidos. Também é referido que tipo de avaliação se fez, explicando em que consiste o teste do MTT. Nos estudos *in vivo* explica-se qual o modelo animal utilizado para inserção subcutânea dos *scaffolds* e de que forma se procedeu para respeitar todos os cuidados a ter com a ocisão dos animais. Posteriormente, descreve-se de que forma se avaliaram histologicamente estes implantes.

Para além da descrição detalhada destas duas experiências, também são mencionados quais os protocolos seguidos para a preparação das substâncias/misturas pretendidas, assim como qual o equipamento utilizado para a sua produção e qual o seu funcionamento. São explicadas as características dos *scaffolds* utilizados como a espessura, dimensão, porosidade e geometria.

Neste capítulo também se explica de que forma foram obtidas as células utilizadas nestas experiências: macrófagos, fibroblastos e células osteogénicas.

Os tipos de esterilização também são caracterizados neste capítulo: esterilização por óxido de etileno e por plasma (usando como gás o oxigénio e o peróxido de hidrogénio).

#### Capítulo 4: Análise de Resultados

No capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos para estudar a proliferação celular e citotoxicidade dos diferentes *scaffolds* através da análise com o programa SPSS. Faz-se uma breve discussão desses mesmos resultados, destacando quais os materiais testados mais promissores.

#### Capítulo 5: Conclusões

Neste capítulo menciona-se as principais conclusões deste trabalho e de que forma isso é relevante para estudos posteriores.

Referem-se ainda propostas para trabalho futuro.





## CAPÍTULO 2 – Fundamentos Teóricos

É importante rever alguns conceitos que vão ser úteis na elaboração deste trabalho. Inicialmente explicar-se-á o que desenvolve a Engenharia de Tecidos e de que forma é útil no âmbito deste estudo. Seguidamente, irão mencionar-se os tipos de biomateriais que se podem utilizar neste domínio, assim como se caracterizarão os tipos celulares que se utilizaram nos testes.

### 2.1. Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios de Bioengenharia para o conjunto de substitutos biológicos que irá manter ou melhorar as funções do tecido em questão. É uma das alternativas para a utilização de próteses, transplantes ou mesmo procedimentos cirúrgicos, uma vez que não apresenta rejeição imunológica.

Assim, esta área tem como objetivo principal fazer um suporte tridimensional biodegradável que, juntamente com as células, seja capaz de se integrar nos tecidos e possua propriedades mecânicas estruturalmente iguais ou mesmo melhores do que o tecido a ser substituído.

Para se proceder à construção dessa estrutura é preciso ter em conta quatro elementos principais:

- *scaffolds*;
- fatores de crescimento;
- matriz extracelular;
- células [7].

Na tentativa de regenerar diferentes tecidos e órgãos do organismo, a Engenharia de Tecidos tem aperfeiçoado cada vez mais os *scaffolds* utilizados. Os *scaffolds* devem ser considerados um substituto artificial de matriz extracelular

natural, uma vez que atua como um reservatório de água, nutrientes, iões, fatores de crescimento e citocinas [8].

Independentemente do tipo de tecido, estes *scaffolds* devem ter determinadas propriedades que os tornam úteis para colocar no corpo humano:

- **biocompatibilidade:** é muito importante um *scaffold* ser biocompatível uma vez que as células, de forma a estarem funcionais, devem aderir-lhe e recobri-lo. Após a implantação, todos os procedimentos de sutura e esterilização devem ser feitos de forma a impedir uma resposta inflamatória, levando a um menor sucesso de cura ou rejeição pelo organismo;
- **biodegradabilidade:** é importante que as células substituam o *scaffold* ao longo do tempo, sendo necessário este ser biodegradável. Os subprodutos desta degradação não devem ser tóxicos e não devem interferir com outros órgãos/sistemas. Nos testes *in vitro* geralmente incubam-se estes *scaffolds* com macrófagos, de forma a garantir que haja a garantia de não toxicidade. O *scaffold* deverá sofrer, neste caso, uma degradação lenta, consentânea com a formação estável dos tecidos e estruturas;
- **propriedades mecânicas:** o *scaffold* deve possuir propriedades mecânicas de acordo com a localização da sua implantação, ou seja, é preciso estudar muito bem o tecido/órgão alvo para ser forte o suficiente, permitindo a manipulação cirúrgica durante o procedimento. Para este trabalho é interessante considerar o *scaffold* no osso. Para este tipo de tecidos, o *scaffold* deve ter integridade mecânica suficiente para funcionar a partir do momento do implante. Assim, é necessário existir um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a arquitetura da porosidade, de forma a permitir a infiltração das células e a respetiva vascularização;
- **arquitetura:** os *scaffolds* devem possuir uma estrutura de poros interligados e porosidade elevada, de forma a assegurar uma boa penetração celular e uma boa formação da matriz extracelular. Para além disso, toda esta arquitetura vai permitir a difusão dos produtos de degradação para fora do *scaffold* e posteriormente do organismo, sem interferência com outros órgãos ou tecidos circundantes. Um outro parâmetro a ter em conta é o tamanho do poro do

*scaffold*. As células vão interagir com os *scaffolds* através de ligandos que se encontram sobre a superfície do material. A densidade de um ligando é influenciada pela área de superfície específica, ou seja, a superfície disponível dentro de um poro ao qual as células podem aderir. Desta forma, o poro deve ser grande o suficiente para permitir a migração celular e pequeno o suficiente para permitir a ligação de um número suficiente de células ao *scaffold* [16];

- **osteointuidividade:** um *scaffold* deve permitir a adesão, proliferação e diferenciação celular no tecido do hospedeiro. Mais especificamente neste caso no tecido ósseo, devendo induzir a formação óssea através da sinalização biomolecular e das células estaminais [10].

Tal como mencionado anteriormente, os *scaffolds* têm de apresentar características específicas consoante o tecido onde vão ser implantados. Assim, existem diversos materiais utilizados para a produção de *scaffolds*. No próximo item irão abordar-se vários tipos de materiais e em que situações devem ser utilizados.

### 2.1.1. Biomateriais utilizados em *scaffolds*

É muito importante salientar que um *scaffold*, apesar de poder apresentar grande variabilidade na sua constituição, deve ter todas as características referidas anteriormente.

Em 1976, na primeira Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais (ESB), um biomaterial foi definido como “*a non-viable material used in a medical device, intended to interact with biological systems*”. No entanto, a definição atual da ESB é “*material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function of the body*” [10].

Os biomateriais podem ser divididos nas seguintes categorias: metais, cerâmicas e polímeros. De seguida explicar-se-á detalhadamente cada um desses tipos de biomateriais [11].

### 2.1.2. Metais

Os principais critérios para a seleção de biomateriais da classe dos metais são a sua boa biocompatibilidade, alta resistência à corrosão, propriedades mecânicas convenientes e baixo custo [11]. São muito utilizados devido às suas excelentes propriedades elétricas, mecânicas e térmicas, uma vez que têm alguns elétrons independentes o que lhes confere capacidade para transferir uma certa carga elétrica. Estes elétrons livres fazem com que se mantenham os íons metálicos juntos [12].

Atualmente, alguns implantes metálicos foram substituídos por biomateriais do tipo cerâmico e do tipo polímero, devido à sua excelente biocompatibilidade e biofuncionalidade. No entanto, quando é necessária a colocação de implantes com elevada resistência, dureza e durabilidade, ainda se utilizam os biomateriais do tipo metálico [13]. É possível observar os tipos de metais utilizados no Quadro 1.

Quadro 1 - Tipo de metais utilizados (adaptado de [13]).

<b>Divisão</b>	<b>Exemplo de implantes</b>	<b>Tipo de metal</b>
<u>Cardiovascular</u>	<i>Stent</i> ; válvula artificial	316L SS; CoCrMo; Ti; Ti6A14V
<u>Ortopédico</u>	Fixação óssea; articulações artificiais	316L SS; Ti; Ti6A14V; CoCrMo; Ti6A14V; Ti6A17Nb
<u>Odontologia</u>	Fio ortodôntico Preenchimento	316L SS; CoCrMo; TiNi; TiMo AgSn(Cu) amalgam, Au
<u>Craniofacial</u>	Placa e Parafuso	316L SS; CoCrMo; Ti; Ti6A14V
<u>Otorrinologia</u>	Tímpano artificial	316L SS

### 2.1.3. Cerâmicas

Os biomateriais do tipo cerâmicos apresentam-se com uma elevada rigidez mecânica, baixa elasticidade; a sua superfície é dura e quebradiça. Este tipo de biomateriais é muito utilizado quando se pretende regenerar osso, uma vez que aumenta a diferenciação e proliferação de osteoblastos. No entanto, há uma grande limitação na utilização deste tipo de biomateriais: os biomateriais cerâmicos apresentam elevada fragilidade, o que dificulta a sua moldagem para colocação do implante.

Têm sido utilizados como *scaffolds* vários tipos de polímeros sintéticos, entre eles o ácido poliglicólico (PGA) e o ácido poli-DL-lático-co-glicólico (PLGA). No entanto, este tipo de polímeros produz dióxido de carbono quando sujeitos à degradação por hidrólise. Conseqüentemente, ocorrerá a redução de pH local, o que provocará a morte celular [9].

#### 2.1.4. Polímeros

Os biomateriais biodegradáveis do tipo polimérico podem ser naturais ou sintéticos. No último caso, estes podem não aderir facilmente à célula e permitir o seu crescimento, uma vez que podem conter algum tipo de impureza [8]. Ambos devem ter propriedades tais como:

- não podem desencadear uma resposta inflamatória sustentada;
- têm de possuir um tempo de degradação coincidente com o seu tempo funcional;
- têm de possuir propriedades mecânicas adequadas para a função pretendida;
- os produtos de degradação não podem ser tóxicos.

Estes pontos mencionados podem ser afetados por características que o biomaterial tenha tais como o seu peso molecular, hidrofobia, mecanismo de erosão, etc. [15].

É possível observar alguns exemplos de biomateriais pertencentes aos grupos mencionados anteriormente no Quadro 2.

Quadro 2- Exemplos de biomateriais pertencentes aos grupos dos metais, cerâmicas e polímeros (adaptado de [16]).

<b>Metais</b>	<b>Cerâmicas</b>	<b>Polímeros</b>
316L aço inoxidável	Alumina	Polietileno de peso molecular muito elevado
Ligas	Zirconia	Poliuretano
Titânio	Carbono	
Ti6Al4V	Hidroxiapatite	

### 2.1.5. Compósitos

Muitas vezes pretendem reunir-se as características de diferentes biomateriais em apenas uma. Desta forma, surgiu o grupo dos compósitos.

É importante salientar este grupo de biomateriais uma vez que nesta dissertação se utilizou a PCL e a HA com o objetivo de, num só material, reunir as características elásticas da PCL e as características rígidas da HA.

## 2.2. Tipos celulares

Para efetuar estudos de citotoxicidade e proliferação celular, utilizaram-se vários tipos de células adequadas ao material a testar.

Para verificar hipotéticas reações imunológicas/inflamatórias são usados macrófagos e fibroblastos. Neste caso específico o fim em vista é a regeneração óssea numa zona revestida por uma mucosa. Assim sendo, a escolha dos fibroblastos é importante neste aspeto, bem como células osteogénicas.

### 2.2.1. Macrófagos

Os macrófagos são fagócitos derivados dos monócitos. Estes, estão presentes no sangue periférico e, quando atravessam os vasos sanguíneos, chegam ao tecido conjuntivo, diferenciando-se em macrófagos [17-20].

Os macrófagos possuem morfologia muito variada e desempenham várias funções ativas e de regulação muito importantes na resposta imunitária inata e adquirida, sendo considerados como células de limpeza do organismo:

- são os primeiros a chegar ao local de infeção, sendo os primeiros a combater o agente patogénico;
- atraem outras células especializadas para combater a reação inflamatória;
- regulam o funcionamento de células que participam na resposta imunitária;

- acumulam-se em focos inflamatórios, englobando e digerindo os detritos de células destruídas, proteínas estranhas, eritrócitos e mesmo outras células como os neutrófilos [17-20].

Os macrófagos são muito utilizados em estudos *in vitro* uma vez que possuem todas as características e funções mencionadas, conseguindo mudar o seu fenótipo dependendo do tipo de estímulos recebidos [17-20]. É possível observar macrófagos visualizados no microscópio ótico de contraste de fase (MOCF) na Figura 1.

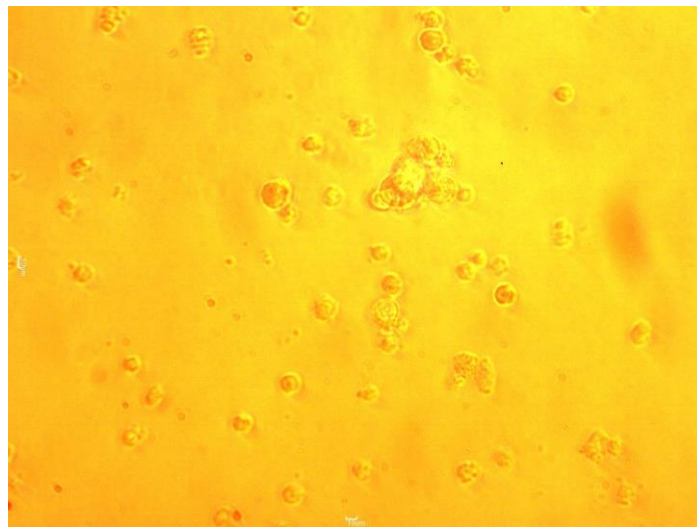


Figura 1 - Macrófagos não corados observados ao MOCF (200x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.

### 2.2.2. Fibroblastos

Os fibroblastos são as principais células do tecido conjuntivo. Têm como função fundamental produzir componentes da matriz extracelular, assim como digeri-la e reabsorve-la (*Figura 2*). Desta forma, os fibroblastos, através de sinais emitidos pelo organismo ou mesmo sinais locais, conseguem controlar a quantidade e qualidade da matriz. Eles são responsáveis pela síntese de muitos dos componentes desta como o colagénio, proteoglicanos e fibras elásticas, para além de glicosaminoglicanos e glicoproteínas. Atuam numa fase posterior aos macrófagos, quando é necessário cicatrizar a infeção [21-23].

Estas células produzem fatores de crescimento que, conseqüentemente, irão interferir no metabolismo celular, controlando o crescimento e a diferenciação celular [21-23].

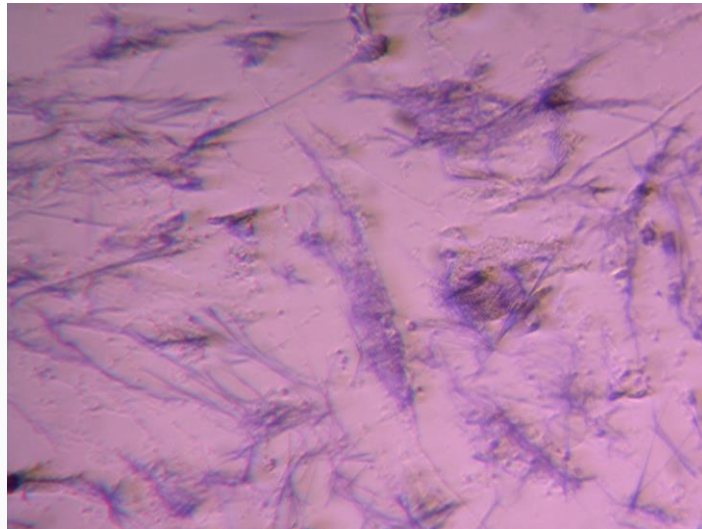


Figura 2 - Fibroblastos corados com MTT observados ao MOCF (200x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC. É possível observar na Figura 3 uma imagem de co-cultura de macrófagos e fibroblastos.

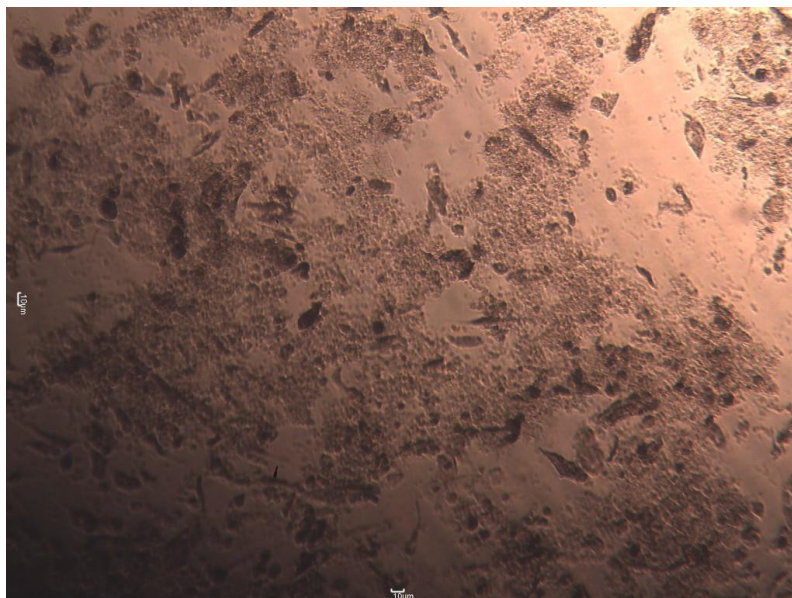


Figura 3 – Co-cultura de macrófagos e fibroblastos não corados observados ao MOCF fase (200x). Fotos do Instituto de Biofísica, IBILI, FMUC.



### 2.2.3. Células osteogénicas

O tecido ósseo desempenha funções vitais ao organismo, fornecendo suporte físico e proteção contribuindo, desta forma, para a homeostase mineral, sendo uma importante fonte de células mesenquimais e hematopoiéticas [24].

Os osteoblastos são células mononucleares e são os principais responsáveis pela remodelação óssea [25]. Eles participam na reabsorção óssea através da degradação da camada de superfície osteóide, expondo assim a matriz mineralizada subjacente à ação osteoclástica [26].

Tal como mencionado anteriormente, sintetizam o colagénio do tipo I que constitui a parte orgânica do osso (Figura 4 **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** Uma vez que nesta dissertação se utilizaram células de osteossarcoma, considera-se que nas experiências se utilizaram células osteogénicas [27].

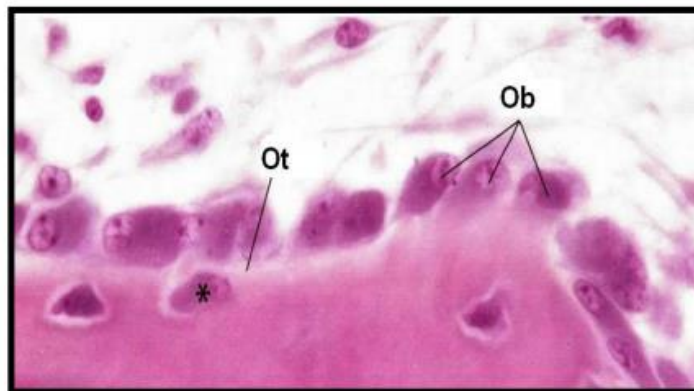


Figura 4 - Corte histológico de osso observado ao microscópio óptico (coloração Hematoxilina-Eosina onde se podem observar osteoblastos (Ob) e osteóide (Ot) (retirado de [28]).

#### 2.2.3.1. Osteoblastos

O osso é um tecido denso composto por uma matriz porosa saturada com fluido. É constituído maioritariamente por uma parte mineral, matéria orgânica e apenas 10% de água. O principal componente da parte mineral são os cristais de fosfato de cálcio que se encontram na forma de HA, que confere ao tecido ósseo uma

certa rigidez. A parte orgânica é majoritariamente constituída por colagénio do tipo I. Estas fibras de colagénio vão proporcionar elasticidade ao tecido ósseo [28,29].

O osso desempenha várias funções, sendo as principais o suporte estrutural e reserva metabólica. É uma estrutura muito dinâmica, uma vez que tem a capacidade de crescer e de se remodelar. O tecido ósseo divide-se em tecido ósseo esponjoso e tecido ósseo cortical. Ambos são constituídos pelos mesmos tipos de células, diferindo apenas estrutural e funcionalmente [28].

No âmbito deste trabalho, é importante caracterizar as células principais constituintes do osso, uma vez que se realizaram testes com células osteogénicas. O tecido ósseo é constituído por duas linhas celulares principais: as células da linha osteoblástica e as células da linha osteoclástica. Irá dar-se maior relevância aos osteoblastos, uma vez que estas células são fundamentais para a comunicação celular. São células cúbicas e sintetizam o colagénio do tipo I, que, como foi dito anteriormente, é o principal constituinte da parte orgânica do osso. São responsáveis pela formação da matriz óssea, assim como pela sua mineralização. Para além do colagénio, também sintetizam proteínas com grande relevância no processo de mineralização, conseguindo estabelecer a ligação do colagénio aos cristais de HA, como é o caso da osteocalcina [28].

Os osteócitos são outras das células constituintes do osso que se encontram no interior da matriz mineralizada. Permitem a passagem de nutrientes e de outras substâncias, uma vez que são altamente ramificados e captam as alterações da matriz óssea, recebendo os estímulos mecânicos que alertam os mecanossensores. Desta forma, sempre que é necessário, desencadeia-se um processo de remodelação óssea [28].

Por fim, existem os osteoclastos que são células muito grandes multinucleadas e que têm como função a reabsorção da matriz óssea. Muitas vezes considera-se o osteoclasto como uma célula sanguínea, uma vez que tem muitas funções imunológicas, sendo muito relevante no processo de remodelação óssea [28].

Na Figura 5 é possível observar estes três tipos de células constituintes do osso.

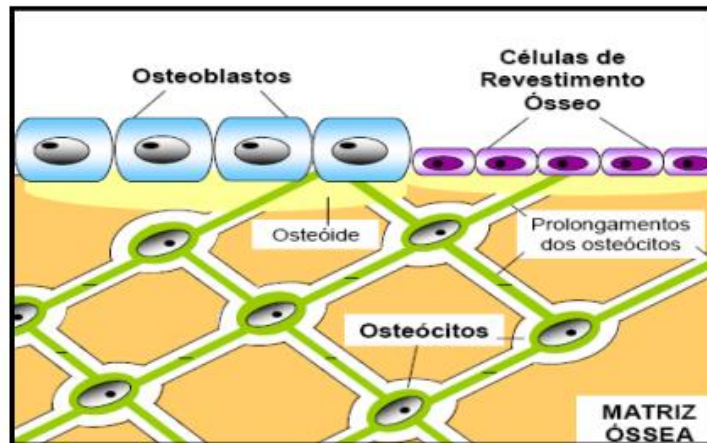


Figura 5 - Esquema onde é possível observar os três tipos de células constituintes do tecido ósseo (retirado de [28]).

#### 2.2.3.2. Células de osteossarcoma

O osteossarcoma é definido como um tumor maligno, sendo as células tumorais malignas que formam diretamente o osteóide ou osso imaturo [30,31].

Pode ser classificado como primário ou secundário, sendo o primeiro mais frequente nos jovens e mais localizado, uma vez que o osso está em crescimento; e o osteossarcoma secundário ocorre mais em idosos, havendo uma distribuição mais alargada que pode abranger todo o organismo [30]. É um dos tumores mais resistentes a possíveis quimioterapias convencionais, levando, atualmente, a uma maior investigação de outros tratamentos [32].

As células do osteossarcoma crescem mais rapidamente que as células osteogénicas benignas. É possível observar um caso de osteossarcoma no fémur na Figura 6.

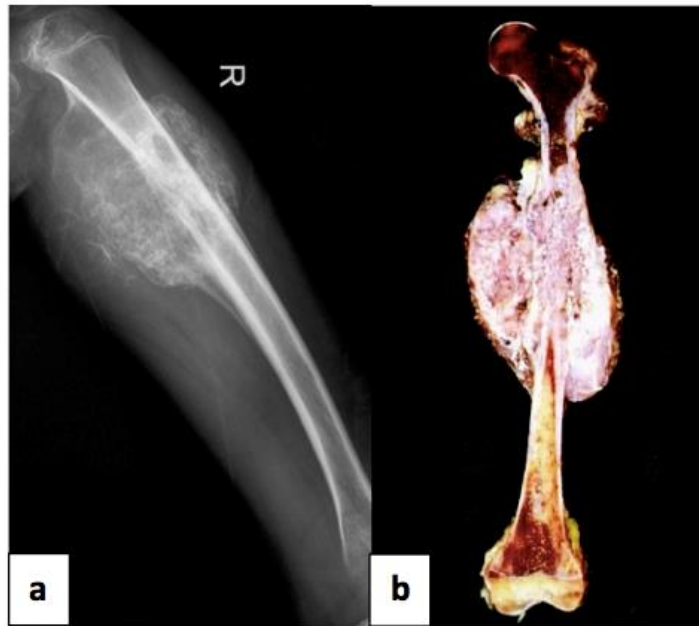


Figura 6 - **a)** Rx de um úmero com um tumor do tipo osteossarcoma (retirado de [38]); **b)** foto de peça cirúrgica de úmero com osteossarcoma (retirados de [33]).

Seguidamente, caracterizar-se-á cada tipo celular utilizado neste trabalho: macrófagos, fibroblastos e células osteogénicas normais.

#### 2.2.4. Células estaminais mesenquimatosas

Dada a futura aplicação dos *scaffolds* desenvolvidos na área da Medicina Dentária, é referido a importância das células estaminais mesenquimatosas e sua diferenciação para a obtenção de fibroblastos e osteoblastos.

##### 2.2.4.1. O dente

Seguidamente irá caracterizar-se o dente, uma vez que foi a fonte de células osteogénicas normais e fibroblastos, que se utilizaram neste trabalho, como mais à frente será mencionado. Para além disso, o objetivo deste trabalho é a criação de biomateriais para regeneração óssea maioritariamente a nível do maxilar e da mandíbula, o que torna também importante esta secção.

O dente desempenha diversas funções desde a mastigação, à proteção e à sustentação de tecidos moles, e a gonfose, ou seja, a sua ligação com a raiz, consiste num tipo específico de articulação fibrosa. O dente está fixo através de fibras colagénicas que fazem parte do ligamento periodontal. Este é bastante resistente, uma vez que consegue suportar as forças resultantes do processo de mastigação, o que se torna uma vantagem para manter os dentes fixos no mesmo lugar [34].

As zonas anatómicas do dente (Figura 7) são:

- **coroa:** porção visível do dente e o seu formato determina a sua função;
- **colo:** porção que faz a ligação entre a coroa e a raiz;
- **raiz:** responsável pela fixação do dente no osso através do alvéolos que se encontram no interior do mesmo. Tem também como função o suporte do impacto das forças de mastigação. O número de raízes varia consoante o dente em questão, pode ser única ou múltipla [35].



Figura 7 - Divisão anatómica do dente: coroa, colo e raiz (retirada de [35]).

As camadas de tipos de tecido/estrutura (Figura 8 e 9) são:

- **esmalte:** é o tecido mais duro do corpo humano e forma uma capa protetora que reveste a coroa. Desta forma os dentes tornam-se aptos para a mastigação;
- **dentina:** é menos resistente que o esmalte, mas é mais desenvolvida uma vez que se encontra em contacto com a coroa e a raiz do dente. Possui uma cavidade onde se encontra a polpa dentária;

- **polpa:** tecido mole que contém células estaminais e mantém os componentes orgânicos do dente. Caracteriza-se pela presença de tecido conjuntivo laxo rico em células onde se destacam os fibroblatos, vasos, nervos e os odontoblastos (células que produzem a polpa dentária);
- **cemento:** tecido que cobre as raízes anatômicas dos dentes humanos. A sua dureza é menor da que a da dentina [35].

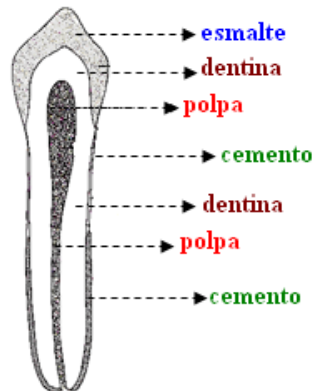


Figura 8 - Divisão estrutural do dente: esmalte, dentina, polpa e cemento (retirada de [35]).

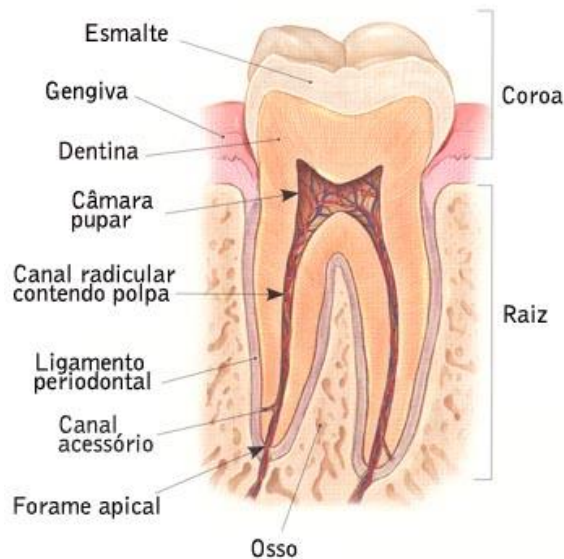


Figura 9 - Esquema de um corte longitudinal de um dente (molar) (retirado de [36]).

Existem vários grupos de dentes em cada arcada dentária (superior e inferior), cada um com a sua função, que determina a forma e estrutura: incisivos, caninos, pré-

molares e molares. A dentição humana possui 20 dentes decíduos (oito incisivos, quatro caninos e oito pré-molares) e 32 permanentes, que se distribuem de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Dentição decídua: } i (2/2) c (1/1) m (2/2) = (10/10) = 20$$

$$\text{Dentição permanente } I (2/2) C(1/1) PM(2/2) = (16/16) = 32 \text{ [38].}$$

Segundo esta fórmula, cada dente está representado pela letra inicial, sendo minúscula para os dentes decíduos e maiúscula para os permanentes. As frações simbolizam a separação das arcadas dentárias [35].

Utilizaram-se para este trabalho dentes molares imaturos ainda inclusos ou no início da erupção para a obtenção de células estaminais e fibroblastos provenientes da polpa dentária. Pertencem à dentição permanente uma vez que possuem mais polpa e bolsas radiculares maiores e em maior número, uma vez que há uma bolsa radicular por raiz. Normalmente são provenientes de jovens de 13-15 anos por motivos ortodônticos [35].

### 2.3. Cultura celular

A cultura celular foi realizada com células aderentes. Assim, utilizaram-se frascos próprios e meios específicos adaptados ao seu crescimento.

A cultura celular exige que todos os materiais estejam esterilizados quando entram na câmara de fluxo laminar, utilizando álcool a 75% para desinfetar tudo o que entra. A sala de cultura encontra-se a uma pressão negativa e é necessário tomar os devidos procedimentos para que não ocorra uma contaminação: uso de batas e luvas. A sala de cultura é constituída por incubadoras e MOCF uma vez que observam-se as células sem corante.

## 2.4. Técnica histológica

A técnica histológica permite estudar os tecidos biológicos, observando a sua estrutura. Compreende vários passos sequenciais devido às características dos tecidos, dos reagentes e do equipamento. O tecido é submetido a cortes finos, sendo posteriormente fixado e corado. Desta forma, observam-se as amostras ao microscópio ótico [37].

## 2.5. Técnicas de esterilização

A esterilização consiste no processo que tem como objetivo remover bactérias e outros microorganismos (fungos, leveduras e vírus) e pode ser feita através de processos físicos ou químicos [38]. Existem vários tipos de esterilização, tendo cada um as suas vantagens e desvantagens, como por exemplo esterilização por óxido de etileno e esterilização por plasma, que foram utilizadas neste trabalho. Mais à frente será caracterizado cada um dos métodos de esterilização utilizados e de que forma se procedeu para os *scaffolds* manterem as características desejadas.

A título de informação, é possível observar alguns métodos de esterilização utilizados no Quadro 3.

Quadro 3 - Alguns tipos de esterilização utilizados a nível hospitalar (adaptado de [39]).

<b>Métodos de esterilização</b>	<b>Alternativas</b>
<b>Métodos físicos</b>	Vapor saturado/autoclaves Calor seco Raios gama/Cobalto
<b>Métodos químicos</b>	Glutaraldeído Formaldeído Ácido paracético
<b>Métodos fisico-químicos</b>	Óxido de Etileno Plasma por peróxido de hidrogénio Plasma por gases Vapor de Formaldeído



## 2.6. Modelo animal

Há muitos anos que o rato é o modelo animal mais utilizado em estudos *in vivo*, uma vez que apresenta características anatomo-fisiológicas idênticas ao ser humano, é fácil de manipular, tem uma manutenção relativamente económica e em espaços reduzidos (gaiolas) em instalações apropriadas, certificadas e aprovadas pelos serviços de controlo do Bem-Estar animal<sup>1</sup>, reproduz-se com grande facilidade com um número de crias por ninhada normalmente de 8-11 [40].

Os ratos estão num ambiente controlado em termos de temperatura (24°C), humidade relativa do ar (65%) e, hoje em dia, vivem em gaiolas que foram lavadas num equipamento dedicado com detergentes desinfectantes que não fazem espuma, em cama de carolo de milho esterilizado, comem ração esterilizada e com os nutrientes adequados, têm água acidificada (pH 3-4) *ad libitum* em biberões com tetinas metálicas. As gaiolas estão colocadas em *racks* identificadas em sistemas com filtração de ar de entrada e de saída em instalações dedicadas e certificadas. O ciclo de luz/escuro é inverso ao dos humanos e nas instalações está controlado por relógio. As condições de temperatura e humidade são controladas pelo sistema de *racks*.

---

<sup>1</sup> Divisão do Bem-Estar Animal, da Direção Geral de Veterinária, do Ministério da Agricultura, Florestas, Desenvolvimento Rural e Pescas.



## CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos utilizados neste Trabalho

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 ( $\epsilon$ -caprolactona)

A policaprolactona (PCL) foi um dos primeiros polímeros a ser sintetizado no início de 1930 [48]. É um polímero biodegradável que tem uma elevada resistência mecânica e uma baixa taxa de degradação. Considera-se geralmente que a degradação, resistência mecânica e a biocompatibilidade da PCL proporcionam a sua utilização em aplicações na Engenharia de Tecido Ósseo [42,43].

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 [44,45]. Cada método afeta o peso molecular resultante, a distribuição de peso molecular, a composição de grupo final e a estrutura química dos copolímeros [46,47]. É possível observar a reação de polimerização para a preparação da PCL na Figura 7.

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

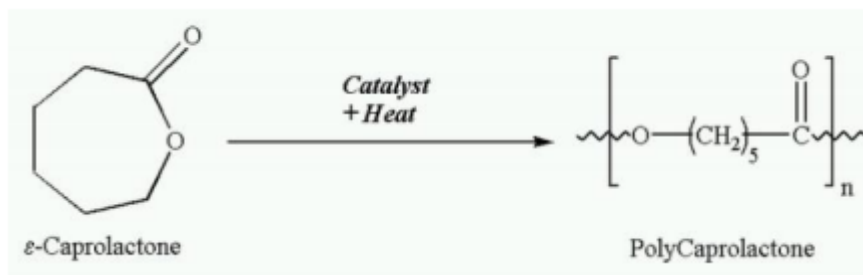


Figura 10 - Reação de polimerização para a preparação da PCL pela abertura do anel do monómero de caprolactona [48].

### 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  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$  [49]. 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 [50-52].

Existem dois tipos de HA: natural e sintética. A primeira é caracterizada por possuir a composição química das matérias-primas, a partir das quais foram produzidas, já na HA sintética não acontece o mesmo, uma vez que é sujeita a alterações da sua estrutura através de temperaturas elevadas com o objetivo de reduzir os riscos de transmissão de doenças [53].

Para este trabalho, a HA natural foi obtida através da calcinação de ossos de bovinos a  $600^\circ\text{C}$  e a HA sintética foi comprada à Altakitin.

## 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  $37^\circ\text{C}$  numa atmosfera humidificada (95% de humidade relativa) e rica em 5% de  $\text{CO}_2$  numa incubadora apropriada (Certilab:

06-10960; Hera Cell 150-Thermo elétron corporation, USA) que regularmente são revistas por uma empresa certificada (Certilab).

### 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 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 fluidos 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, se normais dos outros pontos de vista, muito dificilmente implicam contaminação dos manipuladores; já doentes com tuberculose ou outras patologias contagiosas não. Por outro lado, dado o interesse que se revelou por parte dos serviços de cirurgia quando cedem estas amostras para ter a noção da resposta dos doentes e, por outro lado, a obtenção de um número muito menor de macrófagos em casos de menor gravidade mas mais

correntes<sup>2</sup>. Estudos anteriores demonstraram que usar macrófagos humanos ou de rato é indiferente nos testes de citotoxicidade de biomateriais [54].

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) [55,56].

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

Inicialmente procedeu-se à ocisão do animal através do deslocamento cervical<sup>3</sup>. O segundo passo consistiu colocar o rato dentro de uma câmara de fluxo laminar (Holten, HB 2448, certificada) esterilizada por luz ultravioleta (U.V.). Tal como todos os procedimentos realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar, é importante efetuar a sua limpeza com álcool a 75%, assim como todos os materiais utilizados dentro desta câmara, se encontrarem estéreis sejam passados com álcool a 75%, assim como os ratos no seu suporte antes de entrarem dentro da câmara.

Para se proceder à recolha dos macrófagos peritoneais injetaram-se na cavidade peritoneal cerca de 20 ml de tampão fosfato estéril<sup>4</sup> usando uma agulha 25G x 1", 0,5 x 25 mm (Terumos® Neolus, NN-2525R), acoplada a uma seringa de 10 ml (Terumos®, SS+10ES1). 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

---

<sup>2</sup> Por exemplo 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.

<sup>3</sup> De acordo com o anexo II do Decreto-Lei Português nº 113/2013 [64].

<sup>4</sup> Este tampão fosfato é preparado com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM (Panreac, 1319651211), KCl 2,7 mM (Sigma, P9333), NaCl 137 mM (Sigma, S7653), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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.

que o líquido não entra entre a pele e a parede muscular, mas sim atravessa estas estruturas e se distribui por baixo do *epiplon* [58].

Seguidamente, massajou-se a zona abdominal 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 (Terumos®, SS + 01T1) acoplada a uma agulha 19G x 1", 1,1 × 25 mm (Terumos® Neolus, NN-1925R). Colocou-se o fluído recolhido em *Falcons* estéreis de 15 ml (Corning®, 430052) [58].

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 [centrífuga *Multifuge Heraeus* (1 L-R, certificada pela Certilab)]. Assim, foi possível separar o sobrenadante do *pellet*. Numa sala de cultura celular, dentro de uma câmara de fluxo laminar em condições estéreis descartou-se o sobrenadante, reservando o *pellet*. Este tipo de células requer, de acordo com as indicações da bibliografia da área [66,67] RPMI – 1640<sup>5</sup> estéril como meio de cultura.

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

---

<sup>5</sup> Ao meio RPMI é adicionado FBS (Soro Fetal Bovino) a 10% de FBS (FBS, Sigma, F7524), 1% de L - glutamina (Sigma, G7513) e 1% de solução antibiótica com penicilina / estreptomicina (Pen / Strep, Sigma, A5955). Esta mistura passa a designar-se meio RPMI 1640 completo 10%.

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 pano para células aderentes) de 6 poços (Costar®, Corning Incorporação, 3516). 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% CO<sub>2</sub> 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,83.1830). 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 para um *Falcon* estéril de 15 ml para se proceder a uma centrifugação nas mesmas condições anteriormente referidas.

Voltou a separar-se o sobrenadante do *pellet* e colocou-se novamente 1 ml do mesmo meio de cultura completo de forma a re-suspender 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, T8154) e procedeu-se à contagem de células na câmara de *Neubauer* (Neubauer-improve,0640030, Alemanha) ao microscópio ótico de contraste de fase (Nikon Eclipse, TS100). A câmara de *Neubauer* consiste numa lâmina de utilização no microscópio, que tem a função de fazer a contagem de células por unidade de volume de uma suspensão (Figura 11). Na câmara existem duas áreas marcadas com uma profundidade definida 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 será possível observar ao MOCF. Quando existem 200 células em cada quadrado pequeno, a contagem torna-se difícil, sendo melhor proceder à sua diluição. É possível fazer a contagem em qualquer um dos quadrantes. Para fazer a leitura, segue-se um trajeto serpenteante no esquema dos 16 quadrados de cada quadrante (Figura 11), contando o número de células presentes em cada um desses quadrados. Uma vez que o volume de cada quadrante é de  $0,1 \text{ mm}^3$ , o número total de células de um quadrante irá ser  $1 \times 10^4 \text{ ml}$  [54,55].

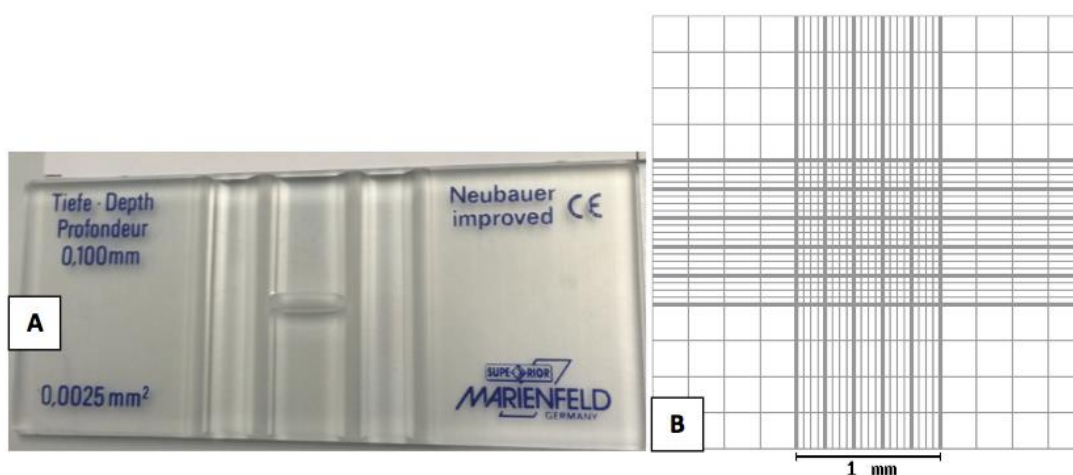


Figura 11 - **A)** Câmara de *Neubauer* (retirada de [56]); **B)** esquema de quadrantes utilizado na contagem de células (Neubauer-improve,0640030, Alemanha).

Desta forma, soube-se o número de células viáveis presentes. Se não se pretendessem usar de imediato os macrófagos procedia-se à sua criopreservação em tubos específicos para esse fim (Sarstedt, 72380992) juntamente com DMSO (dimetilsulfóxido) estéril a 10% (Sigma, D2650). Utilizou-se DMSO uma vez que é um agente criopreservante e faz com que a água presente nas células não cristalize de forma rápida. Assim, as células conseguem sobreviver mais facilmente [64].

Os tubos de criopreservação já com as células, devidamente identificados<sup>6</sup>, foram colocados numa arca frigorífica dedicada apenas a este fim (Thermo Scientific, Hera freeze HFUT serves, HFU3001V63) a  $-80^{\circ}\text{C}$  e, caso não se preveja a utilização destas células em experiências dentro de 3 a 4 meses, passadas no máximo 3 semanas, esses

<sup>6</sup> 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.

tubos foram transferidos para uma câmara de azoto líquido (-190°C) (ThermoNorma, Cryoplus 1) 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, fornecidos Área de Endodontia do Departamento de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilo-Facial 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 em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, 4314640) com meio DMEM (DMEM; Hyclone, Logan, UT, USA) a 10% de FBS (Sigma, F7524), 1% de L-glutamina (Sigma, G7513), 1% de antibiótico Pen/Strep (Sigma, A5955), isto é DMEM completo nas condições referidas anteriormente para os macrófagos. Foram-se observando ao MOCF e mudando o meio<sup>7</sup> 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 (pipetador automático com pipetas de vidro estéreis (WWR, European Cat 612-1702iS07712) e depois colocam-se nesses frascos 6 a 7 ml de uma solução de tripsina a 0,25% (BioWest, L0930-100). 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 estão em suspensão, de forma a inativar a reação enzimática, acrescenta-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

---

<sup>7</sup> 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.

experiências programadas dentro de 1 a 1,5 meses, os fibroblastos também podem ser criopreservados seguindo um protocolo idêntico ao dos macrófagos com a diferença do meio usado. Para tempos mais longos devem ser conservados a  $-190^{\circ}\text{C}$  na câmara de azoto líquido.

### 3.2.3. Osteoblastos e células do osteossarcoma

Os osteoblastos resultaram da diferenciação de células estaminais colhidas da polpa dentária de dentes imaturos.

Foi realizada a extração de germes dentários ou dentes imaturos a doentes entre os 13 e os 15 anos no Departamento de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilo-Facial 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 (Sigma, A5955) e 20% de Fungizone (Gibco, 15290-018) . No caso de dentes imaturos é necessário abrir delicadamente o dente com uma broca e retirar a polpa. No casos dos germes dentários trabalha.se com a colheita total. A amostra dentária foi transportada num meio específico DMEM-KO<sup>8</sup>.

As células estaminais da polpa dentária (DPSC) (ou dos germes dentários) foram isoladas enzimaticamente. Desta forma, colocou-se a amostra durante 1h a  $37^{\circ}\text{C}$  numa solução de digestão [3 mg/ml de colagenase do tipo I, 4 mg/ml de dispase em 4 ml de PBS estéril, 100 U/ml de penicilina com 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de streptomina (Sigma, A5955)]. Filtrou-se a solução com um filtro de 20  $\mu\text{m}$  (Whatman, FP 30/0.2 CA-S/ G9933530). a amostra foi colocada numa peneira estéril de 70  $\mu\text{m}$  (BD Falcon, 1/ea, 352350) . O filtrado recolhido foi lavado duas vezes com meio DMEM (Hyclone, Logan, UT, USA) e centrifugado (nas condições já referidas).

Colocaram-se as células em frascos de cultura 25  $\text{cm}^2$  (Corning, 14831) na estufa, nas condições já descritas, para se dividirem ao longo do tempo. Quando

---

<sup>8</sup> 1 ml FBS, 100  $\mu\text{l}$  Pen/Strep, 100  $\mu\text{l}$  Glutamina, 10  $\mu\text{l}$  Fungizone e 8,8 ml DMEM.

atingiram cerca de 70% de confluência foram-se descolando (segundo o protocolo enzimático já descrito) até se obterem vários frascos.

Efetuuou-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 [65]. Preparou-se o anticorpo primário 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  $10^7$  células, centrifugou-se (1 100 rpm durante 10 min) e aspirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 80  $\mu$ l de tampão por cada  $10^7$  células. Adicionaram-se 20  $\mu$ l de Ig M (imunoglobulina M) *anti-mouse microbeads* (R&D Systems, MAB1038, USA) por  $10^7$  células no total (misturar bem) e incubar 15 minutos (2-8°C). Lavaram-se as células adicionando 1-2 ml tampão por cada  $10^7$  células e centrifugou-se a 1 100 rpm durante 10 min. Descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se as células em 500  $\mu$ l de tampão. Colocou-se a coluna no suporte magnético (MACS, Biotec, Miltenyi). A seguir lavou-se a coluna (MACS, 120-000-475) com 3 ml de tampão e aplicou-se a suspensão celular (3x). Recolheram-se as 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 cm<sup>2</sup> que se colocou na estufa (nas mesmas condições já referidas nos outros protocolos).

Dadas as circunstâncias que ocorreram no laboratório da altura perderam-se as células estaminais que estavam em crescimento. Como tinha ficado um frasco das células da mistura inicial (essencialmente fibroblastos e poucas células estaminais) por ter poucas células mesenquimatosas, decidiu-se tentar efetuar o protocolo da sua diferenciação em osteoblastos [65]. 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);
- dexametasona (Oradexon, 5 mg/ml, Alfa Aesar, 76185 Alemanha) 12,5 µl;
- vitamina C (Vitamina C-R, 500 mg, CONFAR) 100 µl;
- vitamina D (Vigantol, 0,5 mg/ml, Merck, 9881706) 100 µl;
- glicerofosfato (Sigma, G9891) 500 µl.

Desta forma, obtiveram-se osteoblastos, que já de si são células que crescem muito lentamente, em número muito escasso, o que não permitiu a sua utilização nos testes *in vitro*. Dadas as pesquisas bibliográficas efectuadas, verificámos que a nível internacional o problema da obtenção e do crescimento muito lento é comum a todos os grupos de investigação, pelo que trabalham com linhas de osteossarcoma [66-68].

Como alternativa, solicitámos a cedência de 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 lento, tal como previsto pelo que se passa a nível de desenvolvimento de um tumor ósseo no organismo humano. Neste contexto conseguimos apenas fazer dois ensaios com esta linha.

### 3.3. Técnica utilizada para a produção dos *scaffolds* e respetivo *Design*

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.

Dada a necessidade de obtenção dos *scaffolds* para a realização do presente trabalho, foi obrigatório aprender a operar a bioextrusora nas instalações do IPL, sob a supervisão de pessoal dessa instituição. Neste contexto será descrito o equipamento e o processo de produção mais em detalhe.

A bioextrusora possui dois sistemas de deposição diferentes: um sistema de rotação para a deposição de vários materiais e outro para uma deposição unimaterial que utiliza um parafuso para auxiliar o processo de deposição.

A bioextrusora é constituída por 3 unidades:

- a unidade principal, onde se produz o *scaffold* propriamente dito. Esta unidade é constituída pelo depósito onde se coloca o material (de que vai ser feito o *scaffold*) ainda sólido e pela plataforma onde se formará o *scaffold* pretendido;
- a unidade de controlo de temperatura: eesta unidade é possível regular as temperaturas de 3 partes da bioextrusora: da extrusora propriamente dita, do depósito e do canal que faz ligação para se conseguir uma fusão eficaz. As duas primeiras partes mencionadas têm uma temperatura máxima de 86°C e uma temperatura mínima de 85°C. Já a última parte mencionada apresenta uma temperatura máxima de 91°C e uma temperatura mínima de 90°C, para se garantir a fusão total do material colocado no depósito;
- unidade para controlar a velocidade de rotação: seleccionou-se uma velocidade de rotação de 12 Volts (aproximadamente 45 rpm).

É possível observar estas 3 unidades na Figura 12.

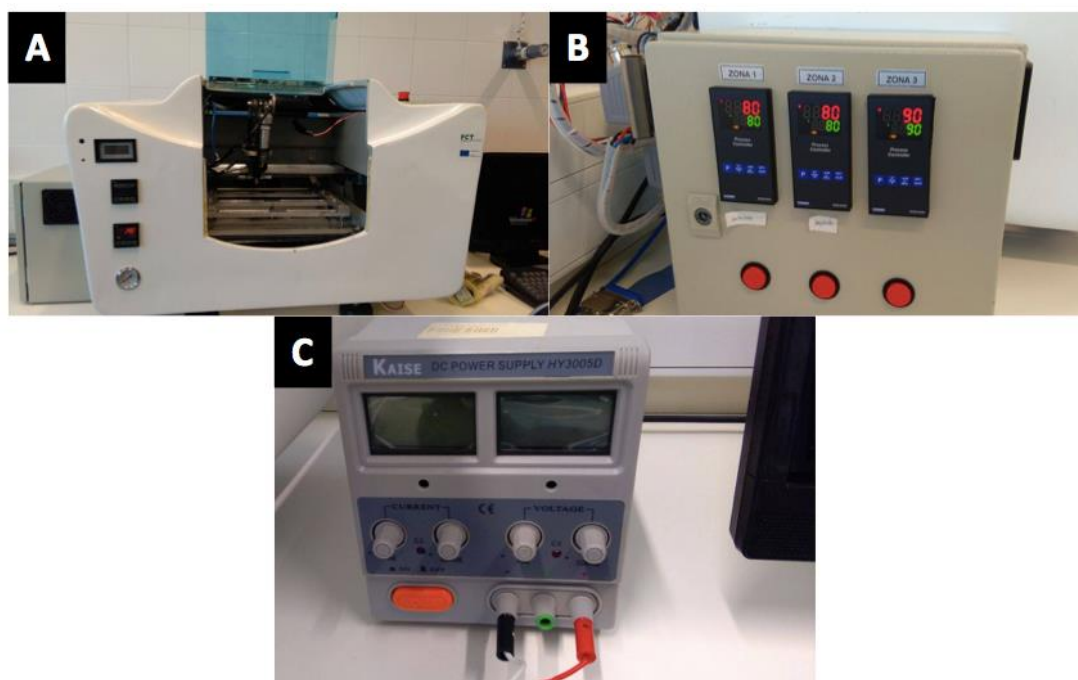


Figura 12 - Bioextrusora (IPL) – é constituída por 3 unidades: **(A)** unidade principal de produção do *scaffold*; **(B)** unidade de controlo de temperaturas; **(C)** unidade para controlar a velocidade de rotação.

A bioextrusora funciona através de 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.

O objetivo deste trabalho é dar continuidade a um trabalho anteriormente desenvolvido [13]. Desta forma, foram produzidos *scaffolds* exatamente com as mesmas características que os anteriores. Assim, os *scaffolds* têm uma espessura de 0,84 mm. O espaçamento entre camadas que constituem a peça (ST) (Figura 13) é de 0,28 mm (valor fixo). Desta forma, o *scaffold* tem 3 camadas, uma vez que  $0,84/0,28 = 3$ . É importante referir que a primeira camada corresponde à camada zero. Assim, o *scaffold* tem, na realidade, 4 camadas no total.

Desta forma, será possível estudar a citotoxicidade e adesão celular devidos às características dos *scaffolds*. No Quadro 4 é possível observar as características do material testado.

Quadro 4 - Combinações possíveis das propriedades dos *scaffolds*: podem ser constituídos apenas por PCL ou por PCL + HA natural ou sintética a 10% ou 25%, respectivamente. O tamanho do poro pode variar (300  $\mu\text{m}$  ou 600  $\mu\text{m}$ ) assim como a geometria (45° ou 90°).

Material	HA (N/S)	Quantidade de HA (%)	Tamanho do poro ( $\mu\text{m}$ )	Geometria ( $^{\circ}$ )
PCL			300	45
			300	90
			600	45
			600	90
	N	10	300	45
			300	90
			600	45
		25	300	45
			300	90
			600	45
	S	10	300	45
			300	90
			600	45
			600	90
		25	300	45
			300	90
600			45	
600			90	

Variaram-se essas características de forma a testar qual será o melhor material para regeneração óssea:

- relativamente à composição do *scaffold*, este pode ser constituído apenas por HA natural ou sintética, a 10% ou a 25% conferindo grande resistência ao material, ou então também 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. Escolheu-se utilizar em percentagens de 10 e 25 uma vez que se fosse em maior concentração o material ficava quebradiço e perdia muita elasticidade;

- relativamente ao tamanho do poro e à geometria do *scaffold*, para facilidade de produção foi escolhida a dimensão de 30 x 30 x 1 mm (um quadrado), sendo o tamanho do poro de 350  $\mu\text{m}$ . A orientação das fibras escolhida foi 90° ou 45°, assim como também os filamentos têm 300  $\mu\text{m}$  ou 600  $\mu\text{m}$  (Figura 13).



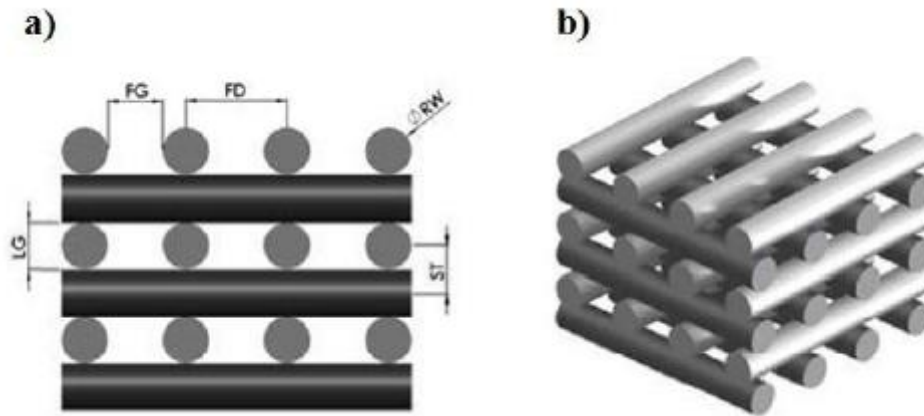


Figura 13 - **a)** Esquema que permite observar a diferença entre diâmetro de filamento (RW), distância entre centros de filamentos (FD), espaçamento entre filamentos ou dimensão do poro (FG), espaçamento entre camadas (LG) e ST; **b)** vista tridimensional do *scaffold* [69].

### 3.4. Esterilização dos *scaffolds*

Após a produção foi 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 plasma (usando como gás o oxigénio e o peróxido de hidrogénio). Seguidamente descreve-se sucintamente 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 ampla gama de agentes patogénicos e a sua *performance* está dependente de vários fatores como a humidade, temperatura e tempo de exposição.

O óxido de etileno é um gás incolor, inflamável e explosivo, com a fórmula química geral  $C_2H_4O$  produzido quando o etileno ( $C_2H_4$ ) e o oxigénio ( $O_2$ ) reagem sobre

um catalisador de prata a 200-300°C [70]. Quando se emprega para esterilização utiliza-se um equipamento especial, sendo necessário seguir os seguintes passos:

- a câmara é regulada à temperatura desejada (neste caso entre 40°C e 50°C) e com uma humidade entre 40% e 90% (obtida colocando água no seu interior);

- coloca-se o óxido de etileno dentro da câmara com concentrações variáveis entre 600 mg/l e 1 200 mg/l durante 24-48h (de acordo com a capacidade do equipamento) para o material ficar esterilizado com segurança (as fitas de garantia de esterilidade ficam com as riscas a preto);

- de seguida faz-se a remoção do óxido de etileno residual e dos seus subprodutos tóxicos;

- a esterilização propriamente dita ocorre quando este gás reage com os ácidos nucleicos, o que faz com que muitos microrganismos morram [71].

### 3.4.2. Plasma

O método de esterilização por óxido de etileno é, atualmente, o mais utilizado nos hospitais. Neste trabalho esterilizaram-se os *scaffolds* em dois equipamentos diferentes: uma existente no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra e outra no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade de Coimbra.

Este método apresenta vantagens relativamente à esterilização por óxido de etileno, uma vez que é mais seguro para o operador e para o doente, na prática clínica: não produz subprodutos tóxicos como o método anterior, nem é necessário esperar tanto tempo para abrir o equipamento. Além disso permite a esterilização de material cirúrgico mais delicado, que se degrada usando óxido de etileno, bem como a redução de custos, pois não é necessário descartar este tipo de materiais após uma utilização. Acresce que cada utilização em si é mais económica do que usando óxido de etileno. No entanto, o equipamento para realizar este método é mais caro de base e tem uma capacidade menor, pois a câmara é mais pequena, levando a ter se serem efectuados

mais ciclos de esterilização, e tem uma manutenção mais dispendiosa. Nesta perspectiva não é ainda muito escolhido pelos centros hospitalares.

No caso deste estudo, verificou-se que a esterilização por plasma (quer usando oxigénio (Vitatech) quer peróxido de hidrogénio) torna a superfície do *scaffold* mais hidrofílica, o que melhora o seu comportamento *in vitro*. Para além disso, a esterilização por óxido de etileno deixa resíduos na superfície dos materiais, o que depois poderá influenciar a adesão celular *in vitro* e o comportamento *in vivo* [72].

A esterilização por plasma do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, é efetuada a temperaturas menores que 50°C, usa peróxido de hidrogénio e segue o protocolo (V-PRO 60 Low Temperature Sterilization System). A duração da esterilização pode ser de 1 h para material poroso e de 35 min para material não poroso:

- **vácuo:** ocorre a remoção do ar do equipamento, atingindo a pressão de 0,3 mm/Hg;
- **injeção:** o peróxido de hidrogénio é inserido no equipamento, mantendo-se no estado de vapor devido ao vácuo anteriormente criado;
- **difusão:** o vapor espalha-se por toda a câmara, penetra na superfície interna e envolve a superfície externa do material. Após a difusão irá formar-se o plasma devido à radiofrequência (emissão de ondas eletromagnéticas);
- **plasma:** uma vez formado (em cerca de 6 minutos) vai efetuar-se a esterilização, pois ocorre a formação de radicais livres, o que leva à morte dos microorganismos;
- **ventilação:** nesta fase final, pretende-se que as pressões no interior e no exterior da câmara se igualem [73].

Quando se procedeu à esterilização por plasma no equipamento do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, utilizou-se o equipamento acoplado a uma botija de oxigénio, escolhendo uma pressão de 0,4 mbar. Cada superfície dos *scaffolds* foi irradiada durante 1 ou 3 minutos (experimentaram-se estes dois tempos) , pelo oxigénio que ia entrando lentamente na câmara.

Na Figura 14 é possível observar-se o equipamento utilizado na esterilização por plasma no DEQ.

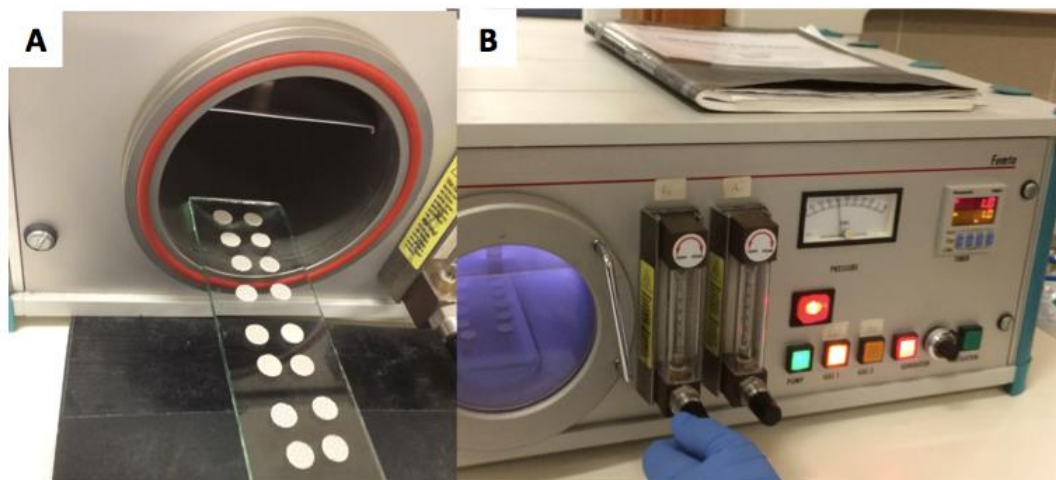


Figura 14 – Equipamento de esterilização por plasma do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. **A)** colocação dos *scaffolds* no interior do aparelho, sendo irradiados durante 1 ou 3 minutos em cada uma das suas faces; **B)** equipamento em funcionamento, com uma pressão de 0,4 mbar.

### 3.5. Produção das substâncias pretendidas

Para se produzirem as misturas que posteriormente foram utilizadas para a manufatura dos *scaffolds*, seguiram-se protocolos estandardizados, uma vez que algumas tinham 10% de HA e outras 25% de HA.

#### 3.5.1. Misturas com 10% de HA (sintética ou natural)

Preparação de 30 g de mistura:

- dissolveram-se 27 g de PCL em 150 ml de clorofórmio (CLO);
- dissolveram-se 0,5 g de ácido oléico em 50 ml de CLO e dispersaram-se 3 g de HA nessa solução. Colocou-se a suspensão de HA sob agitação magnética durante 1 hora;

- adicionou-se a suspensão de HA à solução de polímero e continuou-se a agitar durante mais 1 hora;
- verteu-se a mistura em várias placas de *Petri* de vidro e deixou-se evaporar o solvente durante a noite a cerca de 20°C.
- depois de evaporado o clorofórmio, os filmes formados foram cortados em pequenos pedaços e colocados num estufa de vácuo à temperatura ambiente (20°C) durante 1 dia, de modo a remover potenciais resíduos de solvente.

### 3.5.2. Misturas com 25% de HA (sintética ou natural)

Preparação de 30 g de mistura:

- dissolveram-se 22,5 g de PCL em 125 ml de clorofórmio (CLO);
- dissolveram-se 0,5 g de ácido oléico em 75 ml de CLO e dispersaram-se 7,5 g de HA nessa solução. Colocou-se a suspensão de HA sob agitação magnética durante 1 hora;
- adicionou-se a suspensão de HA à solução de polímero e continuou a agitar durante mais 1 hora;
- verteu-se a mistura em várias placas de *Petri* de vidro e deixou-se evaporar o solvente a evaporar durante a noite
- depois de evaporado o CLO, os filmes formados foram cortados em pequenos pedaços e colocados numa estufa de vácuo à temperatura ambiente (20°C) durante 1 dia, de forma a remover potenciais resíduos de solvente.

## 3.6. Estudos *in vitro*

Os ensaios de cultura permitem testar de forma facilitada, linhas celulares específicas. É possível reter avaliações quantitativas e qualitativas de forma exata uma vez que estes testes são realizados em condições estéreis. São os primeiros testes estudados a ser realizados, de forma a testar os materiais e células pretendidos para depois posteriormente, caso estes testes deem resultados favoráveis, se prossiga para estudos *in vivo*. Os testes *in vitro*, uma vez que são realizados em ambiente estéril, têm

a vantagem de não haver fatores a influenciar os seus resultados. Desta forma, consegue-se diminuir o número de amostras utilizadas em estudos *in vivo*.

### 3.6.1. 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). Uma vez que as caixas de cultura têm todas poços de forma circular foi necessário cortar os *scaffolds* com esta forma de 1 cm de diâmetro. Assim, foi possível colocá-los dentro de cada poço com a ajuda de uma lâmina de bisturi (KATO, Índia) ou agulha (Terumos®) esterilizadas.

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

Em relação à esterilização por plasma foram usados, como já referido, dois equipamentos diferentes. No entanto, da análise estatística efectuada, podemos concluir que não há diferenças significativas e pode ser usado um ou o outro indiferentemente.

Utilizaram-se suspensões celulares nos respectivos meios de cultura semeando  $5 \times 10^4$  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 [6], 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. 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 em co-cultura, alguns *scaffolds* às 120 horas, uma vez que é o tempo limite de macrófagos ativos em monocultura e o início da estabilização dos fibroblastos. Porém, rapidamente se descartou este tempo de co-cultura, pois verificou-se que, na presença dos factores de crescimento sintetizados pelos fibroblastos, os macrófagos conseguiam responder com acuidade às 168 horas.

Desta forma, testaram-se os três tipos celulares em tempos diferentes, tentando simular o melhor possível *in vitro* o que se passaria no organismo para tenta prever o comportamento *in vivo*, numa fase posterior. Assim, colocaram-se as os *scaffolds* nas caixas de acordo com uma distribuição pré-estabelecido para serem incubados com os tipos celulares, em mono ou co-cultura, seleccionados. É possível observar dois exemplos de esquemas realizados na Figura . 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. Depositaram-se as suspensões diretamente sobre os *scaffolds*, previamente colocados nos poços,. No testes que envolveram macrófagos, colocaram-se primeiro 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  $\mu$ l com DMEM completo a 10%. Por fim, quando se utilizaram células osteogénicas colocaram-se 150  $\mu$ l de suspensão celular e 150  $\mu$ l 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.



	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C								
D								
E								
F								

- PCL + HA Natural (25%) – 600 um + 45° -
- PCL + HA Natural (25%) – 600 um + 45° -
- PCL + HA Natural (25%) – 600 um + 45° - Macrófagos + Fibroblastos
- PCL + HA Natural (25%) – 600 um + 90° - Macrófagos
- PCL + HA Natural (25%) – 600 um + 90° - Fibroblastos
- PCL + HA Natural (25%) – 600 um + 90° - Macrófagos + Fibroblastos
- PCL + HA Sintética (10%) – 600 um + 90° - Macrófagos
- PCL + HA Sintética (10%) – 600 um + 90° - Fibroblastos
- PCL + HA Sintética (10%) – 600 um + 90° - Macrófagos + Fibroblastos
- PCL + HA Sintética (10%) – 600 um + 45° - Macrófagos
- PCL + HA Sintética (10%) – 600 um + 45° - Fibroblastos
- PCL + HA Sintética (10%) – 600 um + 45° - Macrófagos + Fibroblastos

A

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C								
D								
E								
F								

- PCL + HA Natural (10%) – 600 um + 45° - Células osteogénicas
- PCL – 600 um + 90° - Células osteogénicas

B

Figura 15 - Exemplos de dois esquemas utilizados para os *scaffolds* com diferentes propriedades. É importante referir que todos os *scaffolds* foram esterilizados ou por óxido de etileno ou por plasma. Neste caso nos dois esquemas foram todos esterilizados por óxido de etileno.

### 3.6.2. 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 quantificando o quanto de MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH (atividade mitocondrial das células viáveis) formando 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 do teste as células são destruídas por ação do isopropanol ácido e os cristais de *formazan* são libertados e a sua quantidade é medida por espectrofotometria, sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis [74].

Em condições estéreis, começou por se retirar o meio de cada poço e, de seguida, colocaram-se 270 µl de meio de cultura e 30 µl de MTT (0,5 mg/ml) (Sigma, M2128). A caixa de cultura permaneceu no escuro, nas condições de cultura, durante 4 horas. É possível observar as diferentes tonalidades de cor na Figura 1.

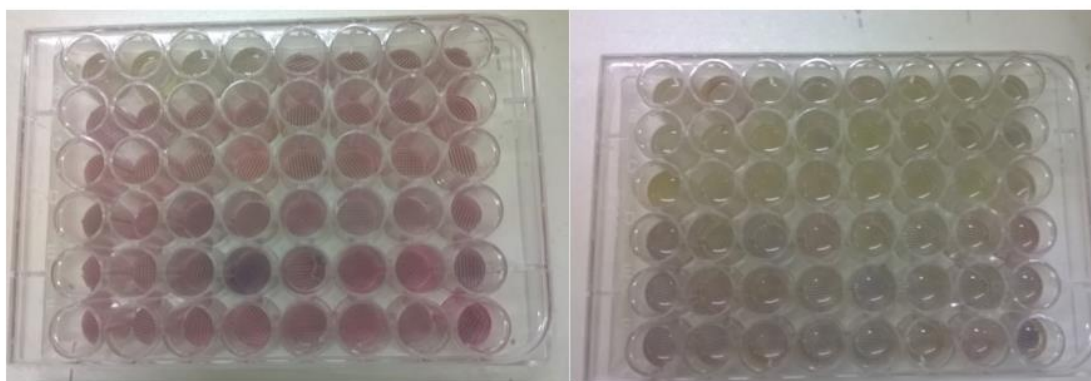


Figura 16 - Caixas de cultura de 48 poços no penúltimo passo do teste de MTT.

No último passo retirou-se a solução contida em cada poço e adicionaram-se 150 µl de isopropanol ácido [ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, H1758) em isopropanol (Sigma-Aldrich, 278475) 0,04 M]. Esperaram-se 15 minutos e mediu-se a absorvância

usando um espectrofotômetro (equipamento para fazer testes de ELISA<sup>9</sup>) (Figura 1) com as seguintes características. Selecionaram-se dois canais de leitura para efetuar a leitura no intervalo entre os dois comprimentos de onda de referência do corante (MTT): 570 nm e 620 nm.

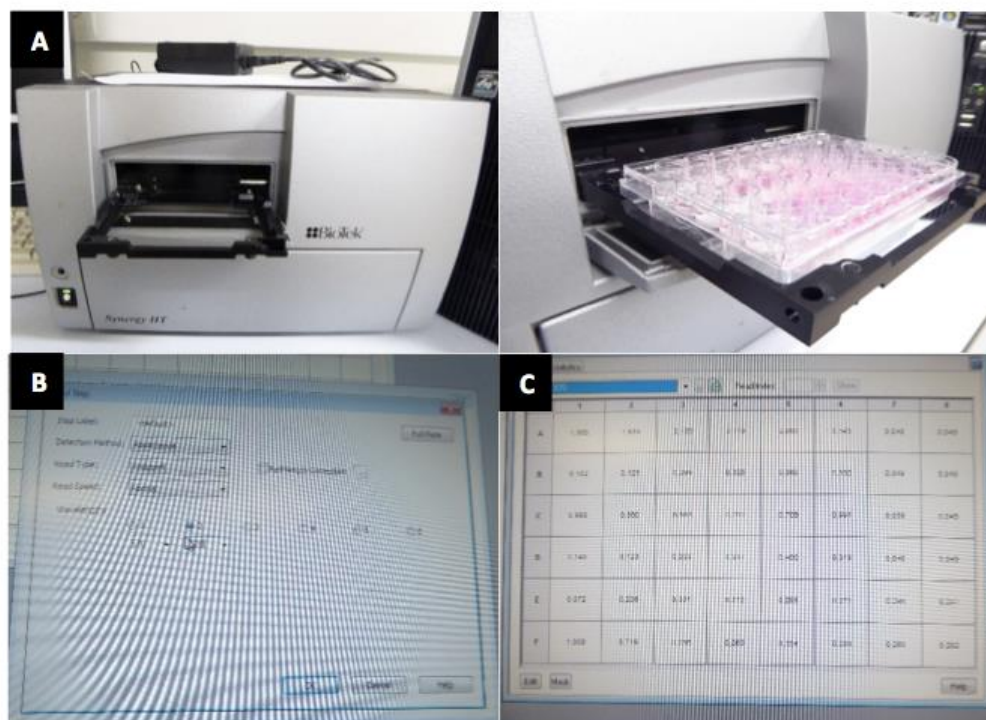


Figura 17 - **A)** equipamento para ler testes de ELISA; **B)** seleção dos comprimentos de onda de leitura no *software* do espectrofotômetro; **C)** quadro de resultados obtidos.

### 3.7. 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 os mesmos *scaffolds* através da sua implantação num modelo animal, tendo-se escolhido ratos *Wistar*. Este modelo animal é o mais utilizado em laboratório dado que a sua manipulação é fácil, a temperatura corporal e valores de bioquímica sanguínea são muito semelhantes aos

<sup>9</sup> ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

do ser humano, assim como a fisiologia. Uma das estirpes de ratos mais utilizada é a *Wistar*, uma vez que tem várias características adequadas (tamanho, peso, permite desenvolver alguns tipos de tumores animais, etc.) [33, 75].

O IBILI-FMUC possui um biotério certificado e com autorização para criação de algumas estirpes de rato e também de ratinho e pessoal especializado para tratar os animais [40].

A sua anatomia é simples estando representada no esquema da Figura . O rato possui:

- um par de membros superiores e um par de membros posteriores mais desenvolvidos já que é saltador, tem 4 dedos em cada pata e almofadas tácteis muito sensíveis entre os dedos, os pavilhões auriculares são finos e rosados e bastante desenvolvidos ;
- a pele está revestida de pêlos bastante compridos e espessos no dorso e mais curtos e finos na porção ventral;
- a cabeça é alongada pois o cérebro dos ratos é mais oblongo e têm o lobo olfativo e a zona auditiva bastante desenvolvidos, dadas as características destes animais (têm um faro muito apurado e os pêlos dos bigodes são extremamente importantes para a pesquisa de alimentos, defesa e cálculo de dimensões, sendo extremamente vibráteis; além de uma capacidade auditiva muito eficaz e em comprimentos de onda diferentes dos humanos);
- esta estirpe é albina pelo que os olhos são transparentes, daí terem uma cor avermelhada viva (vê-se o sangue que passa nos vasos sanguíneos - um sinal de que ocorre a morte do animal é precisamente esta cor viva que fica baça, além da falta de movimentos respiratórios, obviamente). Uma boa visão é imprescindível para a sobrevivência, por isso os globos oculares são mais salientes e estes animais têm hábitos noturnos – geralmente dormem do durante o dia e estão ativos de noite;
- gânglios linfáticos com uma disposição anatômica semelhante à dos humanos;
- o sistema respiratório é, com a devida redução à escala, idêntico aos dos humanos, estando igualmente a traqueia numa posição anterior ao esófago;

- as cavidades torácica e abdominal estão igualmente separadas pelo diafragma; o coração tem uma estrutura e funcionamento semelhante ao da espécie humana e encontra-se também na cavidade torácica, mais do lado esquerdo;
- na cavidade abdominal o peritoneu envolve e protege a face anterior dos órgãos abdominais;
- o sistema digestivo é semelhante, tendo identicamente a devida redução de dimensões, ao humano. As glândulas salivares, principalmente as submandibulares, são bastante desenvolvidas pois são roedores. O fígado tem uma localização anatômica tal como nos humanos no hipocôndrio direito, logo abaixo do diafragma, no entanto é bastante maior e com lobos mais achatados e recobrimdo todo o estômago e porção superior do intestino delgado. A principal diferença é que nestes animais não existe vesícula biliar e o pâncreas não é um órgão estruturado mas existem ilhéus de Langerhans dispersos na gordura que envolve a grande curvatura do estômago e a as pregas do duodeno;
- o baço é mais alongado e delgado do que o dos humanos;
- o sistema renal é em tudo semelhante ao humano, salvo nas dimensões, obviamente;
- o aparelho sexual é muito desenvolvido: no macho os testículos são bastante proeminentes e as fêmeas têm 11 pares de glândulas mamárias, dado o número de crias por ninhada. Ao contrário da espécie humana, as glândulas mamárias quase não são visíveis, apenas aumentando de volume na gravidez e durante o período de amamentação [76].

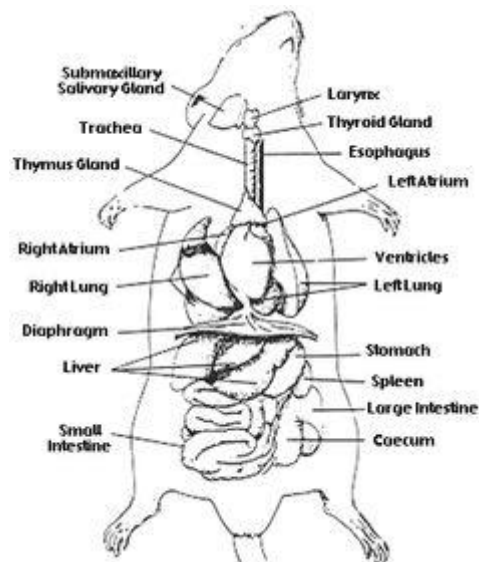


Figura 18 - Esquema representativo da anatomia do animal utilizado nos testes *in vivo*: o rato (retirado de [85]).

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 o animal.

A inserção e recolha dos *scaffolds* no dorso também teve em conta estes conhecimentos no que diz respeito ao tipo e densidade de pêlos, 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.

### 3.8. Estudos histológicos

Dado que a gengiva é constituída essencialmente por tecido conjuntivo, a implantação dos *scaffolds* foi efectuada 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 [78].

Foram selecionados 5 tipos de *scaffolds* para os estudos *in vitro*: 3 que, de acordo com as características, apresentaram melhores resultados e 2 que apresentaram piores resultados [6]:

- PCL + HA N (10%) – 300  $\mu\text{m}$  + 45°
- PCL + HA S (10%) – 600  $\mu\text{m}$  + 90°
- PCL + HA S (25%) – 600  $\mu\text{m}$  + 45°
- PCL + HA S (25%) – 300  $\mu\text{m}$  + 45°
- PCL – 600  $\mu\text{m}$  + 90°

Estavam disponíveis 20 ratos *Wistar*, 19 fêmeas e 1 macho (com 340 g visível no Quadro 5). Fizeram-se grupos de 4 animais por tipo de *scaffold* de idades sensivelmente idênticas e cujos pesos se podem observar no *Quadro 5* para implantar os *scaffolds* no tecido conjuntivo.

Quadro 5 - Peso dos 20 ratos *Wistar* utilizados para estudos *in vivo*.

Caracterização do <i>scaffold</i>	Número do rato	Peso (g)
PCL + HA N (10%) – 300 $\mu\text{m}$ + 45°	Rato 1	220
	Rato 2	210
	Rato 3	230
	Rato 4	190
PCL + HA S (10%) – 600 $\mu\text{m}$ + 90°	Rato 5	170
	Rato 6	220
	Rato 7	230
	Rato 8	200
PCL + HA S (25%) – 600 $\mu\text{m}$ + 45°	Rato 9	220
	Rato 10	340
	Rato 11	220
	Rato 12	200
PCL + HA S (25%) – 300 $\mu\text{m}$ + 45°	Rato 13	170
	Rato 14	230
	Rato 15	240
	Rato 16	260
PCL – 600 $\mu\text{m}$ + 90°	Rato 17	140
	Rato 18	130
	Rato 19	150
	Rato 20	150

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 cetamina (Ketalar® 50 mg, cetamina Pfizer, 8.276.907) e clorpromazina (Largactil® 5 mg/ml, Laboratórios Vitória, 9.977.827) usando uma agulha 25G acoplada a uma seringa de 2,5 ml (Terumos®, 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). Fez-se a tricotomia em zonas específicas do dorso do rato, como é possível observar no esquema da **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**, realizou-se o procedimento cirúrgico dentro de uma câmara de fluxo laminar, tendo esterilizado todas as embalagens de 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). Todo o material cirúrgico<sup>10</sup> utilizado foi sujeito a esterilização (por óxido de etileno ou radiação gama, conforme o fornecedor) para garantir que não ocorresse nenhuma infecção. 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 e animais. No quadrante superior direito colocou-se o *scaffold* selecionado esterilizado por óxido de etileno e no quadrante inferior esquerdo colocou-se o mesmo tipo de *scaffold* esterilizado por plasma. É possível observar de que forma se colocaram os *scaffolds* nos ratos no esquema da *Figura 20*.

---

<sup>10</sup> Para esta mini cirurgia utilizou-se material cirúrgico DIMEDA: cabo de bisturi para lâmina nº22 (STAR FROST, Alemanha), tesoura de disseção, pinça de disseção, pinças de Adson de dente de rato e de preensão, pinça hemostática, porta-agulhas; lâminas de bisturi esterilizadas (KATO, Índia), fios de sutura (seda 4/0, SK23020B4) com agulha lanceolada.





Figura 19 - Tricotomia realizada no dorso do rato, em áreas específicas para posterior implantação subcutânea do *scaffold*.

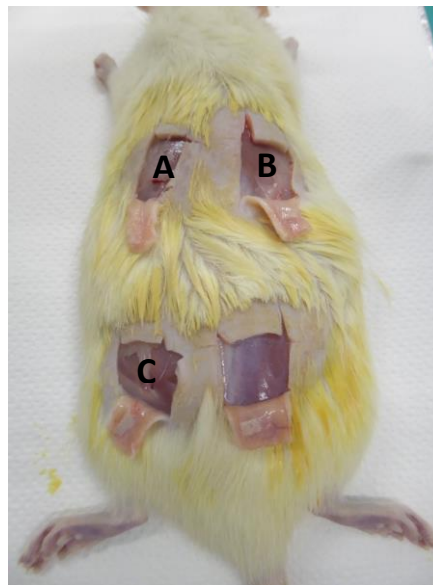


Figura 20 - Esquema de implantação subcutânea dos *scaffolds* no rato realizados nos estudos in vivo: **A)** controlo (apenas se realizou uma bolsa); **B)** *scaffold* esterilizado por óxido de etileno; **C)** *scaffold* esterilizado por plasma (CHUC).

No final desinfetaram-se as áreas suturadas com a solução dérmica de iodo povidona. 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).

Passados 30 dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Cumpriram-se todas as regras do Decreto-Lei nº 113/2014, de 7 de Agosto (proteção e bem estar animal para fins de investigação). 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 [79-81]:

- *Redution* (Redução): utilizar o menor número de animais possível. Foram estudados 4 animais por grupo, em vez dos 10 que como era antes aceite internacionalmente;

- *Replacement* (Substituição): utilizar 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.

- *Refinement* (Refinamento): aperfeiçoar todos os processos envolvidos durante as experiências para que os resultados sejam mais fidedignos e não seja necessário utilizar novamente mais animais [79-82].

Dado o tempo decorrido entre o implante e a recolha dos *scaffolds*, o pelo dos animais cresceu nas áreas previamente tricotomizadas, sendo necessário refazer a tricotomia, nas condições referidas anteriormente. Seguidamente os *scaffolds* foram encontrados através de sensibilidade táctil e, com 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) (Figura ) e colocados em recipientes com formol neutro tamponado a 10% (Sigma, 252549).

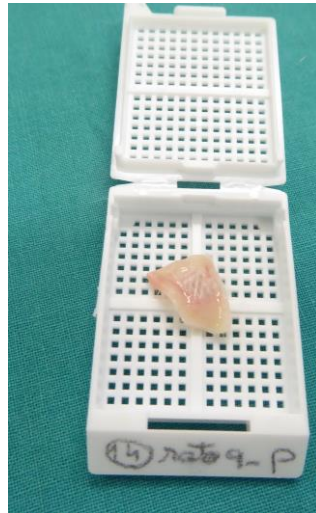


Figura 21 - Cassete de fixação utilizada para os estudos histológicos (PrintMate™ Embedding Cassettes, A84810048).

Dada a estreita colaboração existente com o Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilo-Facial 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 tal 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 [37]. Cada uma das amostras foi fixada pelo menos durante 1 semana e só depois seccionada a meio na vertical (fica metade do *scaffold* em cada parte) e a fixação continua 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  $\mu\text{m}$  de espessura) em *paraplast* (Sigma, P3568). 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. 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). O álcool a 100% tem de ser

substituído por um hidrocarboneto aromático (2 x) (foi usado xilol (Sigma-Aldrich, 534,056) 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 17h até ao dia seguinte. No dia seguinte foi feita a inclusão do material em recipientes rectangulares de inox (Thermo Fisher Scientific, Mini Metal Base Mold, Leica Biosystems) com as dimensões da tampa da cassette de fixação. Coloca-se o *paraplast* no estado líquido, o equipamento tem uma placa arrefecida para solidificar uma “crosta” fina para prender o fragmento de tecido. Os blocos de inclusão são tapados e etiquetados e mantidos a 4°C. Desta forma, as amostras estavam prontas para ser seccionadas com um micrótopo (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) e secas pelo menos 24h) num banho de água termostaticado a 37°C (Tissue-water bath 6951, Newcomersupply). As lâminas com os cortes histológicos foram secas durante 24h 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 dentro de tinas de vidro: 2 com xilol, 2 com álcool a 100%, 2 com álcool a 95%, 1 com álcool a 70%, 1 com água da torneira corrente. As amostras estão prontas para serem coradas. A técnica de coloração efectuada foi a de rotina: hematoxilina-eosina; a hematoxilina (Sigma-Aldrich, MHS1) e um corante básico que cora os núcleos celulares e a eosina (Sigma-Aldrich, HT110280) 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 (*Cover Slip*) colada com uma cola sintética (DPX Mountant for histology, Sigma-Aldrich, 44581). As preparações secam, limpam-se e ficam prontas para ser visualizadas ao microscópio ótico.

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



## CAPÍTULO 4 – Análise de resultados e Conclusões

Tal como referido anteriormente, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar a proliferação celular e citotoxicidade de *scaffolds* compostos por PCL ou HA (10% ou 25%), utilizando vários tipos celulares (macrófagos peritoneais, fibroblastos humanos e células osteogénicas), tendo como finalidade a aplicação em Medicina Dentária, nomeadamente na regeneração de tecido ósseo da mandíbula e/ou do maxilar. Inicialmente, realizaram-se estudo *in vitro*, avaliando-se, posteriormente, o seu comportamento num modelo animal: rato.

Os materiais possuem várias características em termos de composição, geometria e porosidade e, desta forma, quanto maiores forem a adesão e proliferação observadas, melhor é o material, pois apresenta menor citotoxicidade.

A análise estatística foi realizada através do teste de Mann-Whitney, com o objetivo de avaliar as diferenças para os valores de MTT. Os “valores de p” foram obtidos através da utilização do *software* SPSS® *Statistic*, versão 22 (IBM Corporation, Armonk, Nova York, EUA).

### 4.1. Estudos *in vitro*

Os *scaffolds* utilizados nas experiências eram constituídos só por PCL (material com alguma elasticidade) ou por PCL + HA, uma vez que a HA é resistente mas bastante quebradiça. Desta forma testaram-se materiais com 10% e 25% de HA. Foi avaliada a citotoxicidade e a proliferação celular nestes materiais.

O pretendido foi estudar vários tipos de *scaffolds* pois serão implantados no organismo, estando em contacto com diferentes tipos de células/tecidos. *In vitro* trabalhou-se com 3 tipos celulares diferentes para simular o real o melhor possível.

Desta forma, testou-se a citotoxicidade e proliferação celular em monocultura e co-cultura em diferentes tempos: 72 horas, 120 horas, 168 horas e 360 horas, como

já foi explicado anteriormente, de forma a avaliar quais serão melhores características que o material deve possuir.

#### 4.1.1. Estudos estatísticos

Para o estudo estatístico foi selecionado um método não paramétrico, uma vez que usa procedimentos que são aplicáveis independentemente da distribuição da população e também é útil quando a dimensão da amostra é muito pequena e não se conhece a distribuição exata da população.

No casos deste trabalho foi efectuado o teste de Mann-Whitney, uma vez que é apropriado para averiguar se são iguais as medianas  $\mu_X$  e  $\mu_Y$  de duas populações contínuas e independentes, X e Y, respectivamente. As duas amostras envolvidas não têm que ter a mesma dimensão.

As hipóteses em teste são:

$$H_0: \mu_X = \mu_Y;$$

$$H_1: \mu_X \neq \mu_Y.$$

Juntam-se as 2 amostras numa só (amostra combinada, identificando a origem (X ou Y) de cada elemento desta nova amostra. Ordena-se a amostra combinada e observam-se as posições (*ranks*) ocupadas pelos elementos X e pelos elementos Y. Se X e Y ficarem aleatoriamente distribuídos, então a decisão final será favorável a  $H_0$  (pois sob  $H_0$  a mediana da população subjacente na amostra combinada será igual às medianas  $\mu_X$  e  $\mu_Y$ . Caso contrário rejeita-se  $H_0$ . Neste caso, se, por exemplo, as maiores observações estiverem mais frequentemente associadas na amostra X, é possível inferir que  $\mu_X > \mu_Y$ . A partir do programa SPSS geram-se então os *outputs* que permitem a análise estatística (Anexo A). Considerou-se estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$  (Quadro 6).



Quadro 6 - Comparação dos resultados usando Óxido de Etileno e Plasma para a esterilização dos scaffolds.

<b>Comparação entre Óxido de Etileno e Plasma (CHUC + DEQ)<sup>11</sup></b>	<b>valor-p</b>
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	1,000
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,001
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,399
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,089
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,004
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,008
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,006
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,006
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,062
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,433
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,006
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,004
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,838
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,006
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,120
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,399
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,001
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,006
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,705
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,497
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,003
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,140

<sup>11</sup> Verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre plasma CHUC e plasma DEQ – ver Quadro 7.

<b>Comparação entre Óxido de Etileno e Plasma (CHUC + DEQ)</b>	<b>)</b>
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,497
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,021
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,021
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,011
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,001
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,245
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,021
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,734
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,001
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	1,000
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,021
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,021
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,059
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,294
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,497
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,153
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,079
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,040
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,006
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,536
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,005
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,021
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,021
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,610
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,006
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,042

<b>Comparação entre Óxido de Etileno e Plasma (CHUC + DEQ)</b>	
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,013
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,007
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º	0,000
Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,021
Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º	0,724
Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º	0,021
Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º	0,083

Apenas se puderam realizar dois ensaios com as células osteogénicas (osteossarcoma) como já foi referido.

Quadro 7 - Comparação dos resultados usando Plasma CHUC e DEQ para a esterilização dos *scaffolds*.

Valor de $p=0,126$		Média	Erro Padrão da Média	Mediana
Esterilização	Controlo	0,16	0	0,15
	CHUC Plasma	1,47	0,03	1,51
	DEQ Plasma	1,66	0,14	1,94

#### 4.1.2. Resultados obtidos

Neste momento do desenvolvimento deste trabalho é possível apresentar os resultados correspondentes aos ensaios *in vitro* que decorreram durante 72 horas. Não se dispunha de células em número suficiente e de *scaffolds* esterilizados pelos 2 métodos de esterilização selecionados para se completarem os ensaios às 120 horas, 168 horas e 360 horas.

Às 72 horas verifica-se que **p** é estatisticamente muito significativo ( $p < 0,001$ ) quando se usam:

- \* fibroblastos + *scaffolds* com: PCL + HA 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° e PCL + 300  $\mu\text{m}$  + 90°;
- \* macrófagos + *scaffolds* com: PCL + HA N 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° e PCL + HA N 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°;
- \* co-cultura de macrófagos e fibroblastos + *scaffolds* de PCL + 600  $\mu\text{m}$  + 45°.

Com este tempo de estudo (72 horas) há diferenças estatisticamente significativas para (como é possível observar no Anexo B):

\* fibroblastos + *scaffolds* com: PCL + HA S 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA S 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA S 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA S 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 10% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA N 10% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + 600  $\mu\text{m}$  + 45°;

\* macrófagos + *scaffolds* com: PCL + HA S 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA S 10% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA S 10% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA S 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA S 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA N 10% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + 300  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + 300  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + 600  $\mu\text{m}$  + 45°;

\* co-cultura de macrófagos e fibroblastos + *scaffolds* de PCL + HA S 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA S 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA S 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA S 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 10% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA N 10% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + HA N 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 45°; PCL + HA N 25% + 600  $\mu\text{m}$  + 90°; PCL + 300  $\mu\text{m}$  + 90°-

Para os fibroblastos, às 72 h, estas diferenças estatisticamente significativas são sempre  $p < 0,007$ . Quando se usam macrófagos (às 72 h), dentro destes resultados estatisticamente significativos podemos dividir em dois grupos: *scaffolds* em que  $0,011 < p < 0,021$ : PCL + HA S 25%, 600  $\mu\text{m}$ , 45°; PCL + HA S 25%, 600  $\mu\text{m}$ , 90°; PCL + HA N 10%, 600  $\mu\text{m}$ , 90°; PCL + HA N 25%, 600  $\mu\text{m}$ , 90°; PCL, 600  $\mu\text{m}$ , 45°; sendo  $0,003 < p < 0,007$  para os outros *scaffolds* referidos. No caso da co-cultura (macrófagos + fibroblastos) às 72 h, podemos fazer 2 grupos -  $0,042 < p < 0,040$ : PCL + HA S 25%, 600  $\mu\text{m}$ , 45° e PCL + HA N 25%, 600  $\mu\text{m}$ , 90°;  $0,021 < p < 0,013$ : PCL + HA N 10%, 600  $\mu\text{m}$ , 45°; PCL + HA N 10%, 600  $\mu\text{m}$ , 90°; PCL, 600  $\mu\text{m}$ , 90° e PCL, 300  $\mu\text{m}$ , 45°.

Às 168 horas até ao momento, dados os ensaios realizados, pode dizer-se que há diferenças estatisticamente significativas para fibroblastos + *scaffolds* com PCL + HA N 25% + 300  $\mu\text{m}$  + 90°. O trabalho continua a decorrer e obter-se-ão mais resultados para este período de tempo de estudo com fibroblastos, macrófagos e co-cultura dos dois tipos celulares.

Nesta fase do trabalho, pelas razões já explicadas anteriormente, não se dispõe ainda de resultados comparáveis para fibroblastos e células de osteossarcoma. Os macrófagos, que, como já foi referido, são células que não se dividem *in vitro*, têm uma melhor taxa de sobrevivência e desempenho até às 72h. No entanto já foram efectuados alguns ensaios às 120 h para este tipo de células e em co-cultura com fibroblastos, que terão de ser continuados. Verificou-se também, nos ensaios realizados às 168 horas, que os macrófagos conseguem sobreviver mais tempo e em melhores condições de resposta (em relação ao controlo) quando em co-cultura com fibroblastos. Os fibroblastos são células muito ativas e de desenvolvimento rápido e eficaz *in vivo*. *In vitro* estas características de resposta mantêm-se, daí que sintetizem vários factores de crescimento. Quando em co-cultura, os macrófagos beneficiam destes factores de crescimento segregados pelos fibroblastos. As células osteogénicas têm uma velocidade de proliferação muito lenta. Mesmo as células de osteossarcoma têm uma taxa de proliferação muito mais lenta do que outras células tumorais. Para já não falar na velocidade de replicação e crescimento dos osteoblastos, que é mesmo muito baixa. Deste modo, nos dois ensaios com células de osteossarcoma, alongou-se o período de incubação até às 360 horas. Os fibroblastos deverão ter um bom desempenho para este tempo de estudo, quando em co-cultura com células osteogénicas. Já com macrófagos não é de todo indicado fazer co-cultura às 360 h com células osteogénicas ou mesmo com fibroblastos.

Pensar em tri-cultura (incubação dos três tipos celulares em conjunto) será outro desafio. É necessário escolher o tempo adequado ao fim do qual se devem juntar os macrófagos à co-cultura de fibroblastos e células osteogénicas. De facto, o que acontece *in vivo* é que primeiro chegam/são chamados, ao local onde se encontra o corpo estranho/agressão, os macrófagos, depois entram em ação os fibroblastos para recobrir a zona/superfície. Na presença de uma partícula de grandes dimensões, pode mesmo formar-se uma cápsula de tecido conjuntivo à volta deste material. Neste caso pretende-se que os *scaffolds* sejam povoados por osteoblastos que existem na zona de implantação e que estão ativados pela agressão às estruturas. Se os *scaffolds* tiverem propriedades osteogénicas adequadas permitirão a adesão e desenvolvimento dos osteoblastos em consonância com o desenvolvimento dos fibroblastos, sem

ocorrer reação significativa com os macrófagos. De notar que na cavidade oral as estruturas ósseas normais se encontram recobertas por uma mucosa (tecido conjuntivo), o que justifica plenamente a utilização de fibroblastos neste trabalho.

Pretende-se conseguir seleccionar o(s) tipo(s) de *scaffolds* com características mais favoráveis à adesão e proliferação celular de osteoblastos, envolvidos por fibroblastos e que não induzam reação inadequada com os macrófagos. Além disso este(s) *scaffold(s)* deve(m) ter um tempo de permanência no organismo humano consistente uma boa redistribuição celular, que leve à formação/regeneração de uma nova estrutura tipo *self* (do próprio organismo). Esta estrutura terá, assim, a resistência capaz de desempenhar as funções normais do osso, permitindo a realização de procedimentos de Medicina Dentária (por exemplo, conseguir produzir um bom leito para efetuar um implante dentário).

## 4.2. Estudos *in vivo*

Para avaliar os materiais *in vivo*, implantaram-se no tecido subcutâneo alguns dos *scaffolds* testados anteriormente *in vitro* com os melhores e os piores resultados. Tal como mencionado anteriormente, utilizaram-se 20 ratos *Wistar*, organizados em 5 grupos (isto é, 5 tipos de *scaffolds*), tendo cada grupo 4 animais. Em cada rato testou-se 1 tipo de *scaffold* esterilizado por óxido de etileno e plasma, sendo cada animal o seu próprio controlo (apenas criação da bolsa – descolamento de estruturas e respetiva resposta normal de cicatrização). A análise histológica foi realizada 30 dias após a implantação do material.

Devido às características e tipos de reagentes utilizados no processamento das amostras verificou-se a desintegração/desaparecimento de praticamente todos os *scaffolds* (PCL > HA 25% > HA 10%) nos cortes histológicos. No entanto, é bem visível o espaço que ocuparam *in vivo*.

#### 4.2.1. Análise histológica da zona controle

Ao fim de 30 dias, após a nova tricotomia, macroscopicamente não se observou a existência de cicatriz nos locais da incisão, na face externa da pele do dorso. Na face interna do retalho de pele no local A (controle) (Figura 2) apenas se observava uma ligeira opacificação da serosa. No entanto, à lupa ótica e ao microscópio ótico observa-se uma ligeira faixa de fibrose e muito pouco infiltrado inflamatório, como é possível observar na Figura. Verificou-se que os resultados para todas as zonas de controle são idênticas em todos os animais.

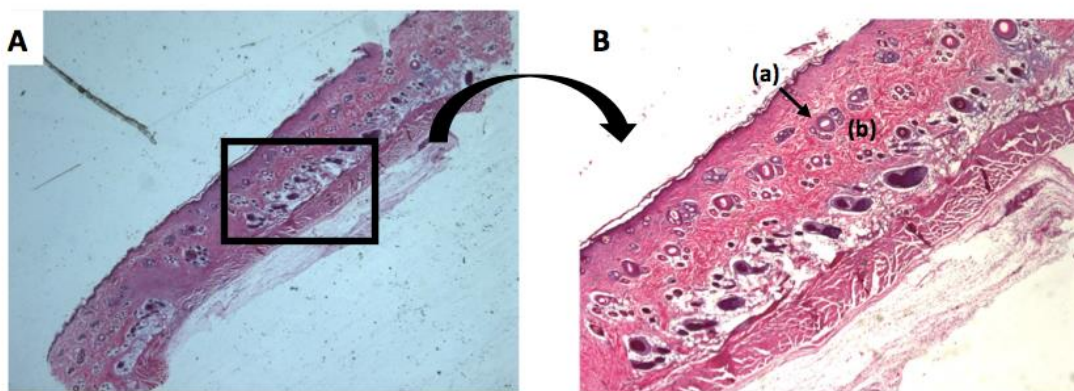


Figura 22 - Zona A = corte histológico da zona de controle: **A** - imagem obtida com lupa ótica com ampliação 5,5 x, onde é possível observar a presença de infiltrado inflamatório no local da incisão; **B** - imagem obtida com microscópio ótico com ampliação 2x, podendo observar-se mais detalhadamente uma faixa fina de fibrose e pouco infiltrado inflamatório. Observam-se, neste corte, folículos pilosos (a) e fibras de colagénio normais (b).

#### 4.2.2. Análise histológica do *scaffold* PCL + HA N (10%) – 300 $\mu$ m + 45° (7)

Quando se utilizou o tipo de *scaffold* PCL + HA N (10%) – 300  $\mu$ m + 45°, quer esterilizado por óxido de etileno quer por plasma, observaram-se alterações em relação ao normal (controle, zona A). Todos os ratos do mesmo grupo apresentavam resultados semelhantes.

Para o material esterilizado por plasma observou-se uma maior distorção do mesmo, com desagregação da estrutura, observando-se bastantes vasos sanguíneos indicadores de uma inflamação.



#### 4.2.2.1. Óxido de Etileno

Observou-se que a esterilização por óxido de etileno originava uma deformação das fibras colagénicas, levando a uma alteração da posição das células vizinhas, como é possível observar na Figura .

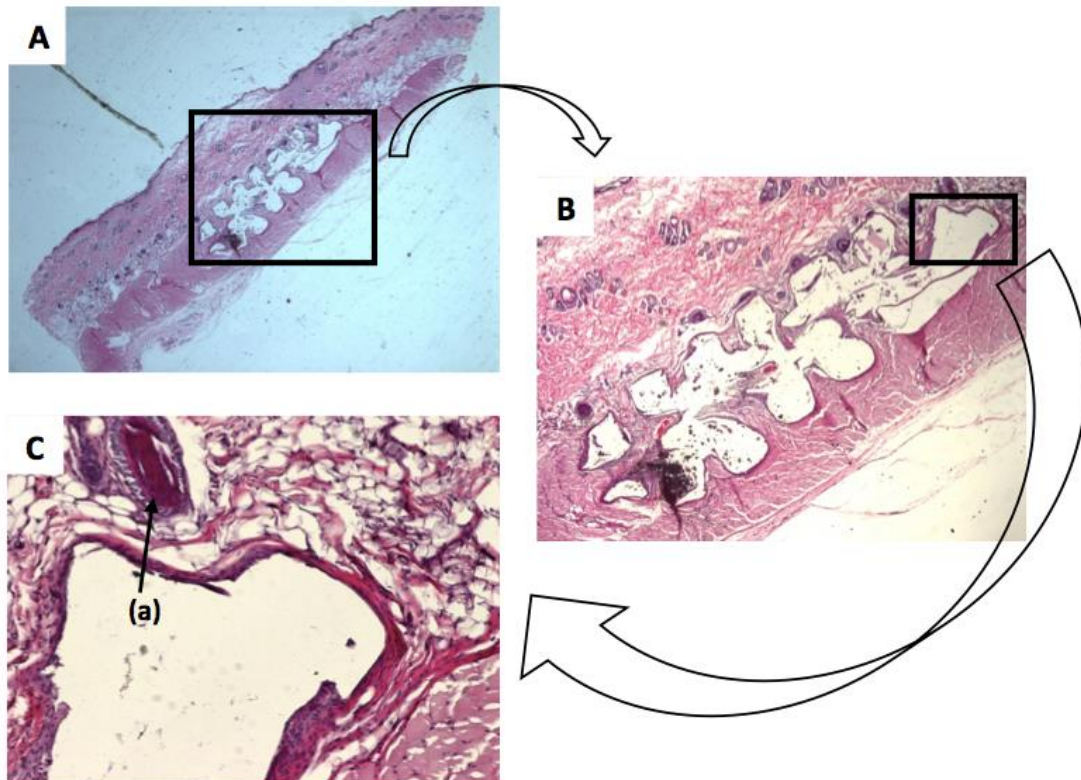


Figura 23 - Exemplo de animal com implantação do *scaffold* constituído por PCL + HA N (10%) - 300  $\mu$ m + 45° (rato 1): **A**) imagem de lupa ótica (ampliação 5,5x) podendo observar-se a presença do *scaffold* um pouco distorcido; **B**) imagem ao microscópiótico com ampliação 2x vendo-se mais em detalhe o espaço ocupado pelo *scaffold*, assim como a distribuição da fibrose originada. As fibras encontram-se mais desorientadas do que no grupo controlo; **C**) imagem ao microscópio ótico com ampliação 10x onde se podem observar com mais detalhe os pormenores do tecido envolvente do *scaffold*, em que se vê o desenvolvimento de um folículo piloso (a).

#### 4.2.2.2. Plasma

Observou-se que a esterilização por plasma originava uma maior deformação das fibras colagénicas, levando a uma maior alteração das estruturas vizinhas, bem como mais infiltrado inflamatório, como é possível observar na Figura .

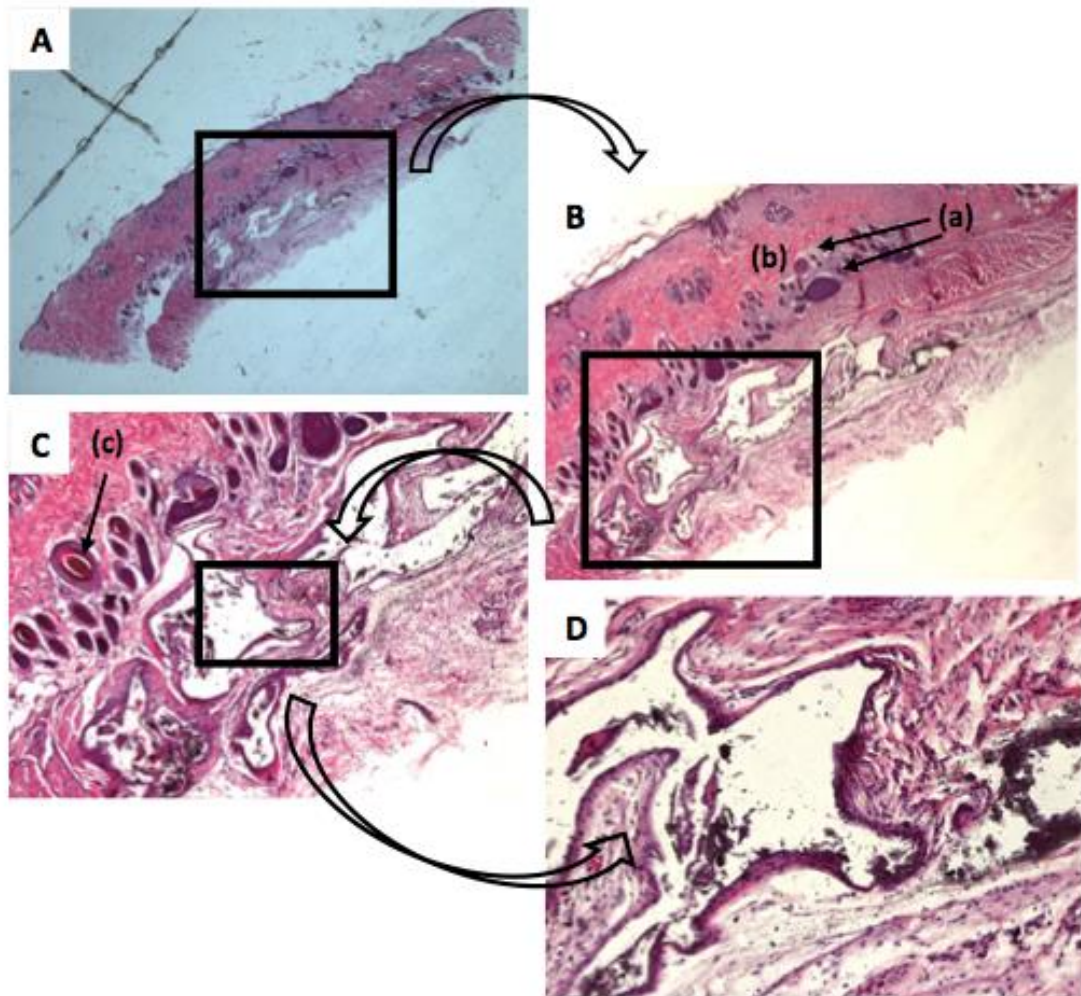


Figura 24- *Scaffold* constituído por PCL + HA N (10%) + 300  $\mu$ m + 45° (Rato 1) : **A**) imagem de lupa óptica (ampliação 5,5x) podendo observar-se o espaço histológico devido à presença do *scaffold*,; **B**) imagem microscópica com ampliação 2x que permite observar mais detalhadamente o espaço antes ocupado pelo *scaffold*, assim como todo o arranjo de fibrose que se encontra mais desorientado (fibras de colagénio em **(b)**) do que o grupo controlo. Também se observam glândulas subcutâneas fibras de colagénio em **(b)** ; **C**) imagem microscópica com ampliação 4x onde se conseguem observar com mais pormenor os detalhes do tecido envolvente do *scaffold*, como por exemplo a presença de um neovaso sanguíneo em **(c)**, do que se depreende que houve mais reação inflamatória e tentativa de remodelação: **D**) imagem de microscópio ótico com ampliação 10x do local de implantação do *scaffold*.

#### 4.2.3. Análise histológica do *scaffold* PCL + HA S (10%) – 600 $\mu$ m + 90° (9)

Analisando este tipo de material, concluiu-se que desencadeia uma resposta inflamatória mais acentuada que o anterior. Comparando os dois tipos de esterilização, observa-se um pior desempenho do material esterilizado por plasma.

#### 4.2.3.1. Óxido de Etileno

Analisando este tipo de *scaffold* esterilizado por óxido de etileno, observou-se um arranjo de fibrose desorientado relativamente ao grupo controlo (Figura 25).

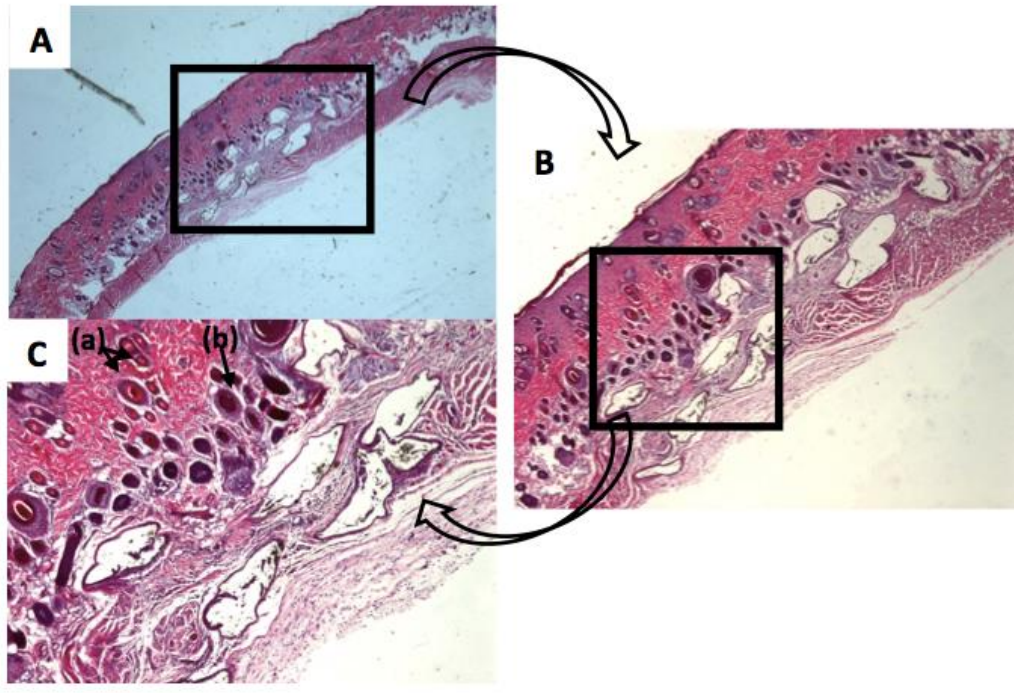


Figura 16 - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (10%) – 600  $\mu$ m + 90° (Rato 5): **A**) imagem de lupa ótica (ampliação 5,5x) onde é possível observar a zona previamente ocupada pelo *scaffold*, este estava bastante distorcido; **B**) imagem microscópica com ampliação 2x :pode observar-se mais detalhadamente este espaço, assim como todo o arranjo de fibrose que se encontra mais desorientado do que o grupo controlo; **C**) imagem microscópica com ampliação 4x onde se consegue observar melhor os detalhes do tecido envolvente do *scaffold*, como por exemplo a presença de neovasos sanguíneos em (a) e pêlos em (b).

#### 4.2.3.2. Plasma

Quando esses *scaffolds* são esterilizados por plasma, observou-se uma maior desorientação das fibras com muitos vasos sanguíneos relativamente aos *scaffolds* esterilizados por óxido de etileno (Figura 26).

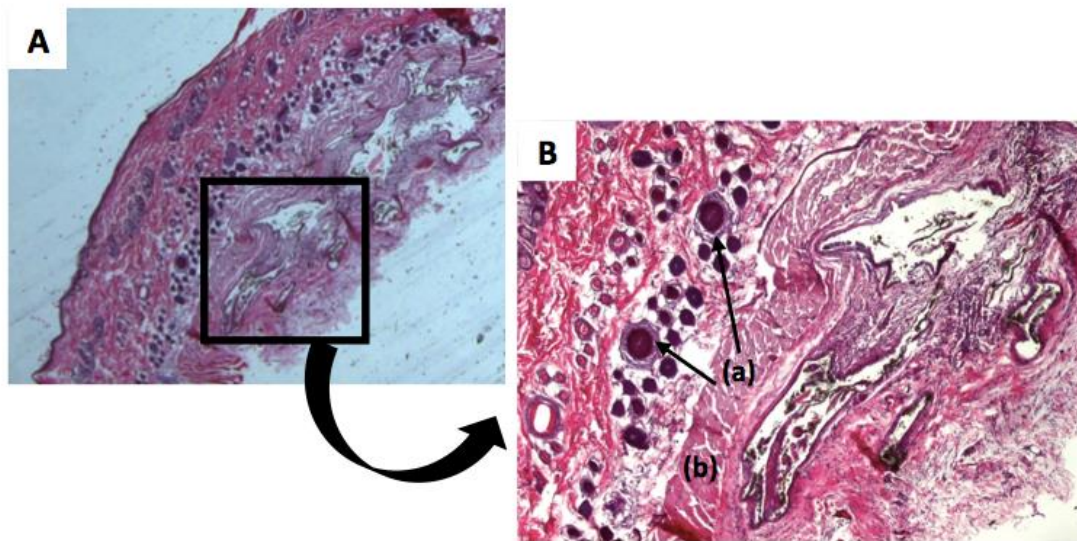


Figura 17 - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (10%) – 600  $\mu$ m + 90°(Rato 5): **A**) imagem de lupa ótica (5,5 x) onde é possível observar a presença do espaço ocupado pelo *scaffold*, estando este bastante distorcido; **B**) imagem microscópica com ampliação 4x onde é possível observar mais detalhadamente o espaço correspondente ao *scaffold*; vêem-se muitos vasos sanguíneos em (a). Em (b) observam-se fibras de colagénio.

#### 4.2.4. Análise histológica do *scaffold* PCL + HA S (25%) – 600 $\mu$ m + 45° (14)

Mais uma vez o óxido de etileno teve um melhor desempenho, uma vez que houve melhor cicatrização. No caso do material esterilizado por plasma, observou-se um deslocamento do mesmo para uma zona mais profunda, com possíveis partículas de HA que não desapareceram devido à sua rigidez e já que não se procedeu a nenhuma descalcificação.

##### 4.2.4.1. Óxido de Etileno

Mais uma vez comprava-se que este tipo de *scaffold* altera o arranjo celular (Figura 27).

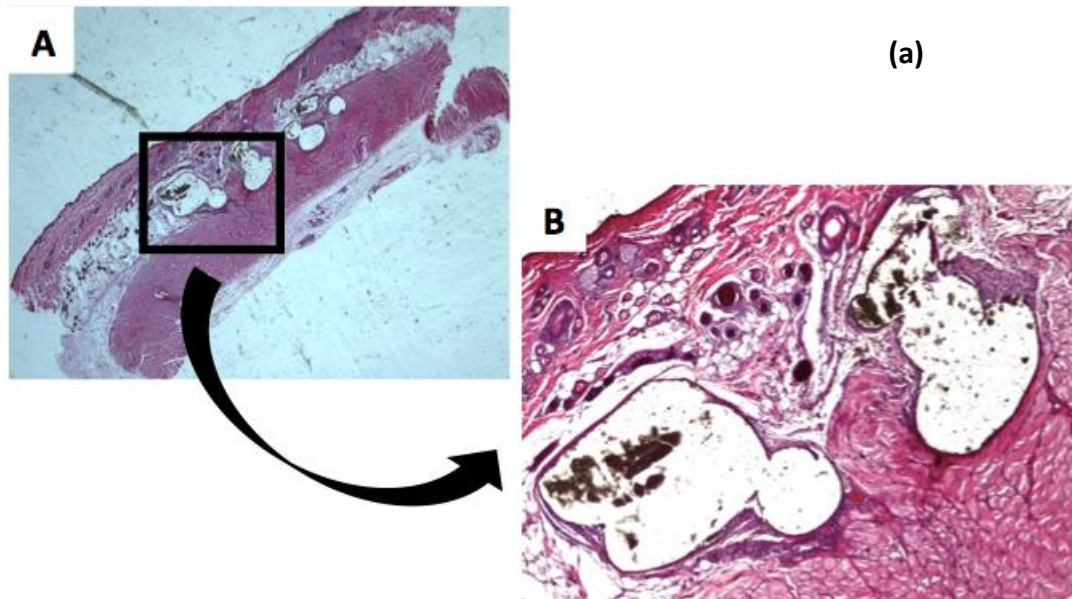


Figura 18 - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (25%) – 600  $\mu$ m + 45° (Rato 12 ): **A)** imagem de lupa ótica (5,5x) observando-se a presença do espaço antes ocupado pelo *scaffold*, estando este bastante intacto; **B)** imagem de microscópio ótico com ampliação 4x onde é possível observar mais detalhadamente este espaço e a reorganização tecidual. Em **(a)** observam-se fibras de colagénio que acompanham a ondulação das fibras do *scaffold*).

#### 4.2.4.2. Plasma

Com este tipo de *scaffold* observa-se de forma mais pormenorizada toda a desorientação das fibras (Figura 28).

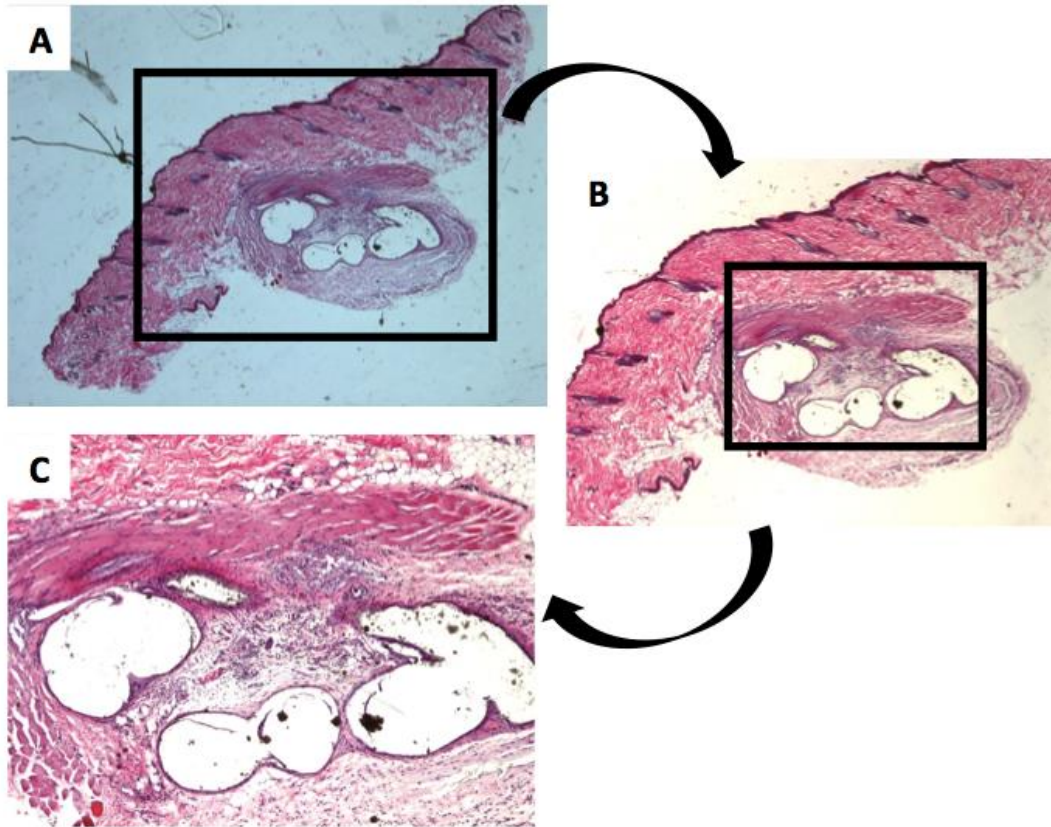


Figura 19 - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (25%) – 600  $\mu$ m + 45° (Rato 12 ): **A**) Imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível observar a presença correspondente ao espaço do *scaffold*, estando este rodado e deslocado para um plano mais profundo; **B**) imagem microscópica com ampliação 2x onde é possível observar mais detalhadamente esta zona; **C**) imagem microscópica com ampliação 4x onde se observa o espaço correspondente ao *scaffold* distorcido. Provavelmente os restos de material que se observam dentro destes espaços correspondem a HA, uma vez que esta é mais dura e não se descalcificou a amostra.

#### 4.2.5. Análise histológica do *scaffold* PCL + HA S (25%) – 300 $\mu$ m + 45° (16)

Com este tipo de material não houve grande diferença entre os 2 tipos de esterilização. Ambas apresentam, obviamente, fibrose e as fibras acompanham o ondular da estrutura do *scaffold*, observam-se alguns neovasos sanguíneos. Há uma boa readaptação das fibras musculares sob o *scaffold*.

#### 4.2.5.1. Óxido de Etileno

É possível observar uma fibrose ondulante que rodeia o local de implantação do *scaffold* (Figura 29).

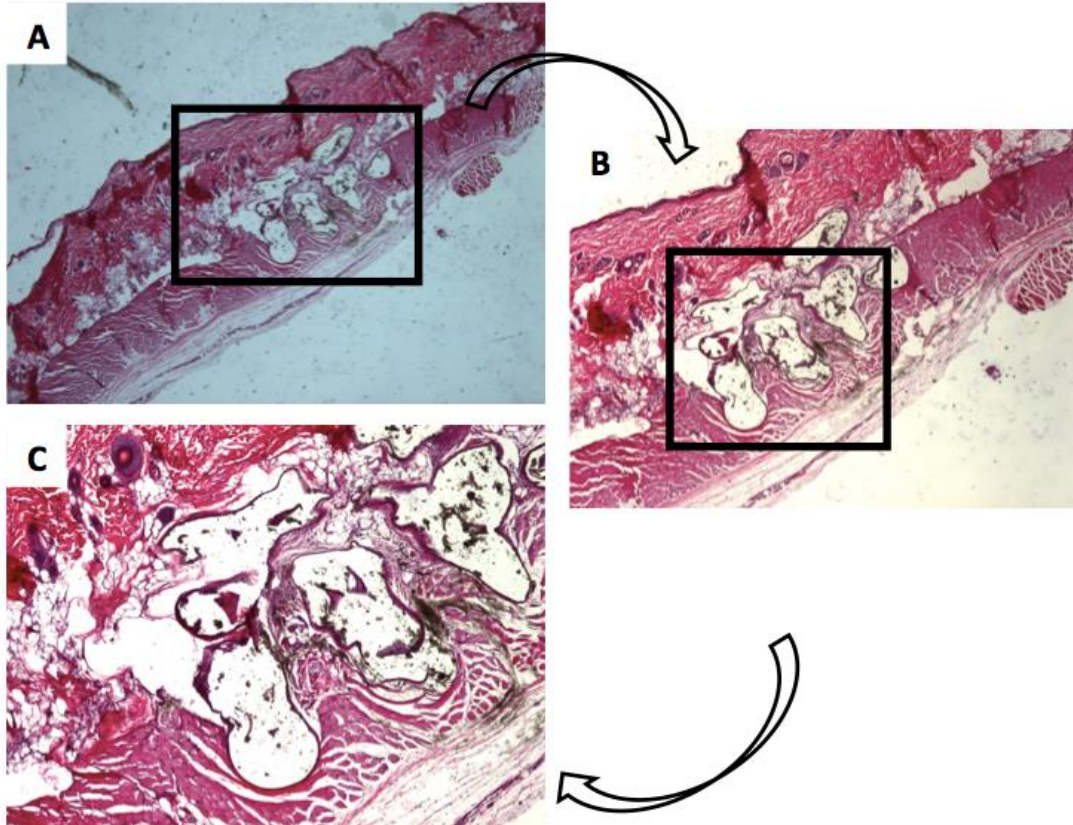


Figura 20 - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (25%) – 300  $\mu$ m + 45° (Rato 14 ): **A**) imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível observar o espaço correspondente à presença do *scaffold*. Este encontra-se entre o tecido celular subcutâneo e as fibras musculares subjacentes; **B**) imagem microscópica com ampliação 4x onde é possível observar a fibrose ondulante que rodeia o local de implantação do *scaffold*; **C**) imagem microscópica com ampliação 4x onde se observa distorção induzida pela presença do *scaffold* com presença de muita fibrose.

#### 4.2.5.2. Plasma

Novamente, é possível observar bastante fibrose quando o *scaffold* é esterilizado por plasma (Figura 30).

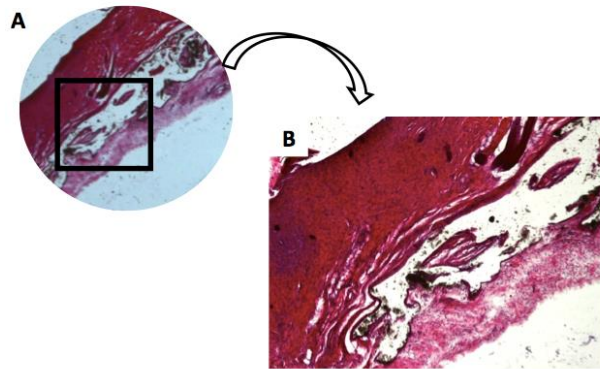


Figura 21 - *Scaffold* constituído por PCL + HA S (25%) – 300  $\mu\text{m}$  + 45° (Rato 14 ): **A**) Imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível observar o espaço devido à presença do *scaffold*. Nota-se que as camadas da derme acima do *scaffold* estão com uma coloração mais forte e menos detalhe; **B**) imagem microscópica com ampliação 4x onde se observa que esta coloração mais densa é devida a uma maior espessura do corte, já que o *scaffold* tem 25% de HA. Existe bastante fibrose.

#### 4.2.6. Análise histológica do *scaffold* PCL – 600 $\mu\text{m}$ + 90° (17)

A esterilização por plasma proporcionou um melhor desempenho, no que diz respeito à cicatrização, deste tipo de *scaffold*, uma vez se desintegrou mais facilmente, pelo que não é possível observar restos da sua presença na Figura 22. As células do tecido celular subcutâneo do rato aderiram muito facilmente à PCL, no entanto, como não há a presença de HA, não é indicado para regeneração óssea.



#### 4.2.6.1. Óxido de Etileno

Observa-se que este *scaffold* esterilizado por óxido de etileno apresenta-se bastante intacto sem desorientação de fibras relevante (Figura 31).

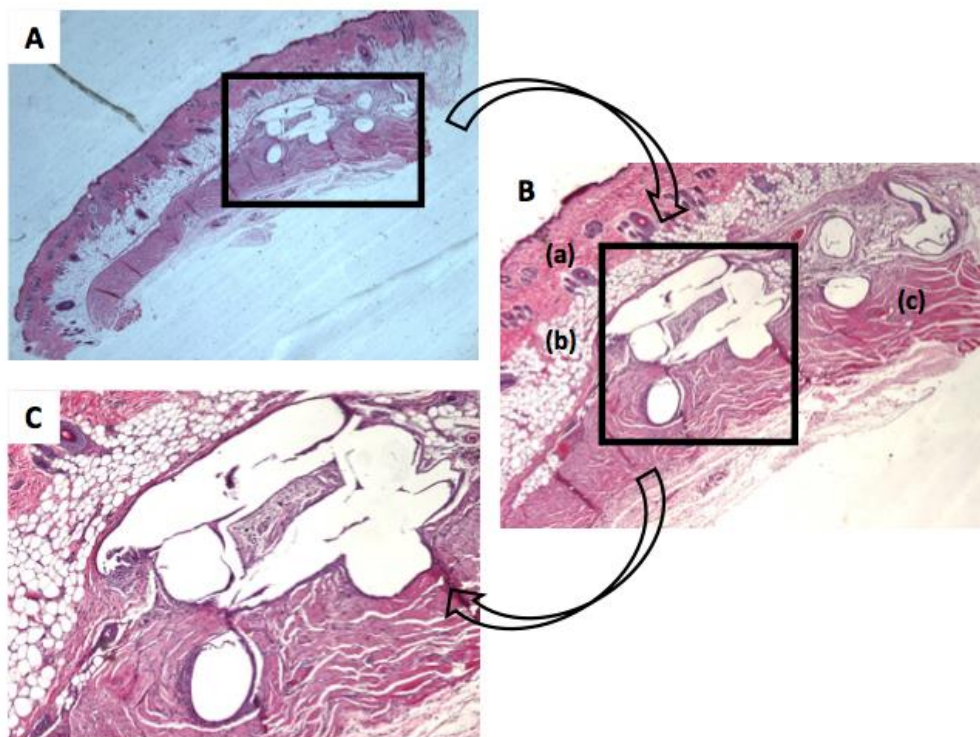


Figura 22 - *Scaffold* constituído por PCL – 600  $\mu\text{m}$  + 90° (Rato 18 ): **A**) imagem de lupa ótica (5,5x) onde é possível uma grande adesão celular e recuperação da estrutura mais normal à volta do espaço ocupado pelo *scaffold* que até enrolou um pouco); **B**) imagem microscópica com ampliação 2x onde se consegue observar a estrutura tecidual renovada com um aspeto muito semelhante ao tecido normal: (a) pode ver-se a derme, (b) o tecido celular subcutâneo e (c) fibras musculares; **C**) *scaffold* levou a uma boa recuperação da estrutura e as fibras musculares adaptaram-se melhor à face inferior do material.

#### 4.2.6.2. Plasma

Observou-se uma zona muito intacta do *scaffold* esterilizado por plasma relativamente aos outros mencionados (Figura 32).

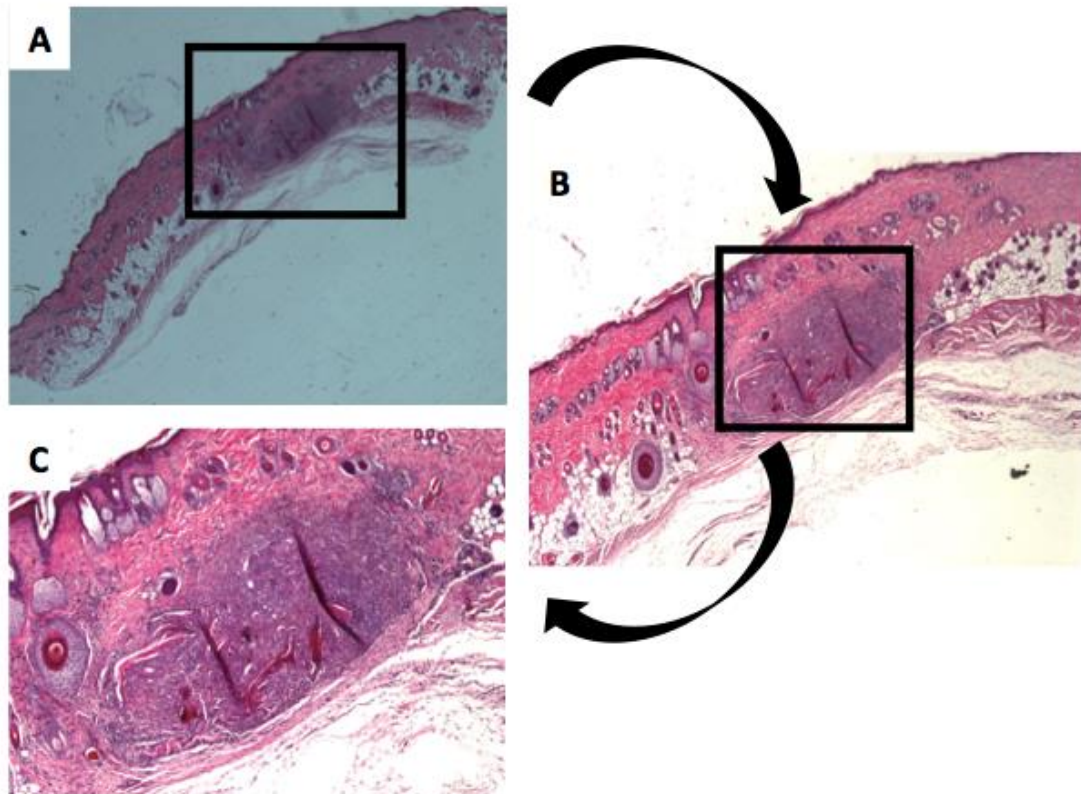


Figura 23 - *Scaffold* constituído por PCL – 600  $\mu\text{m}$  + 90° (Rato 18 ): **A)** imagem de lupa ótica (5,5x) onde não se observa presença de espaço devido ao *scaffold*; **B)** imagem microscópica com ampliação 2x onde se consegue observar uma estrutura bastante intacta, apesar de se ter inserido o *scaffold* nesta zona; **C)** imagem microscópica com ampliação 4x.

### 4.3. Conclusões e perspetivas futuras

O objetivo deste trabalho foi avaliar a proliferação e citotoxicidade celular de biomateriais esterilizados por óxido de etileno ou plasma, compostos por HA (natural ou sintética) com diferentes percentagens (10% e 25%) e PCL, ou 100% PCL. A

finalidade foi criar biomateriais com diferentes características a nível da porosidade e geometria para aplicação em Medicina Dentária, nomeadamente na regeneração de tecido ósseo da mandíbula e/ou do maxilar.

Testaram-se vários tipos celulares: macrófagos, fibroblastos e células osteogénicas, podendo concluir-se que *in vitro*:

- os *scaffolds* de PCL + HA 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° e PCL + 300  $\mu\text{m}$  + 90° apresentam características favoráveis ao crescimento de fibroblastos;
- os *scaffolds* de PCL + HA N 10% + 300  $\mu\text{m}$  + 90° e PCL + HA N 25% +300  $\mu\text{m}$  + 90° apresentam características favoráveis ao crescimento de macrófagos;
- os *scaffolds* de PCL + 600  $\mu\text{m}$  + 45° apresentam características favoráveis ao crescimento de fibroblastos e macrófagos em co-cultura.

Para além disso, realizaram-se experiências *in vivo* com alguns dos materiais anteriormente testados, o que permitiu observar histologicamente o seu comportamento através da implantação subcutânea do *scaffold*. Assim, conseguiu-se simular a gengiva, uma vez que é constituída essencialmente por tecido conjuntivo, concluindo que os *scaffolds* constituídos apenas por PCL apresentam características mais favoráveis à cicatrização, uma vez que se desintegraram facilmente no tecido conjuntivo e permitem uma melhor re-estruturação tecidual, seguindo-se PCL+HA 25% e PCL+ HA a 10%. Para além disso, observou-se que o *scaffold* esterilizado por plasma desencadeia um maior infiltrado inflamatório, assim como uma fibrose mais evidente relativamente à esterilização por óxido de etileno.

Tal como mencionado ao longo deste trabalho, os osteoblastos são extremamente difíceis de obter e de cultivar, o que torna a prática laboratorial muito complexa. Dessa forma, optou-se por utilizar células de osteossarcoma, uma vez que existem sob a forma de linha celular cultivável e crescem mais rápido, mantendo as características de células osteogénicas.

Desta forma, pretendem realizar-se futuramente experiências *in vitro* que envolvam co-cultura entre células osteogénicas com macrófagos ou fibroblastos e ainda tri-cultura. Será possível testar estes materiais esterilizados pelos 2 métodos em ensaios às 120 horas, 168 horas e 360 horas, com as devidas adaptações. Testando todos os materiais descritos neste trabalho, será possível obter dados mais aproximados ao real que permitam prosseguir para estudos *in vivo* e desta vez já com implantação no tecido ósseo, no modelo animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Karp JM, Langer R., Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* (2007) 18(5), 454–459.
- [2] Langer R, Tirrell DA., Designing materials for biology and medicine. *Nature* (2004) 428(6982), 487–492. doi: 10.1038/nature02388).
- [3] Huebsch N, Mooney David J., Review Article Inspiration and application in the evolution of biomaterials, *Nature* (2009) 462, 426-432.
- [4] Vepari C, Kaplan David L., Silk as a Biomaterial, *Prog Polym Sci* (2007) 32(8-9), 991-1007.
- [5] Chan B. P., Leong K.W., Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, Published online (2008 Nov 13), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2587658/>, consultado em Agosto de 2016.
- [6] Pereira S, Santos A.C., Figueiredo M., “Assessment of cellular adhesion, proliferation and differentiation in scaffolds & In vitro and in vivo cytotoxicity of an “improved” endodontic sealer”, Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra (2015).
- [7] Kim K.M., Evans G.R.D., Tissue Engineering: The Future of Stem Cells, *Topics in Tissue Engineering* (2005). [http://www oulu.fi/spareparts/ebook\\_topics\\_in\\_t\\_e\\_vol2/abstracts/evans\\_0102.pdf](http://www oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol2/abstracts/evans_0102.pdf), consultado em Agosto de 2016.
- [8] Guariuno V., Causa F., Netti P.A., Ciapetti G., Pagani S., Martini D., Baldini N., Ambrosio L., The role of Hydroxyapatite as Solid on Performance of PCL Porous Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2007) 86(2), 548-557.
- [9] O'Brien Fergal J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materialstoday* (2011) 14(3), 88-95.
- [10] Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A., Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* (2012) 30 (10), 546-554.
- [11] <http://orzo.union.edu/~khetans/Teaching/BNG331/L2%20Classes%20of%20Biomaterials.pdf> [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [12] Kara S., A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones (2012), <http://www.intechopen.com/books/a-roadmap-of-biomedical-engineers-and-milestones>, consultado em Agosto de 2016.
- [13] Hermawan H., Ramdan D., Djuansjah Joy R.P., Metals for Biomedical Applications, *Biomedical Engineering – From Theory Applications* (2011), <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-from-theory-to-applications/metals-for-biomedical-applications>, consultado em Agosto de 2016.
- [14] Sionkowska, Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new materials: Review. *Progress in Polymer Science* (2011) 36(9), 1254-1276.
- [15] Ulery Bret D, Nair Lakshmi S, Laurenci Cato T., Biomedical Applications of Biodegradable Polymers, *Journal of Polymer Science part B: Polymer Physics* (2011) 49, 832-864.
- [16] AZoM, Czernuszka J., Biomaterials – an Overview, *Materials World – Biomaterials under the microscope* (1996) 4, 452-53.
- [17] <http://www.nature.com/subjects/macrophages%20///> [Online], consultado em Agosto de 2016.

- [18] Mosser M., Edwards Justin P., Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nature Review* (2008) 8(12), 958-969.
- [19] Epelman S., Lavine Kory J., Randolph G., Origin and Functions of Tissue Macrophages (2014) 41(1), 21-35.
- [20] Parihar A., Eubank Timothy D., Doseff Andrea I., Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death, *J Innat Immun* (2010) 2(3), 204-215.
- [21] Alberts B., Johnson A, Lewis J., Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family. *Molecular Biology of the Cell Family, Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> edition (2002).
- [22] Sadlonova A., Novak Z., Johnson Martin R., Bowe Damon B., Gault Sandra R., Page Grier P., Thottassery Jaideep V., Welch Danny R., Frost Andra R., Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture, *Breast Cancer Research* (2004) 7, 46-59.
- [23] Darby IA, Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A., Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing, *Clin Cosmet Investig Dermatol* (2014) 7, 301-311.
- [24] Olçum M., Baskan Ö., Karadas Ö., Özçivici E., Application of low intensity mechanical vibrations for bone tissue maintenance and regeneration, *Turkish Journal of Biology* (2016) 40, 300-307.
- [25] Cai X., Luo E., Yuan Q., Interaction between Schwann Cells and Osteoblasts In Vitro, *Int J Oral Sci* (2010) 2, 74-81.
- [26] Meikle Murray C., Bord S., Hembry Rosalind M., Compston J., Croucher Peter I., Reynolds John J., Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines, *Journal of Cell Science* (1992) 103, 1093-1099.
- [27] Mueller Stefan M., Mizuno S., Gerstenfeld Louis C., Glowacki J., Medium Perfusion Enhances Osteogenesis by Murine Osteosarcoma Cells in Three-Dimensional Collagen Sponges, *Journal of Bone and Mineral Research* (1999) 14(12), 2118-2126.
- [28] Judas F., Palma P., Falacho R., Figueiredo H., Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo, Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de Ortopedia - Clínica Universitária de Ortopedia dos HUC-CHUC (2012) <http://rihuc.huc.min-saude.pt/bitstream/10400.4/1346/1/TECIDO%20%C3%93SSEO%20.pdf>, consultado em Agosto de 2016.
- [29] Lemaire T., Pham T.T., Capiez-Lernout E., Leeuw N.H., Naili S., Water in hydroxyapatite nanopores: Possible implications for interstitial bone fluid flow, *Journal of biomechanics* (2015), 48, 3066-3071.
- [30] Picci P., Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma), *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2007) 2, 2-6.
- [31] Kundu Z., Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma, *Indian J Orthop* (2014) 48(3), 238-246.
- [32] Jiand H., Zeng Z., Dual mTORC1/2 inhibition by INK-128 results in antitumor activity in preclinical models of osteosarcoma, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2015) 1, 1-7.
- [33] [https://www.google.pt/search?q=osteosarcoma&biw=913&bih=431&source=lnms&tbn=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwia8Kz81\\_\\_OAhXGNhoKHaN6BpcQ\\_AUIBigB#imgrc=-9A3KmoHsLcXSM%3A](https://www.google.pt/search?q=osteosarcoma&biw=913&bih=431&source=lnms&tbn=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwia8Kz81__OAhXGNhoKHaN6BpcQ_AUIBigB#imgrc=-9A3KmoHsLcXSM%3A) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [34] Carlos M., Anatomia do Dente (2014), 7, <https://www.passeidireto.com/arquivo/1590240/anatomia-do-dente---carlos-madeira---5ed>, consultado em Agosto de 2016.
- [35] [http://www.hs-menezes.com.br/anatomia\\_6.html](http://www.hs-menezes.com.br/anatomia_6.html) [Online], consultado em Agosto de 2016.

- [36] <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgEgEAC/composicao-quimica-dente> [Online], consultado em Junho de 2016.
- [37] Survana S., Layton Christopher L., Bancroft John D., "Bancroft's Theory and practice of histological techniques" (2013), seventh edition, Churchill Livingstone.
- [38] <http://www.2ndchance.info/Salmonella-Rao2008.pdf> [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [39] <http://www.enfermagemnovidade.com.br/2014/07/esterilizacao-de-materiais-hospitalares.html> [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [40] [https://archive.org/stream/laboratorymanual00hunt/laboratorymanual00hunt\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/laboratorymanual00hunt/laboratorymanual00hunt_djvu.txt) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [41] Van Natta F., Hill J., Carruthers W., Polymerization and ring formation, -caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc* (1934) 56, 455–459.
- [42] Xie H. , Wang Z., Zhang L., Lei Q., Zhao A. , Wang H. , Li Q. , Chen Z., Zhang W., Development of an angiogenesis-promoting microvesicle-alginate-polycaprolactone composite graft for bone tissue engineering applications, *Peer J* (2016) 5,20-40
- [43] Choi E., Kim C., and Park J., Synthesis and Characterization of Starch-g-Polycaprolactone Copolymer, *Macromolecules* (1999) 32, 7402-7408.
- [44] Chandra R., Rustgi R., Biodegradable polymers. *Progr Polym Sci* (1998) 23, 1273–335.
- [45] Patrício T., Domingos M., Gloria A., Bártolo P., Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering, *Procedia CIRP* 5 (2013), 10 - 114.
- [46] Okada M., "Chemical syntheses of biodegradable polymers". *Progress in Polymer Science* (2002) 27, 87-133.
- [47] Wutticharoenmongkol P., Sanchavanakit N., Pavasant P., Pitt S., Preparation and Characterization of Novel Bone Scaffolds Based on Electrospun Polycaprolactone Fibers Filled with Nanoparticles, *Macromol Biosci* (2006) 6, 70-77.
- [48] Azimi B., Nourpanah P., Rabiee M., Arbab S., Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Fiber: An Overview, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* (2014) 9(3), 74-90.
- [49] Gagnon P., Frost R., Tunón P., Ogawa T., CHT™ Ceramic Hydroxyapatite – A New Dimension in Chromatography of Biological Molecules, *Chromatography* (2009), 1-4.
- [50] Assis C., Vercik L., Santos M., Fook M., Guastaldi A. C., Comparison of Crystallinity between Natural Hydroxyapatite and Synthetic cp-Ti/HA Coatings. *Materials Research*, (2005) 8(2), 207-211.
- [51] Calandrelli L., Immirzi B., Malinconico M., Natural and Synthetic Hydroxyapatite Filled PCL: Mechanical Properties and Biocompatibility Analysis. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* (2004) 19(4), 301-313.
- [52] Arsad Maisara S., Lee Pat M., Hung Lee K., Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles and  $\beta$ -TCP Particles, *IPCBE* (2011) 7, 184-188.
- [53] Figueiredo M., Fernando A., Martins G., Freitas J., Judas F., Figueiredo H., Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International* (2010) 36(8), 2383-2393.
- [54] Berhardt Leon V. Editor, "Advances in Medicine and Biology", New Science Publisher, Inc (2012) V 41, 70-105.

- [55] Borges F., Santos A. C. (“Criação de um banco de macrófagos peritoneais de rato e ratinho”, Análises Clínicas e Saúde Pública - Instituto Piaget. Trabalho de conclusão de licenciatura, Universidade de Coimbra.
- [56] Matos C., Santos A. C., “Estudos de citotoxicidade num modelo de edema pulmonar agudo & Criação de criobanco de macrófagos e fibroblastos de rato e ratinho”. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade de Coimbra (2011).
- [57] [https://ciencias.ulisboa.pt/sites/default/files/fcul/LeiPort\\_2013.pdf](https://ciencias.ulisboa.pt/sites/default/files/fcul/LeiPort_2013.pdf) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [58] Weir M., “Cellular Immunology”, Handbook of experimental immunology in three volumes, Blackwell Scientific Publications, second edition, volume 2, cap. 24.
- [59] [http://www.nature.com/subjects/macrophages?WT.ac=search\\_subjects\\_macrophages](http://www.nature.com/subjects/macrophages?WT.ac=search_subjects_macrophages) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [60] Vendramini A., Melo R. F., Marcantonio R. A. C., Carlos I. Z., Biocompatibility of a cellular dermal matrix graft evaluated in culture of murine macrophages. *Journal of Applied Oral Science*, (2006) 14(2), 67-70.
- [61] <http://www.ebah.pt/content/ABAAAEzrAAC/tecnica-camara-neubauer> [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [62] <http://pt.slideshare.net/EvaneideFerreira/camara-de-neubauer> [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [63] [https://www.google.pt/search?q=camara+de+neubauer&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjJ0KK2sYvPAhUExxQKHSIXB1IQ\\_AUIBigB#imgsrc=WSAG1AMSaiA3xM%3A](https://www.google.pt/search?q=camara+de+neubauer&biw=1366&bih=667&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjJ0KK2sYvPAhUExxQKHSIXB1IQ_AUIBigB#imgsrc=WSAG1AMSaiA3xM%3A) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [64] [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9249?lang=pt&region=PT&gclid=Cj0KEQjw3s6-BRC3kKL\\_86XDvq4BEiQAAUqtZ\\_8YlYm3KGOaWxkzE9o2wVWk7xa7Ta4-p5JL-1jtuoaAk908P8HAQ](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9249?lang=pt&region=PT&gclid=Cj0KEQjw3s6-BRC3kKL_86XDvq4BEiQAAUqtZ_8YlYm3KGOaWxkzE9o2wVWk7xa7Ta4-p5JL-1jtuoaAk908P8HAQ) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [65] Yildirim S., Isolation Methods of Dental Pulp Stem Cells, *Dental Pulp Stem Cells* (2013), consultado e [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-5687-2\\_5#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-5687-2_5#page-1), [Online] em Agosto de 2016.
- [66] Ernest P., Erba P., Mariani G., Gomes C., Multidrug Resistance in Cancer: its Mechanism and its Modulation. *Drug News & Perspectives* (2007) 20(6): 371-378.
- [67] Gomes C., Welling M., Que I., Henriquez N., Pluijm G., Romeo S., Abrunhosa A., Botelho M.F., Pancras CW Hogendoorn, Ernest Pauwels, Anne Marie Cleton-Jansen. Functional Imaging of Multidrug Resistance in an Orthotopic Model of Osteosarcoma using 99mTc-Sestamibi. *Eur J Nuc Med and Mol Imaging* (2007) 34(11), 1793-1803.
- [68] Gomes C., Paassen H., Romeo S., Welling M., Feitsma R., Abrunhosa A., Botelho M.F., Hogendoorn P., Pauwels E., Cleton-Jansen A., Differential drug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines assessed by mRNA analysis and functional radiotracer assays. *Nuclear Medicine and Biology* (2006) 33, 831-840.
- [69] Domingos M., Tese doutoral - Caracterização Mecânica e Biológica de Scaffolds Produzidos por BioCell Printing, [dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/8613/tmd.pdf?sequence=1](http://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/8613/tmd.pdf?sequence=1), consultado em Agosto de 2016.
- [70] Ribeiro L., Estudo da estabilidade da reacção industrial de formação de óxido de etileno a partir do gerenciamento das variáveis críticas de processo. Tese de Doutoramento, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (2013). Consultado em



[www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde.../Tese\\_LucianoGoncalvesRibeiro.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde.../Tese_LucianoGoncalvesRibeiro.pdf) [Online], em Agosto de 2016.

- [71] Freeman M.A.R., Barwell C.F., Ethylene oxide sterilization in hospital practice, *J. Hyg., Camb.* (1960) 58, 337-345.
- [72] Lerouge S., Wertheimer M.R., Yahia L'H., Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations, *Plasmas and Polymers* (2001) 6(3), 175-181.
- [73] Oliveira dos Santos M., Pacheco E., Colares A.C., Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio: Relato de experiência, *Revista Baiana de Enfermagem* (2003) 18, 125-138.
- [74] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed (2004), 235-331.
- [75] Harkness John E., Wagner Joseph E., *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. Williams & Wilkins – 4th edition (1996), 71.
- [76] [http://philipdarrenjones.com/web\\_documents/rat\\_dissection.pdf](http://philipdarrenjones.com/web_documents/rat_dissection.pdf) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [77] <http://facy.dvrlists.com/internal-anatomy-of-a-rat/> [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [78] Ohashi K., Yokoyama T., Nakajima Y., Kosovsky M., Methods for Implantation of Corning® Matrigel® Matrix into Mice and Tissue Fixation, Corning Incorporated (2013). Consultado em [http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/an\\_DL\\_036\\_Methods\\_for\\_Implantation\\_of\\_Matrigel\\_Matrix\\_into\\_Mice\\_Tissue\\_Fix.pdf](http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/an_DL_036_Methods_for_Implantation_of_Matrigel_Matrix_into_Mice_Tissue_Fix.pdf) [Online], em Agosto de 2016.
- [79] Flecknell P., Replacement, Reduction and Refinement, Comparative Biology Centre, ALTEX 19 (2002). Consultado em [http://www.altex.ch/resources/Altex\\_2002\\_2\\_073\\_078\\_Flecknell.pdf](http://www.altex.ch/resources/Altex_2002_2_073_078_Flecknell.pdf) [Online], em Agosto de 2016.
- [80] [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/3r/alternative\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/alternative_en.htm) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [81] [http://www.spcal.pt/elearning/index.php?target=detalhe-aula&id\\_aula=4](http://www.spcal.pt/elearning/index.php?target=detalhe-aula&id_aula=4) [Online], consultado em Agosto de 2016.
- [82] <http://www.animalethics.org.au/> [Online], consultado em Agosto de 2016.



## ANEXO A - Output para análise estatística

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

1,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00 8	8,50	68,00
	3,00 8	8,50	68,00
	Total #		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	32,000
Wilcoxon W	68,000
Z	0,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

0,00

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	4,50	36,00
	3,00	8	12,50	#####
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-3,371
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

0,39

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	9,50	76,00
	3,00	8	7,50	60,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	24,000
Wilcoxon W	60,000
Z	-,843
Asymp. Sig. (2-tailed)	,399
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,442 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,08

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	#	6,82	75,00
	3,00	4	11,25	45,00

Total #

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	9,000
Wilcoxon W	75,000
Z	-1,699
Asymp. Sig. (2-tailed)	,089
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,104 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	11,13
	3,00	7	4,43
	Total	#	

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

Valor de MTT

Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	31,000
Z	-2,893
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	5,38	43,00
	3,00	8	11,63	93,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	7,000
Wilcoxon W	43,000
Z	-2,639
Asymp. Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,007 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

- b. Grouping Variable: ester\_Cat
- c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	8	8,50	68,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,737
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

- b. Grouping Variable: ester\_Cat
- c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

0,00



**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	10,50	42,00
	8	4,50	36,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-2,737
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,06

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	5,13	41,00
	3,00	4	9,25	37,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	41,000
Z	-1,868
Asymp. Sig. (2-tailed)	,062
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,073 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,43

#### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	#	8,55	94,00
	3,00	4	6,50	26,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	16,000
Wilcoxon W	26,000
Z	-,784
Asymp. Sig. (2-tailed)	,433
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,489 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	10,50
	3,00	8	4,50
	Total	#	36,00

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000

Wilcoxon W	36,000
Z	-2,737
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	2,50	10,00
	#	10,00	#####
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,883
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**

0,83

**Mann-Whitney Test**

<b>Ranks<sup>a</sup></b>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	5,88	47,00
	3,00	3	6,33	19,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º

<b>Test Statistics<sup>a,b</sup></b>	
	Valor de MTT
Mann-Whitney U	11,000
Wilcoxon W	47,000
Z	-,204
Asymp. Sig. (2-tailed)	,838
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,921 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	8	4,50	36,00
	4	10,50	42,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
-----------	---	-----------	--------------

Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	8	8,50	68,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,737
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,12

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
Valor de MTT	1,00	6	5,50	33,00
	3,00	8	9,00	72,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	33,000
Z	-1,556
Asymp. Sig. (2-tailed)	,120
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,142 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,39

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	7,50	60,00
	3,00	8	9,50	76,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	24,000
Wilcoxon W	60,000
Z	-,843
Asymp. Sig. (2-tailed)	,399



Exact Sig. [2\*(1-tailed Sig.)]

,442<sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	4,50
	3,00	8	12,50
	Total	#	####

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-3,371
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	10,50	42,00
	8	4,50	36,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-2,737
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

0,70

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	6,50	26,00
	3,00	7	5,71	40,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	40,000
Z	-,378
Asymp. Sig. (2-tailed)	,705
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,788 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,49

#### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	6,00	48,00
	3,00	4	7,50	30,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	48,000
Z	-,679
Asymp. Sig. (2-tailed)	,497
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,570 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	8,50
	3,00	4	2,50
	Total	#	10,00

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000

Wilcoxon W	10,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	8,50	68,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

0,00

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	5,00	40,00
	3,00	8	12,00	96,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Valor de MTT
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	40,000
Z	-2,949
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**

0,14

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	8	10,25	82,00
	8	6,75	54,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	18,000
Wilcoxon W	54,000
Z	-1,475
Asymp. Sig. (2-tailed)	,140
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,161 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,49

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
-----------	---	-----------	--------------

Valor de MTT	1,00	8	7,00	56,00
	3,00	4	5,50	22,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	22,000
Z	-,679
Asymp. Sig. (2-tailed)	,497
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,570 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,02

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	4	6,50	26,00
	Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**



	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,02

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	6,50	26,00
	4	2,50	10,00
Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021

Exact Sig. [2\*(1-tailed Sig.)]

,029<sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,01

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	5,50
	8		44,00
	3,00	8	11,50
	8		92,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	44,000
Z	-2,528
Asymp. Sig. (2-tailed)	,011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,010 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	12,50
	3,00	8	4,50
	Total	#	36,00

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-3,371
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

0,24

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	3,50	14,00
	3,00	4	5,50	22,00
	Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	14,000
Z	-1,162
Asymp. Sig. (2-tailed)	,245
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,343 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,02

#### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	4	6,50	26,00
	Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,73

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	6,75
	3,00	4	6,00
	Total	#	

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	14,000

Wilcoxon W	24,000
Z	-,340
Asymp. Sig. (2-tailed)	,734
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	+ + 規

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	4,50
	3,00	8	12,50
	Total	#	####

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-3,371
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

- b. Grouping Variable: ester\_Cat
- c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º**

1,00

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	6	5,50	33,00
	3,00	4	5,50	22,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Valor de MTT
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	22,000
Z	0,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

- b. Grouping Variable: ester\_Cat
- c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

0,02

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	6,50	26,00
	4	2,50	10,00
Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**



ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	8,50	68,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,00

#### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	4,50	36,00
	3,00	4	10,50	42,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,02

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50
	3,00	4	6,50
	Total	8	10,00

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000

Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,05

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	2,88	11,50
	4	6,13	24,50
Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	1,500
Wilcoxon W	11,500
Z	-1,888
Asymp. Sig. (2-tailed)	,059
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**

0,29

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	7,25	58,00
	3,00	8	9,75	78,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Valor de MTT
Mann-Whitney U	22,000
Wilcoxon W	58,000
Z	-1,050
Asymp. Sig. (2-tailed)	,294
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,328 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º**

0,49

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	8	6,00	48,00
	4	7,50	30,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	48,000
Z	-,679
Asymp. Sig. (2-tailed)	,497
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,570 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,15

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
-----------	---	-----------	--------------

Valor de MTT	1,00	8	6,88	55,00
	3,00	3	3,67	11,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	11,000
Z	-1,429
Asymp. Sig. (2-tailed)	,153
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,194 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,07

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	8,50 68,00
	3,00	5	4,60 23,00
	Total	#	

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	23,000
Z	-1,757
Asymp. Sig. (2-tailed)	,079
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,093 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	8,50	68,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007

Exact Sig. [2\*(1-tailed Sig.)]

,004<sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45<sup>o</sup>

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90<sup>o</sup>**

0,00

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	8,50
	3,00	4	2,50
	Total	#	10,00

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90<sup>o</sup>

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90<sup>o</sup>

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.



Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

0,04

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	3,50
	3,00	8	8,00
	Total	#	64,00

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	14,000
Z	-2,053
Asymp. Sig. (2-tailed)	,040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,048 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	10,50	42,00
	3,00	8	4,50	36,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-2,737
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,53

#### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	9,50	76,00
	3,00	#	11,17	#####
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	40,000
Wilcoxon W	76,000
Z	-,618
Asymp. Sig. (2-tailed)	,536
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,571 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	15,00
	3,00	#	7,50
	Total	#	90,00

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	12,000

Wilcoxon W	90,000
Z	-2,782
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,02

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	2,50	10,00
	4	6,50	26,00
Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,02

**Mann-Whitney Test**

<b>Ranks<sup>a</sup></b>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	4	6,50	26,00
	Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

<b>Test Statistics<sup>a,b</sup></b>	
	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,61

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	8	6,13	49,00
	4	7,25	29,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	13,000
Wilcoxon W	49,000
Z	-,510
Asymp. Sig. (2-tailed)	,610
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,683 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
-----------	---	-----------	--------------

Valor de MTT	1,00	8	8,50	68,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks	
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	8	8,50	68,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,737
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,04

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	9,50	38,00
	3,00	8	5,00	40,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	40,000
Z	-2,038
Asymp. Sig. (2-tailed)	,042



Exact Sig. [2\*(1-tailed Sig.)]

,048<sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

0,01

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	14,50 #####
	3,00	#	7,83 94,00
Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	16,000
Wilcoxon W	94,000
Z	-2,473
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,012 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	8	4,50	36,00
	3,00	4	10,50	42,00
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-2,717
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

0,00

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	5	3,00	15,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	5		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

0,02

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	4	6,50	26,00
	Total	8		

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 3 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

- b. Grouping Variable: ester\_Cat
- c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

- a. Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º
- b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

- a. Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**

### Mann-Whitney Test

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

### Mann-Whitney Test

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**

### **Mann-Whitney Test**

#### **Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

### **Mann-Whitney Test**

#### **Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 5 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º**

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45º**



### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	3	3,67	11,00
	4	4,25	17,00
Total	7		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	11,000
Z	-,354
Asymp. Sig. (2-tailed)	,724
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,857 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

0,02

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	6,50	26,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	8		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

#### Mann-Whitney Test

#### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

- a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°  
 b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

- a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°  
 b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

- a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º**

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45º

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º**

0,08

**Mann-Whitney Test**

Ranks <sup>a</sup>				
ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	3	4,00	12,00
	3,00	#	9,00	#####
	Total	#		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90º



**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Valor de MTT
Mann-Whitney U	6,000
Wilcoxon W	12,000
Z	-1,732
Asymp. Sig. (2-tailed)	,083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,101 <sup>c</sup>

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Grouping Variable: ester\_Cat

c. Not corrected for ties.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	4	2,50	10,00
	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Macrófagos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 7 Dias, Tipo de células = Co-cultura, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

**Mann-Whitney Test****Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA S 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = HA N 25%, Poro = 300 micrometros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks<sup>a</sup>**

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	4	2,50	10,00
	3,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Fibroblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Osteoblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Osteoblastos, Substância = HA N 10%, Poro = 600 micrómetros, Graus = 45°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.

**Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Osteoblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°**

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks<sup>a</sup>

ester_Cat		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Valor de MTT	1,00	0 <sup>b</sup>	0,00	0,00
	3,00	4	2,50	10,00
	Total	4		

a. Tempo (dias) = 15 Dias, Tipo de células = Osteoblastos, Substância = PCL, Poro = 600 micrómetros, Graus = 90°

b. Mann-Whitney Test cannot be performed on empty groups.



## ANEXO B - Comparação entre os vários tipos de materiais testados com diferentes tipos celulares e de esterilização

