

Maria Cândida Balão Mendes

MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO *VERSUS* ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM *SCAFFOLDS* PARA APLICAÇÃO EM MEDICINA DENTÁRIA

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

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

• U



C •

FCTUC

FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Cândida Balão Mendes

Métodos de esterilização *versus* adesão celular para *scaffolds* numa aplicação em Medicina Dentária

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

Orientadores:

Doutora Ana Cristina Aguiar dos Santos

Prof^ª. Doutora Margarida Figueiredo

Coimbra, 2017

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:



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

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



... "tenho em mim todos os sonhos do mundo"
Fernando Pessoa

Aos meus pais e irmão.



Agradecimentos

No findar de um dos capítulos mais decisivos da minha vida, não posso deixar de manifestar a minha eterna gratidão a todos aqueles que estiveram sempre presentes. Se há 5 anos a minha vida era preenchida por incertezas e receios por entrar num mundo novo, numa cidade nova, hoje não tenho palavras para descrever a plenitude que sinto em saber que levo da Universidade de Coimbra, do curso de Engenharia Biomédica e de todas as pessoas que se cruzaram no meu caminho, centenas de histórias tão minhas, tão nossas.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Ana Cristina Aguiar dos Santos, pela orientação, disponibilidade e sentido de companheirismo constantes ao longo deste ano. A sua dedicação, partilha de conhecimentos e sabedoria, incutiram em mim o verdadeiro gosto pela investigação biomédica.

Um obrigada à Prof^a Doutora Margarida Figueiredo por ter aceite co-orientar este trabalho inserido no âmbito de projetos desenvolvidos no grupo que coordena.

Gostaria também de deixar o meu obrigada especial à Prof^a Doutora Bárbara Oliveiros, pela simpatia única e pela disponibilidade e ajuda no tratamento e análise estatística dos resultados.

À Mestre Diana Sequeira, pela amabilidade e prontidão com que ajudou a obter células para as experiências.

À Dr^a Catarina Chaves, pela incansável disponibilidade e acompanhamento durante a execução dos ensaios microbiológicos e ao Dr Fernando Rodrigues, diretor do Serviço de Patologia Clínica na área da Microbiologia, por se mostrar sempre muito recetivo em colaborar em projetos de investigação.

À Técnica de laboratório Cláudia Brites, pela inquestionável mais valia na técnica histológica.

À Doutora Patrícia Alves, pela disponibilidade e ajuda na execução da esteri-

lização por plasma.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e à Doutora Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica, da FMUC-IBILI, pelas facilidades conseguidas para a realização do trabalho.

A todo o grupo do IBILI pela simpatia e interajuda.

Ao Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares pela realização da esterilização por radiação gama, Prof. Doutor António Falcão e Mestre Pedro Santos e respetivos testes microbiológicos, Dr^a Sandra Cabo Verde.

Ao Mestre Carlos Ramos e à Francisca Pereira, que diariamente me acompanharam e tornaram os meus dias repletos de boa disposição.

À Mestre Catarina Silva pela produção dos *scaffolds* utilizados.

Aos meus pais, pelo amor e carinho que sempre me proporcionaram e pelos enormes sacrifícios que fizeram para tornar tudo isto possível. Embora a muitos quilómetros de distância uns dos outros, sempre estiveram a uma chamada de distância para salvar o meu dia. Obrigada por nunca deixarem de acreditar em mim e por apoiarem sempre os meus sonhos.

Ao meu irmão, por todos os valores que me transmitiu e por ter estado sempre lá a dizer “Não te preocupes, eu estou aqui”. Só Deus sabe o orgulho que sinto em ti.

À afilhada mais linda do mundo por toda a alegria de viver e por fazer dos momentos mais simples, momentos verdadeiramente mágicos.

A toda a minha família por todo o amor e apoio, mas sobretudo pelo sentimento de Família unida que sempre me inculcaram.

Aos meus queridos amigos de Coimbra por terem tornado estes 5 anos os melhores anos da minha vida. Não posso deixar de destacar a Verónica, a Vila, a Xana, a Rita, a Monti, a Mariana, a Minês o Rebelo e a Francisca Fonseca. Para além de fazerem parte do meu coração, estão sem dúvida no meu futuro!

Um obrigada especial também à família da Rita Monteiro, por todos os almoços, jantares e sessões na lareira e por se terem tornado uma segunda família para mim.

A ti Leticia pela amizade genuína, pelas maluquices e pelo apoio constante ao longo destes anos todos. Levo-te comigo p'rá vida !

Aos meus amigos de Braga, pela amizade, histórias infindáveis e momentos únicos que passamos lado a lado. Sem vocês as vindas a Braga não seriam a mesma coisa.

A ti Coimbra, do fundo do meu coração, um infinito obrigada!

Resumo

Nas últimas décadas tem-se assistido a uma crescente evolução na área da Medicina Dentária, sobretudo ao nível da Implantologia. Dados os requisitos estéticos e funcionais de uma sociedade cada vez mais exigente, muitas vezes há a necessidade de recorrer a cirurgias reconstrutivas, que permitam regenerar o tecido ósseo outrora perdido. Nestas cirurgias, por sua vez, utilizam-se biomateriais de substituição óssea de origem humana, animal ou sintética que, implantados no organismo, mimetizam a fisiologia óssea, atuam como suporte e potenciam a formação do novo tecido, sem que seja induzida resposta imunológica.

Neste contexto surgiu o tema desta dissertação que teve como principal objetivo avaliar a citotoxicidade de diferentes *scaffolds* quando sujeitos a três técnicas de esterilização distintas, para uma futura aplicação em Medicina Dentária para preenchimento de defeitos ósseos. Os referidos *scaffolds* foram produzidos por uma técnica de fabricação aditiva, sendo constituídos por poli(caprolactona) (PCL) ou PCL e hidroxiapatite (HA). Para o efeito, foram fabricados não só com diferentes teores de HA, 10% ou 25%, mas também tendo duas origens distintas: natural e sintética. Quanto à sua composição estrutural, os *scaffolds* são formados por filamentos cuja distância entre eles pode ser 300 ou 600 μm e cujo ângulo varia entre $0^\circ/90^\circ$ ou $0^\circ/45^\circ$. O objetivo ao desenvolver *scaffolds* com formulações e arquiteturas distintas, sujeitos a três métodos de esterilização frequentemente usados na clínica, a saber, a esterilização por óxido etileno, radiação gama e esterilização por plasma, era a possibilidade de inferir sobre qual das combinações teria maior influência no desempenho biológico, correlacionado com o processo de esterilização.

Os diferentes *scaffolds* foram esterilizados e, posteriormente, avaliados através de ensaios microbiológicos, para confirmar a eficácia do método de esterilização. Os resultados destes ensaios confirmaram a ausência de crescimento microbiano, revelando que os resultados estão em conformidade com as normas em vigor.

Quando testados *in vitro*, como suporte para a cultura de células fibroblásticas,

macrocíticas e sua co-cultura, observou-se uma distribuição uniforme das células por todo o *scaffold*, indicando afinidade para estas estruturas. Os resultados obtidos revelam que o melhor desempenho da técnica de esterilização depende, efetivamente, da formulação utilizada, do tipo de células (individual ou em combinação) e dos dias de estudo. Contudo, apesar de não permitirem estabelecer uma relação precisa entre algumas variáveis, os resultados obtidos para a co-cultura ao fim dos 7 dias parecem indicar que, *in vitro*, a esterilização por plasma é a mais promissora.

De forma a provar o processo de integração *in vivo*, foram selecionados alguns dos *scaffolds* que obtiveram os melhores e piores resultados *in vitro*. Após 1 mês da implantação, o processo de integração foi avaliado, por observação macro e microscópica, em relação ao processo de cicatrização e reação inflamatória. Da observação macroscópica, os resultados indicam que o processo de reação inflamatória decorreu de acordo com o esperado, obtendo-se uma cicatrização sugestiva de uma boa integração. *In vivo*, os resultados não estão em conformidade com os analisados *In vitro*, uma vez que a esterilização por óxido etileno foi a que menos reagiu com o organismo do modelo animal utilizado.

Na tentativa de obter células estaminais para posterior diferenciação em células produtoras de osso, a partir de polpa dentária e papila apical jovens, realizaram-se ensaios de cultura de explantes, tendo-se observado crescimento de células adipogênicas.

Os resultados dos testes *in vitro* permitiram refinar a seleção de melhores formulações promotoras da regeneração de defeitos ósseos da cavidade oral, sendo que os métodos de esterilização demonstraram estar diretamente correlacionados com a formulação e a duração de ensaio.

Palavras-chave: poli(caprolactona), hidroxiapatite, *scaffolds*, culturas celulares, Medicina Dentária.

Abstract

In the last decades there has been an extraordinary evolution in the area of Dentistry, especially in Implantology. Given the aesthetic and functional requirements of an increasingly demanding society, there is often the need to resort to reconstructive surgeries, which allow the regeneration of bone tissue once lost. Biomaterials, both from human, animal or synthetic origin, have been used as bone replacement for implants. They intend to mimetize the bone physiology, act as a support and potentiate the formation of new tissue, without inducing immune response.

The present thesis is included in a wider project intending to fill in bone defects for Dentistry. The main objective has been to evaluate the cytotoxicity of different scaffold formulations, sterilized with different common techniques. These scaffolds were produced by an additive manufacturing technique, consisting of poly(caprolactone) (PCL) or PCL and hidroxyapatite (HA). They were manufactured not only with different levels of HA (10% or 25%), but also from two different origins: natural and synthetic. Regarding their structural composition, scaffolds are formed by filaments which distance can be 300 or 600 μm , and with an angle variation between filaments of $0^\circ/90^\circ$ or $0^\circ/45^\circ$. The goal of such scaffolds, with distinct formulations and architectures, sterilized by the three most used methods of sterilization in clinics, namely ethylene oxide, gamma radiation and plasma, was to infer which combination would have the greatest influence on biological performance, correlated with the sterilization process.

The different scaffolds were sterilized and evaluated through microbiological assays, to confirm the effectiveness of the sterilization method. The results of these tests confirmed the absence of microbial growth, showing that the results are in compliance with the current rules.

When tested in vitro, as support for fibroblast, macrocytic, and their coculture, an uniform cell distribution throughout the scaffold was observed, indicating an affinity for these structures. The results showed that the best performance of the

sterilization technique depends on the formulation, the cell type (individual or in combination) and the length of the study. However, although they do not allow a precise relationship between some variables, the results obtained for the co-culture at 7 days seem to indicate that, *in vitro*, the plasma sterilization is the most promising.

In order to improve the integration process *in vivo* some of the scaffolds, those obtaining the best and the worst results *in vitro*, were selected. One month post implantation, the integration process was evaluated, by macro and microscopic observation. Regarding the healing process and inflammatory reaction, the results indicate that they proceeded as expected, obtaining a good healing, suggestive of a good integration. *In vivo*, the results are not in accordance with those analyzed *in vitro*, since ethylene oxide sterilization was the least reactive for the animal model.

Attempting to obtain stem cells for further differentiation into bone-like producing cells, from young dental pulp and apical papilla, explant culture assays were performed, and the growth of adipogenic cells was observed.

The results of the *in vitro* tests allowed to refine the selection of the best formulations, promoting the regeneration of bone defects in the oral cavity. It has been shown that sterilization methods are directly correlated with the formulation and duration of the study.

Keywords: poli(caprolactone), hydroxyapatite, scaffolds, cell culture, Dentistry

Acrónimos

ADN Ácido desoxirribonucleico

BMP's Proteínas ósseas morfogénicas (*Bone Morphogenetic Proteins*)

CHUC Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

DEQ Departamento de Engenharia Química

DFPSCs Células estaminais do folículo dentário (*Dental Follicle precursor cells*)

DMEM *Dulbeco's Modified Eagle's Medium*)

DPSC Células estaminais da polpa dentária (*Dental pulp stem cells*)

Ec Energia cinética

ECM Matriz extracelular (*extracellular matrix*)

ET Engenharia de Tecidos

FBS Soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)

FDA *food and drug administration*

FGF's fatores de crescimento fibroblásticos *Fibroblast growth factors*

FMUC Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

FW espessura do filamento (*filament width*)

FTIR Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de fourier (*Fourier transform infrared spectropy*)

GAG's glicosaminoglicanos

HA hidroxiapatite

HA(N) hidroxiapatite de origem natural

HA(S) hidroxiapatite de origem sintética

- IBILI** Instituto de Biofísica da Universidade de Coimbra
- IL's** interleucinas
- ITN** Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa
- LETAL** Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas
- MAPK** cascata de proteínas quinases mitogénicas (*mitogen-activated protein kinase*)
- MOCF** Microscópio ótico de contraste de fase
- MSC** Células estaminais mesenquimatosas (*mesenchymal stem cells*)
- MTT** brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-difeniltetrazólico)
- PBS** Tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
- PCL** Poli(caprolactona)
- PDLSCs** Células estaminais do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells*)
- PGA** Poli(ácido glicólico)
- PLA** Poli(ácido láctico)
- PRP** Plasma rico em plaquetas
- PS** Tamanho do poro (*pore size*)
- SCAP** Células estaminais da papila apical (*Stem cells from apical papila*)
- SHEDS** Células estaminais de dentes decíduos (*Stem cells from exfoliated deciduous teeth*)
- SPSS** *Statistical Package for Social Sciences*
- ST** Espessura da camada (*slice thickness*)
- TNF- α** Fator de necrose tumoral alfa
- TSA** *Tryptic Soy Agar*
- TSB** *Tryptic Soy Broth*
- UFC** Unidades formadoras de colónias

Lista de Figuras

1.1	Representação macroscópica das porções de um dente.	4
1.2	(A)- esquema representativo da zona periférica da polpa e os seus principais constituintes;(b) - fotomicrografia de média potência de uma amostra de polpa humana: (D)dentina; (P) pré-dentina; (O) odontoblastos; (CF) zona pobre em células; (CR) zona rica em células; (CP) região central da polpa.	6
1.3	Esquema representativo das diferentes células estaminais derivadas do tecido dentário.	9
1.4	Esquema representativo da atividade das MSC na diferenciação de células ósseas.	11
1.5	Esquema representativo do processo de remodelagem óssea.	12
1.6	Esquema representativo dos cinco estágios da cicatrização alveolar após a exodontia.	13
1.7	Estrutura atômica da hidroxiapatite.	17
1.8	Estrutura molecular da PCL.	18
2.1	Esquema representativo de um <i>scaffold</i> com tamanho de poro de 350 μm e espaçamento entre os filamentos de 600 μm	24
2.2	Equipamento para modificação de superfícies por plasma do DEQ. . .	28
2.3	Preparação da esterilização dos pequenos retângulos de <i>scaffolds</i> (a , b) e esterilização dos mesmos (c,d).	28

2.4	Procedimento realizado para o teste microbiológico para o método de esterilização por óxido etileno. Numa câmara de fluxo laminar, com uma agulha estéril (a), os pequenos retângulos foram cortados espaçadamente sobre as placas de meio de cultura sólido (b , c). Depois de colocadas todas as amostras do <i>scaffolds</i> em questão, a placa foi fechada (d) e o procedimento repetiu-se para as restantes amostras, quer fossem pequenos retângulos ou discos (f). Por fim, as placas foram encaixadas num suporte apropriado e foram colocadas a incubar durante 18 dias (g).	30
2.5	Imagens representativas do processo de adição do azul tripano à câmara de <i>Neubauer</i> . Adicionam-se 10 μ l do corante à suspensão celular (a) e coloca-se uma alíquota da suspensão corada na câmara (b) para ser observada ao MOCF (c).	35
2.6	Procedimento realizado para os ensaios de monocultura com fibroblastos. Com uma agulha estéril (a), os <i>scaffolds</i> são colocados no interior dos poços pretendidos (b). De seguida, a suspensão celular é semeada sobre os <i>scaffolds</i> colocados nos poços destinados para controlos (c,d). Por fim, adiciona-se meio, de maneira a perfazer os 300 μ l (e) por poço. A caixa, identificada e isolada com fita cola, está pronta a incubar (f).	37
2.7	Redução do MTT a <i>formazan</i> pelas células metabolicamente ativas.	39
2.8	Esquema representativo dos campos cirúrgicos criados.	41
2.9	Exemplo de amostras recolhidas para a formulação PCL-HA(S)10-300-45 com a esterilização por óxido etileno (a), plasma (b), radiação (c) e controlo (d).	42
2.10	Sequência de imagens ilustrativas do procedimento da obtenção da polpa dentária a partir do dente. Com uma broca dentária abre-se, cuidadosamente, o dente (a,b), extraem-se a polpa e a papila (c) e colocam-se as mesmas em <i>falcons</i> com DMEM (d).	45
2.11	Imagens ilustrativas do procedimento de cultivo. A amostra de polpa (ou papila) foi transferida para uma caixa de Petri (a) e foi reduzida a pequenos fragmentos (b). Com uma agulha estéril distribuíram-se os fragmentos por uma caixa de 6 poços (c) e adicionou-se meio a cada um deles (d).	46
3.1	Fotografias de algumas das amostras não contaminadas (a , b , c), contaminadas devido a falhas no procedimento (d,e) e o controlo positivo (f).	50

3.2	Fotografias de algumas das amostras não contaminadas (a, b), o controlo ambiental da esterilização (c), os controlos ambientais do ensaio microbiológico (d,e) e o controlo positivo (f).	54
3.3	Fotografias de amostras contaminadas devido a falhas no procedimento.	55
3.4	Fotomicrografias dos <i>scaffolds</i> PCL-600-90 (a), PCL-HA(S)10-600-90 (b), PCL-HA(N)25-300-90 (c) e PCL-HA(N)10-600-45 (d).	57
3.5	Identificação das melhores esterilizações para a monocultura de fibroblastos, para cada uma das formulações, aos 3 e 7 dias.	58
3.6	Representa gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de fibroblastos, após 3 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.	59
3.7	Representação gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de fibroblastos, após 7 dias do cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.	59
3.8	Identificação das melhores esterilizações para a monocultura de macrófagos, de acordo com as formulações, aos 3 dias.	60
3.9	Representação gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de macrófagos, após 3 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.	61
3.10	Identificação das melhores esterilizações para a co-cultura de macrófagos e fibroblastos, para cada uma das formulações, aos 3 e 5 dias.	62
3.11	Representação gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de co-cultura de macrófagos e fibroblastos, após 3 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.	63
3.12	Representação do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de co-cultura de macrófagos e fibroblastos , após 5 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.	64
3.13	Corte histológico da zona de controlo, obtido com uma lupa ótica com ampliação 5,5×. Neste corte são visíveis folículos pilosos (F), glândulas sebáceas (S), miofibrilas (M), tecido celular subcutâneo (T) e tecido conjuntivo, em particular colagénio (C).	67

- 3.14 Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o scaffold PCL-HA(S)25-300-45, esterilizado por óxido etileno (**A**) (ampliação 20×), (**B**) (ampliação 40×), radiação γ (**C**) (ampliação 20×) e plasma (**D**) (ampliação 40×). Nestas imagens é possível observar folículos pilosos (**F**), glândulas sebáceas (**S**), miofibrilas (**M**), tecido celular subcutâneo (**T**), colagénio (**C**), miofibrilas incorporadas com fibras de colagénio (**MC**), tecido conjuntivo (**TC**) a invadir a zona do *scaffold*, infiltrado inflamatório (**I**) e tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (**TCI**). A zona ocupada pelo *scaffold* (**PCL**) corresponde às estruturas brancas, uma vez que a PCL foi dissolvida em xilol. A **HA** presente é identificada pelos fragmentos mais escuros e delimitam a estrutura ôca do *scaffold*. 69
- 3.15 Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o scaffold PCL-HA(S)10-300-45, esterilizado por óxido etileno (**A**) (ampliação 40×), radiação γ (**B**) (ampliação 100×) e plasma (**C**) (ampliação 40×). Nestas imagens é possível destacar miofibrilas (**M**), colagénio (**C**), vasos sanguíneos (**Vs**) infiltrado inflamatório (**I**), tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (**TCI**), a (**PCL**) e a **HA**. 70
- 3.16 Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o scaffold PCL-HA(S)25-300-90, esterilizado por óxido etileno (**A**) (ampliação 100×), radiação γ (**B**) (ampliação 40×) e plasma (**C**) (ampliação 40×). Nestas imagens destacam-se o infiltrado inflamatório (**I**), o tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (**TCI**), a (**PCL**) e a **HA**. 71
- 3.17 Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o *scaffold* PCL-HA(S)25-600-90, esterilizado por óxido etileno (**A**) (ampliação 40×), radiação γ (**B**) (ampliação 40×) e plasma (**C**) (ampliação 40×). Nestas imagens deu-se ênfase ao infiltrado inflamatório (**I**), à (**PCL**), à **HA** e ao tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (**TCI**). 72

3.18 Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal im-
 plantado com o scaffold PCL-HA(N)25-600-90, esterilizado por óxido
 etileno (**A**) (ampliação 40×), radiação γ (**B**) (ampliação 40×) e
 plasma (**C**) (ampliação 40×). Nestas imagens deu-se ênfase ao in-
 filtrado inflamatório (**I**), à (**PCL**), à **HA**, aos vasos sanguíneos (**Vs**)
 presentes, ao tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envol-
 ver o *scaffold* (**TCI**), à glândula sebácea (**S**), colagénio (**C**), extrato
 córneo (**E**) e ao folículo piloso (**F**). 73

3.19 Fotomicrografias representativas dos explantes (**Ex**) da polpa (**a,b,c**)
 e da papila (**d**), onde é possível observar o desenvolvimento de uma
 membrana formadora de células (**Mf**), com uma frente de crescimento
 ativa (**Fc**). 74

Lista de Tabelas

1.1	Algumas propriedades do esmalte e da dentina.	5
1.2	Algumas propriedades da PCL.	19
1.3	Principais técnicas de esterilização.	20
2.1	Combinações possíveis das propriedades dos <i>scaffolds</i> e respetivas designações.	25
3.1	Tabela de resultados referentes ao ensaio de esterilização por radiação γ	52
1	Fibroblastos - 3 dias	91
2	Fibroblastos - 7 dia	92
3	Co-cultura - 3 dias	92
4	Co-cultura - 5 dias	93
5	Macrófagos - 3 dias	93

Índice

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxiii
1 Introdução	1
1.1 Motivação	1
1.2 Estado da Arte	4
1.2.1 Anatomia dentária e dos tecidos de suporte	4
1.2.1.1 Osso Alveolar	10
1.2.2 Relação Osso/Implante	14
1.2.2.1 Engenharia de Tecidos	16
1.2.2.2 Biomateriais	17
1.2.2.3 Técnicas de esterilização	20
2 Materiais e Métodos	23
2.1 Produção dos <i>scaffolds</i>	23
2.2 Técnicas de Esterilização	25
2.2.1 Esterilização por óxido etileno	26
2.2.2 Esterilização por radiação gama (γ)	26
2.2.3 Esterilização por plasma	27
2.3 Ensaio Microbiológicos	29
2.3.1 Ensaio microbiológico para o método de esterilização por óxido etileno	29
2.3.2 Ensaio microbiológico para o método de esterilização por radiação γ	31
2.3.3 Ensaio microbiológico para o método de esterilização por plasma	31
2.4 Estudos <i>in vitro</i>	32
2.4.1 Metodologia da colheita e cultivo das células	33
2.4.2 Estudos de adesão e citotoxicidade celular	36

2.4.3	Avaliação da viabilidade celular	38
2.5	Estudos <i>in vivo</i>	39
2.5.1	Implantação dos <i>scaffolds</i>	40
2.5.2	Ocisão dos Animais	42
2.5.3	Estudo Histológico	42
2.6	Cultura de células primárias da polpa e da papila de dentes humanos	44
2.6.0.1	Metodologia de extração das células	44
2.6.0.2	Meios e condições de cultivo	45
2.7	Análise Estatística	47
3	Resultados e Discussão	49
3.1	Testes microbiológicos	49
3.1.1	Teste microbiológico para o método de esterilização por óxido elitenio	50
3.1.2	Teste microbiológico para o método de esterilização por radi- ação gama (γ)	51
3.1.3	Teste microbiológico para o método de esterilização por plasma	53
3.2	Estudos <i>in vitro</i>	55
3.2.1	Monocultura de Fibroblastos	57
3.2.2	Monocultura de Macrófagos	60
3.2.3	Co-cultura de fibroblastos e macrófagos	61
3.3	Estudos <i>in vivo</i>	64
3.3.1	Observações clínicas após implantação dos <i>scaffolds</i>	65
3.3.2	Observações macroscópicas ao longo do período experimental	66
3.3.3	Observações histológicas	66
3.3.3.1	Análise histológica da zona de controlo	67
3.3.3.2	Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL-HA(N)25-300-90	68
3.3.3.3	Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL-HA(S)10-300-45	69
3.3.3.4	Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL-HA(S)25-300-90	70
3.3.3.5	Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL-HA(S)25-600-90	71
3.3.3.6	Análise histológica do <i>scaffold</i> PCL-HA(N)25-600-90	72
3.4	Cultura de células primárias da polpa e da papila de dentes humanos	74
4	Conclusões e Perspetivas Futuras	77
	Referências Bibliográficas	81
	Apêndices	89

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação

Numa época em que a imagem é cada vez mais valorizada, o sorriso conquista um papel determinante na nossa vida profissional e na maneira como somos percebidos pelos outros. Apesar de não ser algo que gostemos de admitir, direta ou indiretamente, faz parte da Natureza Humana julgar os outros pela aparência e, por isso, a perda de um único dente, por diferentes razões, pode criar um certo constrangimento e, por conseguinte, não proporcionar a “melhor impressão” da pessoa. No caso particular da perda dentária, a este problema acresce ainda a perda funcional, nomeadamente nas funções fonadoras, de mastigação e de deglutição.

A necessidade de desenvolver técnicas que permitam melhorar significativamente a capacidade estética e funcional dos doentes torna-se, portanto, evidente e tem sido tema de investigação desde há várias décadas.

A grande revolução na Medicina Dentária data, sem dúvida, do início dos implantes osteointegrados. O desenvolvimento destes implantes tem recebido grande destaque, uma vez que oferecem uma solução segura, duradoura e mais confortável, quando comparada com as técnicas anteriormente usadas, como por exemplo as próteses.

Apesar dos custos associados, a comunidade médica relata que o tratamento com implantes dentários apresenta altíssimos níveis de sucesso. No entanto, tal como em qualquer outro tratamento médico, este sucesso depende de vários fatores, nomeadamente das características anatómicas e fisiológicas de cada doente, dos seus hábitos de higiene oral, hábitos tabágicos, da presença de patologias concomitantes como a diabetes não controlada, de terapêutica aguda/crónica instituída, entre outros. Contudo, nem sempre é possível substituir as raízes dentárias ausentes por implantes. A indicação de implantes osteointegrados requer uma análise cuidadosa de vários parâmetros. Entre os mais importantes, destacam-se a análise da quantidade e da qualidade do volume ósseo alveolar na área recetora e a proximidade de outras estruturas anatómicas, tal como o seio maxilar, que podem dificultar ou até mesmo impedir a utilização dos implantes.

Apesar da osteointegração dos implantes ser uma realidade no dia-a-dia, a qualidade e a quantidade ósseas disponíveis são fatores determinantes no planeamento da reabilitação com estes materiais, sendo, por isso, indicada a cirurgia oral reconstrutiva para aumentar o volume de tecido ósseo antes da implantação. Ainda que, atualmente, existiam algumas técnicas que permitem esta reconstrução, nomeadamente os enxertos ósseos e a utilização de membranas para regeneração óssea guiada, vários esforços têm sido efetuados para determinar o melhor método para recriar osso no maxilar e/ou na mandíbula. Este enquadramento da determinação do melhor método para formar osso e, assim, preparar o leito recetor, apresenta-se como o grande fator impulsionador deste projeto de investigação.

Neste sentido, o principal objetivo do trabalho em que este projeto se integra foi, a partir da Engenharia de Tecidos (ET), desenvolver uma metodologia que permitisse avaliar o desempenho biológico de diferentes *scaffolds* na integração/regeneração óssea, em particular, da mandíbula e do maxilar. Os *scaffolds* utilizados foram produzidos num estudo anterior por uma técnica de fabricação aditiva e são constituídos por poli(caprolactona) (PCL) ou por uma combinação de PCL e hidroxiapatite (HA). Para além disso, foram fabricados com diferentes composições de HA (10 % e 25%), com diferentes tipos de HA (natural ou sintética) e com geometria e porosidade específicas. Uma vez que os *scaffolds* foram desenhados para ser implantados *in vivo*, a esterilização é um processo imprescindível para evitar a transmissão e desenvolvimento de microrganismos. Neste contexto, os *scaffolds* foram esterilizados recorrendo às técnicas de esterilização mais utilizadas na clínica, compatíveis com as suas características: óxido etileno, radiação gama e plasma. O principal objetivo deste projeto é tentar identificar se existe uma técnica de esterilização preferencial, para além de tentar correlacionar com a melhor formulação

dos *scaffolds*. Para cada método de esterilização foi efetuado o respetivo controlo de qualidade microbiológico. Prevenida a contaminação cruzada, foram realizados os estudos *in vitro* para os *scaffolds* que anteriormente não tinham sido testados e estudos *in vivo* para aqueles que obtiveram os melhores e piores comportamentos celulares em cultura. Por último, foi ainda posto em prática um protocolo recente para obtenção e diferenciação de células estaminais produtoras de tecido duro, a partir da polpa total ou papila apical de dentes humanos jovens.

A presente dissertação está dividida em 4 capítulos, sendo que no primeiro é apresentada o estado da arte sobre anatomia dentária, em particular das células que inclui, dos princípios de regeneração óssea e da interação do osso com os biomateriais substitutos de osso. No segundo capítulo são apresentados os materiais e as técnicas utilizadas para a esterilização dos *scaffolds* e os ensaios microbiológicos, ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo* realizados. No terceiro capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos e, por fim, no quarto capítulo são enumeradas as principais conclusões e apresentadas algumas sugestões de trabalho futuro. Pretende-se, com este estudo, dar continuidade ao trabalho desenvolvido por ex-alunos do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, contribuindo com mais algum conhecimento em relação ao comportamento biológico destes *scaffolds*, face às diferentes composições, arquiteturas e esterilização.

1.2 Estado da Arte

1.2.1 Anatomia dentária e dos tecidos de suporte

Os dentes correspondem a cerca de 20% da cavidade oral e são um elemento essencial na estética facial, mastigação, função respiratória e fonética. Apesar de cada dente se desenvolver como uma entidade independente e de existirem vários tipos de dentes, diferindo uns dos outros pela forma e função, a sua constituição na porção interna e externa é similar. Assim, independentemente do tipo de dente, macroscopicamente, podemos considerar duas porções principais: a coroa - porção do dente que se desenvolve acima da linha da gengiva e contacta com o meio oral - e a raiz - porção do dente que se insere e se fixa no osso alveolar. A união das duas porções é feita através da linha cervical (**Figura 1.1**) [1].



Figura 1.1: Representação macroscópica das porções de um dente (adaptada de [2]).

Na porção coronária, o dente é revestido por esmalte que, por apresentar mais de 96% de matéria inorgânica e menos de 1% de matriz orgânica, é considerado o tecido mais duro do organismo [3, 4]. Em virtude das suas propriedades estruturais e mecânicas, o esmalte apresenta elevada dureza e elevado módulo de elasticidade (**Tabela 1.1**), que lhe conferem a estabilidade necessária ao longo da vida. No entanto, apesar do seu elevado conteúdo mineral, é muito vulnerável a lesões e ao desgaste por atrito (desgaste devido ao contacto esmalte contra esmalte), abrasão (devido às partículas abrasivas na comida e na pasta dos dentes), abfração (pela fratura do esmalte) e erosão dentárias (pela decomposição química) [5]. A sua função principal é proteger a dentina, impedindo que ela fique exposta ao meio bucal [1]. Por sua vez, a dentina forma o eixo estrutural do dente e constitui o tecido mineralizado que ocupa a maior parte da estrutura do dente (desde a coroa até à raiz) [1]. Contrariamente ao esmalte, a dentina é formada por uma menor percentagem de conteúdo mineral, aproximadamente 70% (HA enriquecida com carbonato de cálcio), e por 20% de matriz orgânica na forma de colagénio, glicosaminoglicanos (GAGs) e fosfoproteínas [4]. Em virtude do seu conteúdo colagénico, a dentina forma um tecido resiliente e, por isso, suporta o esmalte e compensa a sua fragilidade [2, 5]. Isto significa que, por ser menos

dura e mais dúctil que o esmalte, a dentina atua como uma camada de amortecimento para reduzir o efeito da carga da mastigação sobre este (**Tabela 1.1**) [5].

No interior da dentina existem inúmeros túbulos dentinários, com cerca de $3\mu\text{m}$ de diâmetro, que se estendem desde a superfície pulpar até à junção esmalte-dentina. Cada túbulo aloja no seu interior um prolongamento odontoblástico, que mantém contacto direto entre a dentina e a polpa [4].

Tabela 1.1: Algumas propriedades do esmalte e da dentina (adaptado de [5]).

Propriedades	Esmalte	Dentina
Módulo de <i>Young</i> (GPa)	20,0-84,2	10,2-15,6
Resistência à compressão (GPa)	0,095-0,386	0,249-0,315
Dureza de <i>Knoop</i>	250-500	51-71

Na sua porção radicular, a dentina está protegida por outro tecido mineralizado, o cimento [1]. Quanto à composição, o cimento é estruturalmente semelhante ao osso, com cerca de 50% de HA (componente inorgânico), mas avascular [4]. A sua principal função consiste na inserção das fibras do ligamento periodontal na raiz do dente [1, 2].

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo denso e vascularizado, constituído por feixes de fibras, essencialmente de colagénio, que se inserem, por um lado no cimento e por outro no osso alveolar, atuando como um ligamento suspensor do dente [1, 4]. Devido às suas características estruturais, o ligamento periodontal tem como funções fornecer a ligação do dente ao osso alveolar, gerar a força necessária à erupção dentária, fornecer as informações sensoriais sobre a posição do dente e produzir as forças que facilitam a atividade do maxilar/mandíbula [4].

Para além disso, a dentina delimita um espaço de forma aproximadamente semelhante ao dente, designada cavidade ou câmara pulpar [1]. Esta cavidade contém a polpa dentária que é formada por um tecido conjuntivo laxo, ricamente vascularizado e innervado, constituindo, assim, o substrato biológico da vitalidade dentária [1, 4]. Tal como qualquer tecido conjuntivo, a polpa dentária é formada pelas células características deste tecido, bem como, por células mais especializadas, os odontoblastos, que se desenvolvem num ambiente propício à sua interação: a matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*). Este complexo tridimensional consiste numa combinação de proteínas fibrosas, em particular o colagénio, e de substância fundamental, um complexo viscoso à base de macromoléculas biológicas, nomeadamente, os GAGs e glicoproteínas (laminina e fibronectina, entre outras), que fornece às células o suporte físico e a força mecânica essenciais à manutenção da estabilidade estrutural dos tecidos [6].

Na literatura, a polpa é descrita como um tecido detentor de duas regiões bem definidas, a central e a periférica. Na periferia da polpa, na região adjacente à camada de pré-dentina, localizam-se os odontoblastos. Estas células pertencem tanto à polpa como à dentina, pelo facto do seu corpo celular estar situado na polpa, mas os prolongamentos estarem alojados no interior dos túbulos dentinários que atravessam a dentina (**Figura 1.2**) [7].

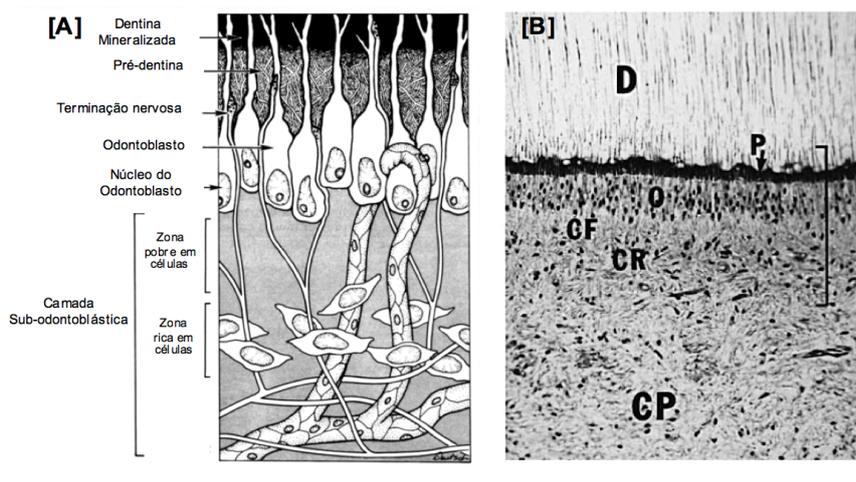


Figura 1.2: [A] esquema representativo da zona periférica da polpa e os seus principais constituintes; [B] - fotomicrografia de média potência de uma amostra de polpa humana: (D) dentina; (P) pré-dentina; (O) odontoblastos; (CF) zona pobre em células; (CR) zona rica em células; (CP) região central da polpa. (adaptada de [7]).

Em direção ao interior da polpa, a seguir à camada de odontoblastos, observa-se a camada sub-odontoblástica. Esta camada subdivide-se, por sua vez, em duas zonas distintas: uma zona periférica, caracterizada por um pobre conteúdo celular (zona de *Weil*), e uma zona mais central formada por células. Esta zona rica em células contém células indiferenciadas, células de natureza inflamatória, células dendríticas e fibroblastos. Na presença de estímulos exógenos, como cáries e exposição pulpar, os odontoblastos podem ser destruídos e, como tal, são as células indiferenciadas da polpa que sustentam a população de odontoblastos, através dos processos de diferenciação e proliferação. Ao longo de toda a camada sub-odontoblástica é ainda evidente a presença de uma grande densidade capilar e de pequenas fibras nervosas, que constituem o suprimento vascular e nervoso da polpa dentária. A região central da polpa ocupa a área circunscrita pela zona rica em células e constitui o principal sistema de suporte para a polpa periférica [7].

De uma forma geral, a polpa é constituída pelos seguintes constituintes celulares, cada um com características funcionais próprias, a saber: fibroblastos, células de defesa, odontoblastos e células estaminais.

1. Fibroblastos

Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e formam o componente principal do tecido pulpar. Estas células apresentam uma morfologia extremamente variável, mais frequentemente fusiforme, e caracterizam-se por possuírem um citoplasma abundante, rico em organitos intracelulares, como o retículo endoplasmático rugoso, o aparelho de Golgi e as mitocôndrias. O núcleo é grande e ovóide, pelo que são facilmente identificados em cortes histológicos. A principal função dos fibroblastos é sintetizar e segregar os componentes que farão parte dos constituintes da ECM, nomeadamente o colagénio e a substância fundamental [1, 7, 8].

2. Células de Defesa

As células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos são as células maioritariamente envolvidas nos mecanismos de defesa celular [9]. Porém, a atividade destas células está muito dependente das condições ditas normais ou patológicas da polpa, sendo estas determinantes para a posterior modelação da resposta celular. Assim, pode afirmar-se que as mesmas células, na polpa normal, regulam a densidade populacional celular e controlam a proliferação e apoptose celulares, enquanto que na polpa exposta ou patológica, contribuem essencialmente para resolver os processos inflamatórios [10]. Das células mencionadas anteriormente, destacam-se as células dendríticas que, por reconhecerem e capturarem o agente patogénico, ativam os linfócitos T, que iniciam uma resposta imunológica específica. [7, 10, 11].

3. Odontoblastos

Frequentemente designados por dentinoblastos, os odontoblastos são as células mais especializadas da polpa dentária e são os responsáveis pela formação da dentina e da pré-dentina, enquanto o dente permanecer vital [12]. Contudo, com o envelhecimento, verifica-se uma diminuição progressiva da polpa dentária, que se torna cada vez mais mineralizada [10].

À semelhança dos neurónios, os odontoblastos são células pós-mitóticas e, por isso, não se podem dividir. Neste sentido, os odontoblastos dispõem-se na zona periférica da polpa dentária num arranjo em paliçada, pois são aqui mais numerosos, enquanto que na raiz assumem o aspeto de um epitélio prismático simples [1, 12].

Relativamente à sua morfologia, os odontoblastos maduros, que se situam na periferia da polpa, são células grandes e colunares que possuem, em média, 50 μ m de comprimento e 5 μ m de largura [13]. Cada odontoblasto possui um núcleo grande e oval, localizado na região basal da célula. O seu citoplasma é rico em retículo endo-

plasmático rugoso, complexo de Golgi e mitocôndrias, sintetizando várias proteínas relacionadas com a dentinogênese (processo de formação da dentina) [12, 13].

Apesar de serem células conjuntivas, os odontoblastos são células altamente polarizadas, estabelecendo entre si numerosas junções intercelulares, nomeadamente as junções em hiato (do inglês *gap junctions*), junções apertadas (do inglês *tight junctions*) e desmossomas, que permitem a sinalização e a integridade celular e gerem o grau de permeabilidade [1, 12, 13]. Para além de produzir dentina, existem evidências que sugerem que os odontoblastos operam como células sensoriais que detetam os sinais nociceptivos e que os seus prolongamentos atuam como sensores capazes de detetar vários sinais [12].

4. Células estaminais

As células estaminais mesenquimais (MSC, do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) derivadas dos tecidos dentários têm-se revelado muito promissoras principalmente na área de regeneração óssea. Este interesse tem crescido substancialmente em virtude da facilidade de obtenção destas células, do grande potencial proliferativo e da capacidade de diferenciação em odontoblastos, cementoblastos e osteoblastos, o que torna vantajosa a sua utilização na regeneração óssea. Entre estas utilizações, inclui-se invariavelmente o desejo de um dia se conseguir desenvolver um dente em toda a sua complexidade [14, 15].

As células estaminais dos tecidos dentários, que hoje temos ao nosso dispor, provêm essencialmente de cinco origens distintas: da própria polpa dentária (DPSCs, do inglês *Dental pulp stem cells*), do ligamento periodontal (PDLSCs, do inglês *Periodontal ligament stem cells*), dos dentes decíduos exfoliados (SHEDs, do inglês *Stem cells from exfoliated deciduous teeth*), da papila apical (SCAPs, do inglês *Stem cells from apical papila*) e do folículo dentário (DFPCs, do inglês *Dental follicle precursor cells*) (**Figura 1.3**) [14]. Uma vez que nesta dissertação vai ser realizado um protocolo de diferenciação de células estaminais extraídas da polpa e da papila de um dente humano, as DPSCs e as SCAPs irão ser abordadas de forma um pouco mais detalhada.

Estudos desenvolvidos até hoje demonstraram que as DPSCs, isoladas pela primeira vez em 2000 por *Gronthos et col.*, são capazes de se diferenciar em células neurogênicas, condrogênicas, miogênicas e osteogênicas, apesar de se verificar uma tendência natural para se diferenciarem em células da linhagem óssea [14, 17]. A principal vantagem é que podem ser facilmente obtidas no momento da extração dentária, em consequência, por exemplo, de procedimentos ortodônticos, do tratamento da cárie dentária e da extração dos dentes do siso, sem perda considerável de vitalidade/funcionalidade [7, 18]. Um trabalho desenvolvido neste ano por *Louvrier et col.* confirmou que, de facto, é possível extrair células de dentes cariados desde

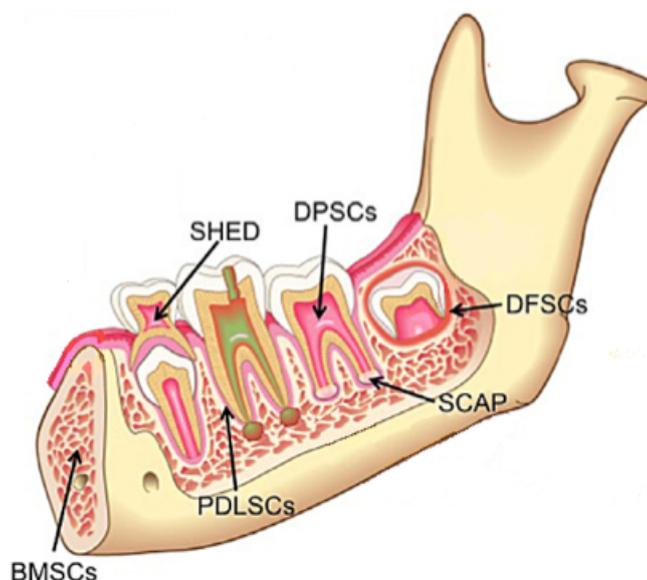


Figura 1.3: Esquema representativo das diferentes células estaminais derivadas do tecido dentário (imagem adaptada de [16]).

que a vitalidade da polpa esteja conservada [19]. No caso da sua utilização não ser imediata, podem ser criopreservadas, uma vez que conseguem manter a sua elevada capacidade de diferenciação [14].

Outro tipo de recurso celular importante, e de fácil acesso, são as células localizadas na papila apical [18]. Por se manterem unidas ao ápice da raiz dos dentes permanentes, podem ser facilmente obtidas no momento da extração dentária, constituindo uma vantagem para a sua utilização [14, 18]. As SCAPs foram isoladas pela primeira vez em 2006 por *Sonoyama et col.*, que conseguiram demonstrar a capacidade de diferenciação osteogénica, odontogénica, adipogénica e neurogénica destas células nos meios de cultura apropriados [14, 17]. Quando comparadas com as DPSCs, as SCAPs apresentam uma taxa de proliferação superior e conseguem diferenciar-se, *in vivo*, em células dentinogénicas funcionais [18].

É intuitivo que, por serem naturalmente descartadas pela substituição da dentição permanente, as SHEDs constituam uma vantagem, uma vez que não implicam métodos invasivos nem problemas éticos para a sua colheita. No entanto, uma vez que estes problemas de reabsorção óssea surgem, normalmente, numa fase mais avançada da idade, é natural que nessa altura o doente não disponha da sua dentição decídua. No que diz respeito às PDLSCs e às DFPCs, a colheita requer um método mais invasivo, comparativamente às restantes, implicando, deste modo, o consentimento do doente.

1.2.1.1 Osso Alveolar

O osso alveolar é o osso que suporta e protege os alvéolos dentários onde estão ancorados os dentes [4]. A organização básica do osso alveolar é semelhante à do tecido ósseo, sendo constituído por 65% de matéria inorgânica, 20% de matéria orgânica e 10% de água [20]. O principal componente inorgânico da matriz óssea são os cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de HA, que, devido às suas propriedades mecânicas únicas, fornece ao osso a rigidez e a força necessárias para superar a força imposta pela atividade normal. Além de desempenhar uma evidente função estrutural, o componente inorgânico também atua como um reservatório de iões que, face às atividades fisiológicas tais como a condução nervosa, a contração muscular e as reações bioquímicas, permite manter a sua concentração no fluido extracelular dentro do limiar necessário. A fase orgânica, por sua vez, é composta por proteínas fibrosas de colagénio tipo I (90%) e pelas fibras não colagénias (10%), como a osteocalcina e a osteopontina, que fornecem ao osso a flexibilidade e resistência necessárias [20].

Apesar da sua dureza e rigidez, o osso alveolar é extremamente dinâmico e metabolicamente ativo, respondendo rapidamente a estímulos que induzem processos de formação e reabsorção óssea [6]. Estes processos, por sua vez, resultam da atividade combinada dos osteoblastos e dos osteoclastos com as células osteoprogenitoras, designadas por pré-osteoblastos e pré-osteoclastos [21, 22]. Na presença de determinados estímulos, tais como fatores de crescimento, hormonas e vitaminas, os pré-osteoblastos, que têm origem nas MSC, diferenciam-se em osteoblastos, cuja principal função consiste na síntese dos componentes orgânicos da ECM [20, 21, 22, 23, 24]. À medida que realizam a sua função, os osteoblastos vão sendo rodeados pelos seus próprios produtos de secreção. Após a mineralização da ECM, os osteoblastos que ficam aprisionados no interior das lacunas passam então a serem designados por osteócitos [6, 22, 23]. Porém, se os osteoblastos entrarem num estado de quiescência, deixam de produzir matriz e atuam apenas como células de revestimento, que protegem a superfície óssea da reabsorção inapropriada (**Figura 1.4**) [20].

Os osteócitos, por apresentarem numerosos prolongamentos citoplasmáticos, comunicam com os osteócitos vizinhos através das junções gap, permitindo, assim, a difusão de substâncias metabólicas que mantêm as células e o osso envolvente saudáveis. Por outro lado, a presença de áreas da matriz danificadas pode impedir, por exemplo, que os osteócitos adjacentes recebam os nutrientes necessários à sua atividade celular, conduzindo à apoptose. O osso que circunda essa região também acaba por morrer e é rapidamente removido pelos osteoclastos, demonstrando a importância destas células na manutenção de um esqueleto saudável [6, 24].

De modo semelhante, os pré-osteoclastos, que se originam a partir das células precursoras hematopoiéticas, nomeadamente, da linha celular dos monócitos, diferenciam-se

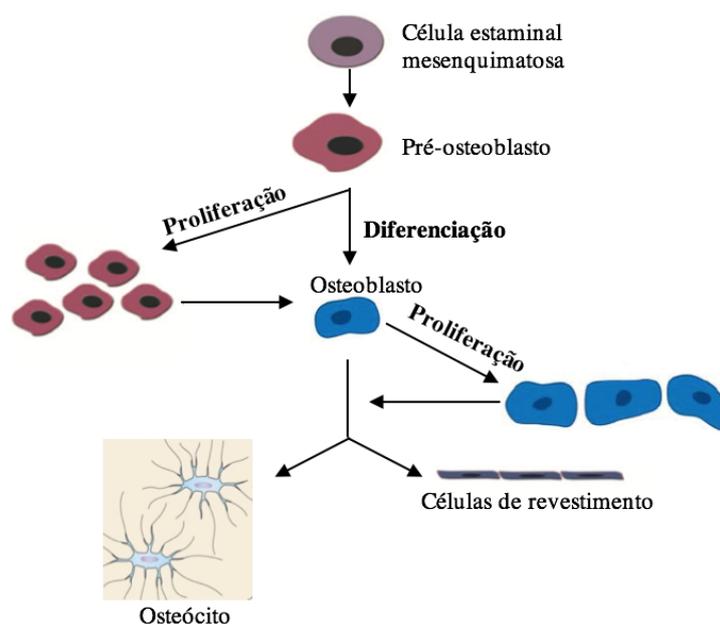


Figura 1.4: Esquema representativo da atividade das MSC na diferenciação de células ósseas (imagem adaptada de [20]).

em osteoclastos. Os osteoclastos são as células especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea, que permanentemente ocorre no interior do osso, permitindo que esteja sempre em constante remodelação [20, 24]. Deste modo, perante uma lesão óssea, os osteoclastos eliminam a matriz danificada e libertam proteínas bioativas, que recrutam os osteoblastos necessários ao processo de reparação e cicatrização [20].

Na **Figura 1.5** está representado um esquema deste processo de remodelação (formação e reabsorção) óssea.

Após o *terminus* do crescimento, o tecido ósseo continua em constante remodelação devido às solicitações mecânicas e metabólicas a que diariamente somos expostos. Como tal, torna-se fundamental que os processos de formação e reabsorção ósseas sejam estritamente complementares no tempo e no espaço, de forma a garantir a homeostasia do tecido ósseo [24].

Nas situações em que a carga excede ou não atinge um limiar específico, o processo de reabsorção pode conduzir à atrofia do osso [24]. Esta situação é particularmente evidente no osso alveolar que sofre um processo de atrofia e reabsorção como resultado da perda dentária, das doenças ósseas metabólicas, das desordens nutricionais, dos traumas e das técnicas de exodontia [25].

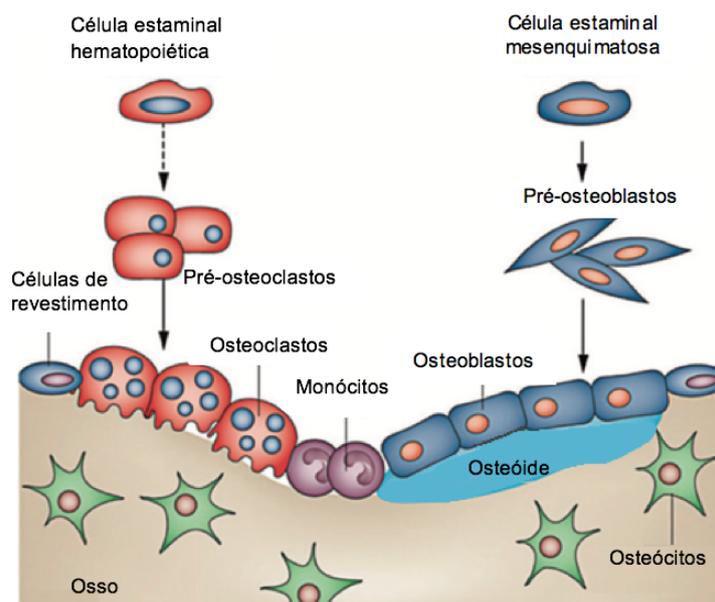


Figura 1.5: Esquema representativo do processo de remodelagem óssea (imagem adaptada de [20]).

Apesar do procedimento de extração dentária ser um dos procedimentos mais realizados em Medicina Dentária, após a realização de uma exodontia ocorrem alterações dimensionais significativas de volume ósseo alveolar. Numa revisão realizada por *Tan et col.* foi demonstrado que, 6 meses após a extração dentária, a taxa de reabsorção óssea horizontal foi de 29% a 63% e a vertical de 11% a 22%, variando de acordo com a idade do doente, o local anatômico e os vários fatores locais e sistêmicos, como por exemplo, o tabagismo [26, 27]. Outra revisão recente concluiu que a perda média horizontal e vertical, no mesmo período de tempo, foi, em média, 3,80,2 e 1,20,1 mm, respetivamente. Quanto aos efeitos imediatos após a extração dentária, um estudo conduzido por *Leblebicioğlu et col.* em 2015, demonstrou que em 77% dos 30 doentes estudados se verificaram alterações imediatas na largura do rebordo alveolar [28]. Neste sentido, as alterações morfológicas verificadas pelos diversos estudos, comprometem a posterior reabilitação implantosuportada, no sentido em que muitas vezes é necessário recuperar o volume perdido para garantir uma estabilidade e desempenho melhorados. No esquema da **Figura 1.6**, consegue-se perceber facilmente o processo de reabsorção óssea.

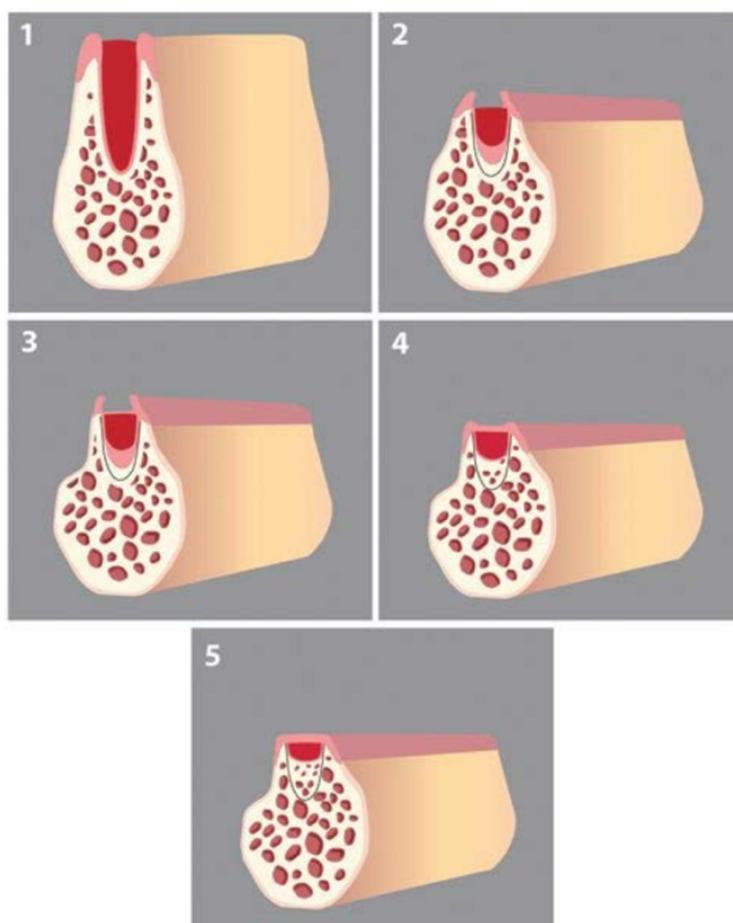


Figura 1.6: Esquema representativo dos cinco estágios da cicatrização alveolar após a exodontia (imagem adaptada de [29]).

Na primeira fase e imediatamente após a exodontia, o alvéolo é preenchido por um coágulo sanguíneo formado a partir da coagulação de glóbulos vermelhos e brancos presos na fibrina. De seguida, o coágulo é substituído por tecido de granulação, que se desenvolve em 4 a 5 dias. Na terceira etapa verifica-se a substituição do tecido de granulação pelo tecido conjuntivo, que contém fibroblastos fusiformes, colagénio e substância fundamental. Passados 15 dias da exodontia, ou seja, no quarto estágio, o alvéolo já está coberto de tecido conjuntivo e dá-se o início à calcificação dos osteóides na base do alvéolo. A quinta etapa fica então completa ao fim de 24 a 35 dias. Nesta fase a maior parte do alvéolo já está preenchido por novo osso e o mesmo é coberto. Quarenta dias após a extração do dente a atividade osteogénica começa a diminuir e, por volta da 16^a semana, o preenchimento ósseo fica completo com atividade osteogénica relativamente pequena. Após a exodontia podem-se observar alterações clinicamente visíveis, especialmente de forma horizontal [29].

Dos factos apresentados, torna-se evidente a necessidade de preservar o alvéolo, prevenindo as complicações estéticas, a perda de função e a disponibilidade óssea inadequada

que impossibilita a colocação de um implante.

1.2.2 Relação Osso/Implante

A relação entre a interface do osso e o biomaterial é, sem dúvida, determinante para o sucesso do implante. Atualmente, a principal preocupação dos médicos dentistas é, de facto, coordenar a melhor exodontia com a menor reabsorção óssea e, ao mesmo tempo, permitir a futura reabilitação. Nos casos em que não se consegue estabelecer um contacto próximo entre o osso e o implante dentário, por ausência óssea, a utilização destes implantes pode implicar que sejam necessárias técnicas cirúrgicas que permitam a sua estabilidade e o bom-funcionamento. Alguns destes métodos são a técnica de expansão óssea, a divisão do rebordo alveolar, o levantamento do seio maxilar, a distração osteogénica, as técnicas de enxerto e a regeneração óssea guiada. Por sua vez, os biomateriais utilizados nestas técnicas incluem biomateriais ósseos, como por exemplo, os autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos e enxertos aloplásticos, bem como membranas de barreira e fatores de crescimento [29, 30].

Os enxertos de osso autógeno são considerados os *gold-standard* entre todos os enxertos ósseos para regeneração óssea. Este tipo de enxerto é transplantado de um local para o outro do próprio dador e, como tal, minimiza a rejeição imunológica. O osso autógeno pode ser colhido em zonas intra-orais, como as tuberosidades maxilares ou a sínfise mandibular, ou zonas extra-orais, como a crista do osso calvário. As suas desvantagens prendem-se com a morbilidade associada ao local dador, a dor pós-cirúrgica, o risco de parestesia e as limitações na quantidade e qualidade de osso disponível [31, 32, 33].

Para evitar as complicações associadas à morbilidade do local dador são utilizados enxertos provenientes da espécie humana que não o próprio doente, os aloenxertos. Estes enxertos incluem enxertos provenientes de cadáveres humanos, desmineralizados e liofilizados (osso seco-congelado), que são cuidadosamente submetidos a longos e dispendiosos processos de descélularização e esterilização, de modo a minimizar, respetivamente, a rejeição e a transmissão de doenças. A principal vantagem da sua utilização é o facto de estarem disponíveis em grandes quantidades, no entanto, devido aos custos elevados do procedimento e à elevada taxa de reabsorção, os materiais alogénicos são limitados a pequenos e médios defeitos [31, 32]. Como estes ossos não possuem potencial osteogénico, a formação óssea requer mais tempo e origina um menor volume ósseo comparativamente ao osso autógeno. Adicionalmente, devido aos tratamentos a que são submetidos, a capacidade de osteoindução e as propriedades mecânicas do enxerto podem ser afetadas [33].

Quando os enxertos ósseos são obtidos de espécies diferentes, nomeadamente a partir de osso bovino, equino e porcino, designam-se por xenoenxertos. Por este motivo estes enxertos ósseos são uma alternativa mais barata, tendo também de ser sujeitos a um tratamento antigénico e à desativação de proteínas, permanecendo apenas a sua fase mineral

[32].

Os enxertos aloplásticos, tais como o β -fosfato-tricálcio (β -TCP), as biocerâmicas, polímeros HA, entre outros, são materiais de implante que estão disponíveis numa grande variedade de texturas, formas e tamanhos. De acordo com a sua porosidade, podem ser classificados como densos, macroporosos e microporosos; quanto à sua estrutura podem ser cristalinos ou amorfos. Estes enxertos podem ser produzidos a baixo custo, mas a taxa de reabsorção não é a ideal, pelo que o material de enxerto residual pode dificultar a osteointegração [32, 33].

Por osteointegração entende-se como a conexão estrutural e funcional entre o osso e a superfície do implante, pelo que é considerado um pré-requisito para o sucesso clínico a longo prazo [34].

A seleção do tipo de material regenerativo e/ou a membrana utilizada dependerá da anatomia e morfologia do defeito ósseo alveolar, do resultado esperado baseado em evidências científicas, das complicações associadas e das propriedades requeridas no caso clínico, nomeadamente, as propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogénicas que irão ditar o seu sucesso [30]. Neste sentido, os materiais osteocondutores são os responsáveis por estimular o recrutamento e a migração de células potencialmente osteogénicas para o local da formação da matriz e fornecer uma estrutura a partir da qual as células ósseas possam desenvolver-se. Um exemplo prático destes materiais são os polímeros, o vidro bioativo e a HA sintética e natural. Já o termo osteoindução refere-se à propriedade do material induzir a diferenciação de células indiferenciadas em direção a um fenótipo osteoblástico, aumentando a formação óssea no local. São exemplos destes materiais os fatores de crescimento e o aloenxerto ósseo. As células com potencial osteogénico, tais como os osteoblastos e as MSC, são células capazes de formar novo tecido [27].

Com efeito, dos vários enxertos aqui apresentados, o enxerto autógeno é o único que apresenta em simultâneo propriedades osteogénicas, osteocondutoras e osteoindutoras, sendo esta a sua principal vantagem [33].

De modo a colmatar as limitações individuais de cada biomaterial, vários investigadores recomendam combinar diferentes materiais para melhorar as propriedades do conjunto. Um exemplo das combinações utilizadas é a junção do osso autógeno com partículas de HA, permitindo unir as propriedades osteogénicas às propriedades osteocondutoras da HA [33]. Apesar desta conjugação ser bastante promissora, as desvantagens face à utilização dos enxertos autógenos continuam a coexistir, o que não torna a sua utilização completamente vantajosa.

Neste contexto, as limitações destas técnicas motivaram o desenvolvimento de novas estratégias baseadas na Engenharia de Tecidos (ET).

1.2.2.1 Engenharia de Tecidos

A ET é uma área multidisciplinar que combina os princípios da engenharia e das ciências vivas para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função normal de um tecido. Este campo tem vindo a ganhar especial atenção na Medicina Dentária e na cirurgia maxilofacial, solucionando os problemas da transferência de tecido autógeno, nomeadamente no que se refere à morbilidade do local dador, ao risco de parestesia e à necessidade de duas cirurgias com anestesia geral [35, 36].

O princípio básico da ET assenta sobre a tríade que envolve a combinação de células, moléculas sinalizadoras e *scaffolds* [36]. Os *scaffolds*, ou andaimes, são definidos como estruturas tridimensionais porosas que fornecem o suporte físico e o ambiente favorável à formação de novo tecido e, por isso, devem ser biocompatíveis e mecânica, química e biologicamente similares à ECM do osso humano [37]. A sua tridimensionalidade promove a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, e a sua biocompatibilidade é determinante para não desencadear nenhuma resposta imune ou rejeição pelo organismo [32, 38]. Um dos principais parâmetros que afeta a eficiência destes processos celulares é o tamanho do poro do *scaffold*. Por sua vez, os poros devem ser largos para permitir que um número suficiente de células consiga ingressar no *scaffold* e interligados para promover uma fácil difusão dos nutrientes [39]. No entanto, se por um lado a porosidade é desejada, por outro, diminui a área de superfície dos *scaffolds*. Os estudos desenvolvidos até hoje demonstraram que o tamanho mínimo de poro varia de acordo com o material constituinte do *scaffold*, contudo é consensual que uma porosidade superior a 100 μm favorece uma maior formação óssea [38]. A melhor formação óssea, em conjunto com a vascularização, é relatada para *scaffolds* com tamanho do poro superior a 300 μm [40]. Porém, o *scaffold* ideal está intimamente dependente da aplicação [37].

No caso particular da regeneração óssea, é fundamental que o *scaffold* apresente propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogénicas. Deste modo, o *scaffold* osteocondutor proporciona a estrutura física e estimula as células ósseas a crescerem na sua superfície. No processo de osteoindução, o *scaffold* osteocondutor é implantado conjuntamente com materiais osteoindutores, como os fatores de crescimento, que induzem a diferenciação celular e auxiliam no processo de cicatrização. No processo de osteogénese, o *scaffold* osteocondutor é semeado com células vivas capazes de formar osso [32].

Os materiais utilizados para a produção dos *scaffolds* devem ainda cumprir um conjunto de requisitos, entre os quais, ser biocompatíveis, bioativos e biodegradáveis com uma cinética de degradação controlada. Uma vez que o nosso projeto é uma aplicação óssea, o *scaffold* deve possuir uma resistência mecânica adequada para resistir às tensões contínuas a que o osso está sujeito [32, 37].

Com o objetivo de satisfazer os requisitos e as exigências geométricas necessárias, fo-

ram desenvolvidas várias técnicas para fabrico de *scaffolds* como, por exemplo, a formação de espumas, a lixiviação e a separação de fases. No entanto, por apresentarem algumas limitações, principalmente no que toca ao processamento de poros interconectados e ao controlo do tamanho dos poros, foram desenvolvidos métodos mais avançados que permitem um maior controlo da arquitetura interior. Recentemente foram desenvolvidas várias técnicas de prototipagem rápida (PR) tais como a estereolitografia, a sinterização laser, a impressão 3D e o processo de extrusão. Todos estes processos de PR, por estarem acoplados a um software especializado, permitem a produção em massa de *scaffolds* de geometria complexa e com maior controlo da porosidade [40].

1.2.2.2 Biomateriais

Devido à sua semelhança com a matriz mineral do tecido ósseo, o envolvimento da HA, $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ na regeneração óssea tem sido, cada vez mais, alvo de atenção por muitos autores (**Figura 1.7**). Devido às suas únicas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, têm sido desenvolvidos numerosos *scaffolds* para aplicações ósseas à base deste composto [41, 42, 43]. Todavia, apesar de ser um cerâmico bastante promissor para aplicações ósseas, a principal desvantagem da utilização da HA é o facto de apresentar baixa resistência mecânica, nomeadamente, a baixa tenacidade à fratura, que limita a sua processabilidade [37, 42, 43].

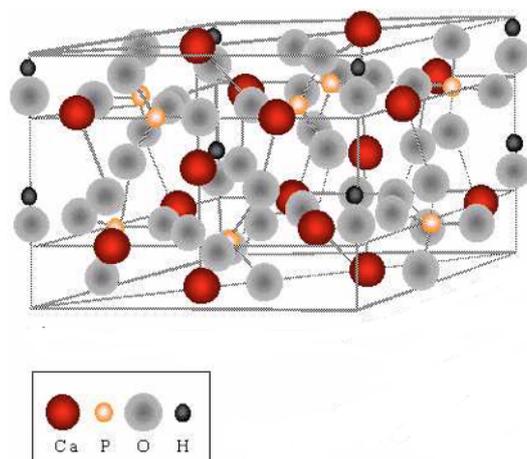


Figura 1.7: Estrutura atômica da hidroxiapatite (imagem adaptada de [44]).

Relativamente à sua origem, a HA pode ser facilmente obtida a partir de ossos de animais (hidroxiapatite xenogénica) ou então ser produzida sinteticamente, por exemplo, pelos sais precursores de cálcio e fosfato, como o óxido de cálcio e o ácido fosfórico [45].

Sabendo que a composição química do substrato é umas das características mais determinantes nos processos celulares e que, conforme mencionado, os fosfatos de cálcio têm sido os materiais de eleição na substituição óssea, o desenvolvimento da HA(S) partiu da proposição de que materiais sintéticos do mesmo material seriam biocompatíveis com o tecido ósseo, beneficiando da facilidade de obtenção e dos custos de produção. No entanto, a HA presente no osso difere da fórmula anteriormente referida. Trata-se de uma apatite deficiente em cálcio que contém uma pequena percentagem de iões carbonato (CO_3^{2-}) (3-8%) e inclui outros elementos tais como o Na^+ e o Mg^{2+} que, por desempenharem um papel crucial nos processos metabólicos do osso, podem influenciar consideravelmente o seu comportamento biológico [42, 46].

Em relação à composição e às propriedades dos biomateriais de fosfato de cálcio sintéticos, comparativamente às do osso mineral, foram publicados estudos que demonstram que a composição, estrutura e o comportamento biológico variam. Assim, enquanto que a HA(S) apresenta a estequiometria esperada, o osso mineral apresenta uma estrutura mais complexa e um menor grau de cristalinidade [46].

Para além da HA, o fosfato de tricálcio e os vidros bioativos também têm sido bastante utilizados como materiais de substituição óssea, no entanto, a preferência pela HA pode ser atribuída pela semelhança estrutural e funcional à composição mineral presente nos ossos e dentes [45].

De forma a tirar máxima vantagem das propriedades únicas da HA, vários estudos têm sido realizados com a poli(caprolactona) (PCL), um polímero aprovado pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration* como clinicamente seguro, de forma a melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas do *scaffold* de, assim, obter benefícios de cada componente, completando-se mutuamente [37, 47, 48] (**Figura 1.8**).

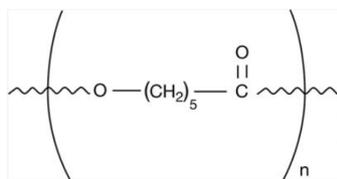


Figura 1.8: Estrutura molecular da PCL (imagem adaptada de [45]).

O polímero sintético PCL é um poliéster alifático semicristalino, biocompatível e biodegradável, que exhibe várias propriedades incomuns que os outros poliésteres alifáticos não possuem. Algumas destas propriedades estão descritas na **Tabela 1.2** [49, 48].

Tabela 1.2: Algumas propriedades da PCL.

Propriedades	Referências	
Temperatura de transição vítrea	-60°C	[49]
Temperatura de fusão	57-64°C	[49, 50]
Temperatura de decomposição	350°C	[49]

A degradação deste poliéster alifático depende do peso molecular, do grau de cristalinidade do polímero e das condições de degradação, podendo demorar entre 2 a 4 anos. Na natureza existem muitos microrganismos, como os fungos e as bactérias, que são capazes de degradar enzimaticamente a PCL por completo, contudo nos humanos o processo de degradação realiza-se em dois estágios, dada a ausência de enzimas adequadas para o efeito. Assim, no primeiro ocorre a degradação hidrolítica não enzimática dos grupos éster e no segundo, quando o polímero é mais cristalino e tem um peso molecular inferior a 3 000 g/mol, realiza-se a degradação intracelular, sendo inteiramente reabsorvida e degradada. É de referir que este primeiro estágio é similar à degradação hidrolítica *in vitro* a 40°C. Isto significa que os mecanismos de degradação da PCL podem ser atribuídos à cilivagem hidrolítica e aleatória das ligações éster, formando grupos carboxílicos (-COOH) e hidroxilo (-OH). Consequentemente, a hidrólise das cadeias provoca a diminuição do peso molecular, permitindo que os monómeros e os oligómeros se difundam e a degradação por mecanismos intracelulares ocorrerá gradualmente. Os produtos resultantes da degradação da PCL são reabsorvidos por vias metabólicas e não provocam a acidose dos tecidos circundantes [48, 49, 50, 51].

Não obstante, em comparação com outros polímeros sintéticos, a PCL apresenta boas propriedades mecânicas, pode ser facilmente processada devido ao seu baixo ponto de fusão e forma misturas miscíveis com uma ampla gama de outros produtos substitutos, tornando-se um polímero ideal para aplicações em Engenharia de Tecido Ósseo [48, 49]. Para além destas vantagens, a degradação da PCL é mais lenta do que a dos restantes polímeros sintéticos biodegradáveis vulgarmente utilizados, em particular, o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e os respetivos copolímeros. Com efeito, estas propriedades (degradabilidade controlada, miscibilidade com outros polímeros e biocompatibilidade) são a razão pela qual este poliéster tem sido profundamente estudado em *scaffolds* para ET, em aplicações de sistema de libertação de fármaco com taxas de libertação pré-determinadas, em microeletrónica, como adesivos e em embalagens [49, 50, 51].

Apesar da PCL ser um polímero muito promissor, apresenta algumas desvantagens entre as quais se realça a sua hidrofobicidade e a ausência de grupos funcionais. Com efeito, estas características contribuem para uma fraca adesão e proliferação celular, pelo que a sua utilização isolada não é propícia a aplicações de regeneração óssea. De forma a colmatar estas limitações, a combinação da PCL com a HA resulta num material compósito com

propriedades mecânicas aprimoradas pela força obtida pela fase cerâmica e pela resistência e plasticidade conferidas pela fase polimérica. A bioatividade e a osteocondutividade conferidas pela HA, potencializam a adesão e a proliferação celulares [42, 52].

Num estudo realizado por *Kim et col.* em 2010 foi comparado o potencial osteogênico de dois tipos de *scaffolds*: *scaffolds* de PCL e *scaffolds* compósitos de PCL-HA. Para tal, os dois *scaffolds* foram semeados com osteoblastos neonatais de ratos *Sprague-Dawley* e, de seguida, foram cultivados *in vitro* e implantados subcutaneamente em ratinhos atímicos BALB/c-nu, com 6 semanas. Os resultados permitiram concluir que a incorporação de HA nos *scaffolds* de PCL aumentou a resistência mecânica e o módulo de elasticidade dos *scaffolds*, o que, segundo os autores, se deve à ligação física entre a HA e a PCL durante o processo de solidificação. Neste estudo *in vitro* foi demonstrado que os *scaffolds* compósitos de PCL-HA apresentavam um potencial osteogênico superior aos *scaffolds* de PCL, devido à presença de marcadores osteogênicos na análise RT-PCR (reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa em tempo real - do inglês *Real time-polymerase chain reaction*). As experiências *in vivo* reforçaram os resultados anteriormente obtidos, pelo que foi observado que os *scaffolds* de PCL-HA induziam uma maior deposição de cálcio e formação óssea, comparativamente aos *scaffolds* de PCL. Desta forma, a combinação de cerâmicos e polímeros biodegradáveis é bastante promissora, na medida em que permite melhores propriedades mecânicas, biodegradabilidade controlável e uma maior osteocondutividade [43].

1.2.2.3 Técnicas de esterilização

Qualquer biomaterial que seja implantado no organismo deve ser previamente esterilizado ou produzido com materiais produzidos em condições estéreis. A esterilização é o processo que consiste na destruição completa da vida microbiana, incluindo bactérias, esporos, vírus e leveduras. No caso particular dos *scaffolds*, devido à inexistência de técnicas projetadas para este fim, a escolha das técnicas convencionais de esterilização estabelecidas para aplicações clínicas, nomeadamente a esterilização por autoclave, por óxido etileno, por irradiação e por plasma, tornaram-se as alternativas ideais. Na **Tabela 1.3** estão sumariadas as principais técnicas de esterilização, o nível de inativação atingido (comumente definido como alto, médio e baixo) e o espectro antimicrobiano para cada uma delas [53].

Tabela 1.3: Principais técnicas de esterilização (adaptado de [53]).

Categoria	Técnica	Nível de inativação	Microbactérias	Bactérias vegetativas	Vírus envelopados	Vírus não envelopados	Esporos de bactérias	Príões	Fungos
Calor	Autoclave	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Irradiação	Gama	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
Irradiação	Eletrões	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
Irradiação	UV	Médio	-	✓	✓	-	-	-	-
Plasma	Plasma	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Química	Óxido de etileno	Alto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Química	Etanol	Médio	✓	✓	✓	-	-	-	✓
Química	Ácido peracético	Alto	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Neste trabalho foram utilizados os métodos de esterilização por plasma, óxido etileno e radiação gama (γ), por serem os mais utilizados na clínica quando a esterilização por autoclave não é exequível. Apesar da esterilização por autoclave ser uma técnica rápida, simples e que não liberta produtos tóxicos, nem sempre pode ser aplicada. Isto verifica-se nas situações em que a temperatura de transição vítrea do material é inferior à temperatura de processamento utilizada por esta técnica, o que resulta na degradação do material [53].

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Produção dos *scaffolds*

Os biomateriais utilizados para a produção dos *scaffolds* foram a hidroxiapatite (HA) de origem natural [HA(N)] e sintética [HA(S)], e a poli(caprolactona) (PCL). A utilização de HA de diferentes origens teve como objetivo verificar se realmente existem diferenças no comportamento celular e se estas são ou não favoráveis para o sucesso do biomaterial.

Desta forma, foram utilizados três tipos distintos de *scaffolds*: *scaffolds* compostos por PCL, *scaffolds* compósitos de PCL-HA natural [PCL-HA(N)] e *scaffolds* compósitos de PCL-HA sintética [PCL-HA(S)]. Estes *scaffolds* foram produzidos no âmbito de um estudo que precede este projeto, mas por terem sido devidamente guardados e conservados, puderam ser utilizados para continuar os estudos anteriores e contribuir com mais alguns dados para desenvolvimentos futuros.

De acordo com o referido anteriormente, para a produção dos *scaffolds* foi utilizada HA de duas origens distintas: natural e sintética. A HA(S) foi adquirida à Altakitin Company (Aveiro, Portugal), com um tamanho médio das partículas de 5 μm e a HA(N) foi obtida pela calcinação de ossos bovinos a 600°C, segundo o procedimento descrito por *Figueiredo et col.* em 2010 [54]. Foi utilizada PCL Cap ($M_n = 50\,000$ g/mol), fornecida pela empresa Perstorp Caprolactones Limited (Cheshire, UK).

Para a preparação dos compósitos foi escolhida para matriz a PCL, com um reforço de partículas de HA 10 ou 25% (p/p), uniformemente distribuídas no seu interior, sintética ou natural [55]. O protocolo de preparação dos compósitos foi descrito por *Coimbra et col.* em 2017 [42].

Os *scaffolds* foram produzidos utilizando o equipamento Bioextruder, desenvolvido pelo Instituto Politécnico de Leiria. Este equipamento funciona com o *software* comercial *Matlab*, o que permitiu controlar diversos parâmetros relativos à geometria do *scaffold*, nomeadamente a distância entre os filamentos (FD – do inglês *filament distance*), a espessura da camada (ST – do inglês *Slice Thickness*), o tamanho do poro (PS – do inglês *Pore Size*) e o ângulo formado entre os filamentos que formam uma camada (**Figura 2.1**). Neste estudo, a FW e o ângulo formado entre os filamentos da camada variaram, respetivamente, entre 300 μm ou 600 μm e 0°/45° ou 0°/90°, o ST e o PS mantiveram-se fixos durante toda a produção, sendo, respetivamente 280 μm e 350 μm . No final obtiveram-se quadrados de 3×3 cm e 1 mm de espessura de cada formulação.

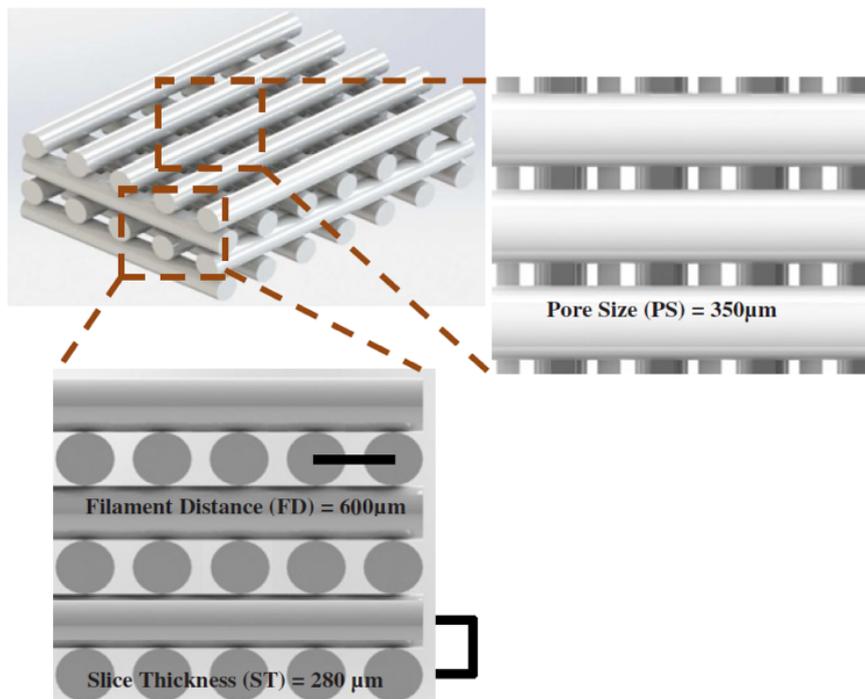


Figura 2.1: Esquema representativo de um *scaffold* com tamanho de poro de 350 μm e espaçamento entre os filamentos de 600 μm (imagem adaptada de [56]).

Na **Tabela 2.1** estão sumariados os parâmetros de geometria e composição que sofreram variações na preparação dos *scaffolds*. Estes parâmetros foram todos otimizados em estudos anteriores, a partir dos quais foi demonstrado que a quantidade de HA presente nas amostras era semelhante ao valor teórico e que nem as condições de processamento nem a adição de HA alteravam significativamente o grau de cristalinidade e a temperatura de

fusão da PCL. O procedimento experimental utilizado para a preparação e caracterização dos diferentes scaffolds foi descrito, detalhadamente, por *Coimbra et col.* em 2017 [42].

Tabela 2.1: Combinações possíveis das propriedades dos *scaffolds* e respectivas designações.

Matriz	HA(N/S)	Quantidade de HA	Espaçamento entre filamentos	Geometria	Designação
PCL	—	—	300	45	PCL-300-45
				90	PCL-300-90
			600	45	PCL-600-45
				90	PCL-600-90
	N	10	300	45	PCL-HA(N)10-300-45
				90	PCL-HA(N)25-300-45
			600	45	PCL-HA(N)10-600-45
				90	PCL-HA(N)10-600-90
		25	300	45	PCL-HA(N)25-300-45
				90	PCL-HA(N)25-300-90
			600	45	PCL-HA(N)25-600-45
				90	PCL-HA(N)25-600-45
	S	10	300	45	PCL-HA(S)10-300-45
				90	PCL-HA(S)10-300-90
			600	45	PCL-HA(S)10-600-45
				90	PCL-HA(S)10-600-90
		25	300	45	PCL-HA(S)25-300-45
				90	PCL-HA(S)25-300-90
600			45	PCL-HA(S)25-600-45	
			90	PCL-HA(S)25-600-45	

Posteriormente, os scaffolds impressos tridimensionalmente, com as dimensões de $30 \times 30 \times 1$ mm, foram cortados na forma de discos com 1 cm de diâmetro e em pequenos retângulos, de forma a puderem ser usados nos estudos *in vitro*, *in vivo* e nos ensaios de microbiologia.

2.2 Técnicas de Esterilização

No sentido de tentar impedir o desenvolvimento de contaminações microbianas/fúngicas nos estudos que nos propusemos realizar, depois de produzidos, os *scaffolds* foram esterilizados. De entre as técnicas de esterilização disponíveis, as escolhidas foram a esterilização por óxido etileno, a esterilização por plasma e a esterilização por radiação gama.

2.2.1 Esterilização por óxido etileno

A técnica de esterilização por óxido etileno é a técnica mais utilizada para esterilizar materiais e dispositivos médicos que não podem suportar a esterilização convencional por autoclave. A técnica combina a baixa temperatura com um vasto espectro de atividade antimicrobiana, o que permite inativar qualquer microrganismo (representados na **Tabela 1.3**) [53, 57]. O princípio de atuação é a alquilação irreversível das moléculas celulares que possam conter grupos amina, carboxilo, tiol, hidroxilo e amida, o que resulta na supressão permanente do metabolismo e da divisão celular [53]. O óxido etileno é um gás inflamável e explosivo que produz resíduos tóxicos. As suas principais vantagens é que decorre a baixas temperaturas, é altamente penetrante e compatível com uma ampla gama de materiais e o custo não é elevado [57].

O equipamento utilizado para este procedimento foi uma câmara 130LF Matachana, que pertence ao Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC). A câmara opera a uma temperatura entre os 37°- 55°, durante 3 h 45 min. Depois da esterilização, os *scaffolds* foram arejados com fluxo de ar quente à pressão atmosférica durante 8 h 15 min para remover o gás residual.

2.2.2 Esterilização por radiação gama (γ)

Através da radiação ionizante, em particular a radiação γ , é possível obter uma esterilização particularmente favorável por ser um método simples, rápido e barato, que não forma resíduos e pode ser facilmente monitorizado por dosimetria [53, 57]. O seu mecanismo está diretamente relacionado com as características intrínsecas da própria radiação que, dada a sua natureza, penetra no material e, como possui energia suficiente para ionizar os átomos e as moléculas dos materiais com os quais interatua, destrói os patogénios pela quebra das cadeias de ácido desoxirribonucleico (ADN). Da interação, entre os raios que passam e os eletrões orbitais dos átomos do meio atravessado, gera-se uma colisão com transferência de energia cinética (E_c). A E_c transferida provoca a ejeção dos eletrões do material que está a ser esterilizado, o que inativa os microrganismos apresentados na **Tabela 1.3** [53, 58].

O equipamento utilizado foi uma câmara de irradiação PRECISA22, do Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas (LETAL) do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa (ITN). Os *scaffolds* foram irradiados com radiação obtida a partir de uma fonte de cobalto-60 em rotação (IRIS, CTN/IST). O débito de dose¹ foi de 1,51 kGy/h e a dose acumulada foi de 25 kGy.

¹O débito de dose é definido como a quantidade de radiação à qual os *scaffolds* estiveram expostos por unidade de tempo.

Para o controlo da irradiação utilizaram-se 3 dosímetros Amber 3042 lote X (Harwell) cuja leitura da absorvância foi feita através do espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1800, Japão).

Procedimento

- As amostras foram enviadas ao ITN previamente numeradas de 1 a 20 de acordo com a ordem de produção com a bioextrusora;
- de modo aleatório, mas com um certo cuidado para seleccionar amostras com composições e geometrias diferentes, escolheram-se as amostras de *scaffolds* PCL-HA(N)25-300-45, identificada como o número 16, e PCL-600-90, identificada como o número 17, para controlos de esterilidade;
- estas amostras foram contaminadas artificialmente com 106 unidades formadoras de colónias (UFC) de *Bacillus subtilis* ATCC 6633;
- A irradiação decorreu em datas distintas para cada um dos lotes de 10 amostras.

2.2.3 Esterilização por plasma

A esterilização por plasma é uma técnica que permite esterilizar materiais termo-sensíveis. O plasma é habitualmente definido como um gás ionizado que, devido às suas propriedades únicas, é considerado o quarto estado físico da matéria [59]. O tratamento por plasma a baixa temperatura é um método altamente eficiente e seguro, que remove quaisquer contaminações sem criar nenhum subproduto tóxico. Este tipo de plasma é gerado sob condições de vácuo. Para tal, o vácuo é criado na câmara através de uma bomba de vácuo e, de seguida, procede-se à injeção do gás na referida câmara. São vários os tipos de gases que podem ser utilizados como fonte de plasma, como por exemplo O_2 , Ar, Ne, Xe, N_2 [53, 60]. No entanto, o plasma de O_2 mostra-se bastante eficaz, uma vez que produz uma grande quantidade de radicais que contribuem para o efeito da esterilização [60]. Acresce que o radical OH^- é considerado o radical mais eficaz na inativação microbiana. Já o N_2 e os gases raros como o Ar, o Xe, o Ne e o He são mais difíceis de ionizar [60]. O plasma forma-se quando o gás é sujeito a descargas pulsadas de corrente direta, por radiofrequência ou microondas, que gera espécies quimicamente reativas devido à excitação, dissociação e ionização dos eletrões. O gás é ionizado e o material fica sujeito ao tratamento por plasma, removendo os agentes contaminantes apresentados na **Tabela 1.3** [53].

O equipamento utilizado foi o *Diener Electronic - Plasma Surface Technology* (Femto, Alemanha) (**Figura 2.2**), disponível no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra (DEQ). O tempo de exposição ao plasma foi de 1 minuto e o gás escolhido foi o O_2 , a uma pressão de 0,6 mbar. Todos os materiais utilizados na manipu-

2. Materiais e Métodos

lação dos *scaffolds* foram esterilizados previamente e todos os parâmetros influenciadores da esterilização foram otimizados em estudos anteriores pelo grupo de trabalho [61, 62].



Figura 2.2: Equipamento para modificação de superfícies por plasma do DEQ.

Na **Figura 2.3** é possível observar o procedimento realizado. Foram esterilizados os discos e os pequenos retângulos de *scaffolds*, em ambas as faces, para serem, respetivamente, usados nos estudos *in vitro* e *in vivo* e ensaios de microbiologia.



Figura 2.3: Preparação da esterilização dos pequenos retângulos de *scaffolds* (a, b) e esterilização dos mesmos (c,d).

Depois de esterilizados, quer os discos quer os retângulos, foram guardados em tubos de *Falcon* estéreis de 15 ml (Sarstedt, 15 ml tube 12017 mm 62.554.502, Alemanha) previamente identificados, em ambiente desinfetado com álcool a 75°, e selados com *parafilm* (American National Can Parafilm “M” 60631, EUA).

2.3 Ensaios Microbiológicos

Para que os *scaffolds* pudessem ser utilizados *in vitro* e *in vivo*, sem o risco de aparecerem contaminações devidas ao material, foram realizados testes microbiológicos por amostragem às três esterilizações anteriormente referidas, para avaliar qualitativamente a sua eficácia.

2.3.1 Ensaio microbiológico para o método de esterilização por óxido etileno

O ensaio microbiológico realizado para comprovar a esterilização pelo método do óxido de etileno consistiu em cultivar os *scaffolds* esterilizados por este óxido em placas de meio de cultura sólido *Tryptic Soy Agar* (Oxoid, TSA Col+SB Plus 2159532, RU). Estas placas compram-se já preparadas, pelo que só foi necessário retirar cuidadosamente os *scaffolds* dos respetivos *falcons* e colocá-los nas placas devidamente identificadas. O procedimento realizou-se dentro de uma câmara de fluxo laminar, com luvas aspergidas com álcool a 75° e as manipulações efetuaram-se com a ajuda de agulhas estéreis (uma para cada tipo de *scaffold*). Os *scaffolds* foram colocados espaçadamente sobre o meio TSA nas caixas de Petri e foram mantidos a incubar numa estufa dedicada (Thermo Electron Corporation, Hera Cell 150, Alemanha) a 37°C durante 18 dias. Sempre que foi possível foram colocadas três amostras retangulares de *scaffolds* em cada placa, de maneira a garantir o número de amostras suficientes para reduzir os eventuais erros aleatórios.

Para eliminar a ocorrência de falsos-positivos e validar que o crescimento microbiano ocorreria se estivessem presentes microrganismos nas amostras, foi incluído um controlo positivo para o grupo testado. Para tal, escolheu-se um dos vários *scaffolds* não esterilizados e repetiu-se o procedimento anteriormente descrito (**Figura 2.4**).

O ensaio foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do CHUC, sob a supervisão da Patologista Clínica Dr^a Catarina Chaves.

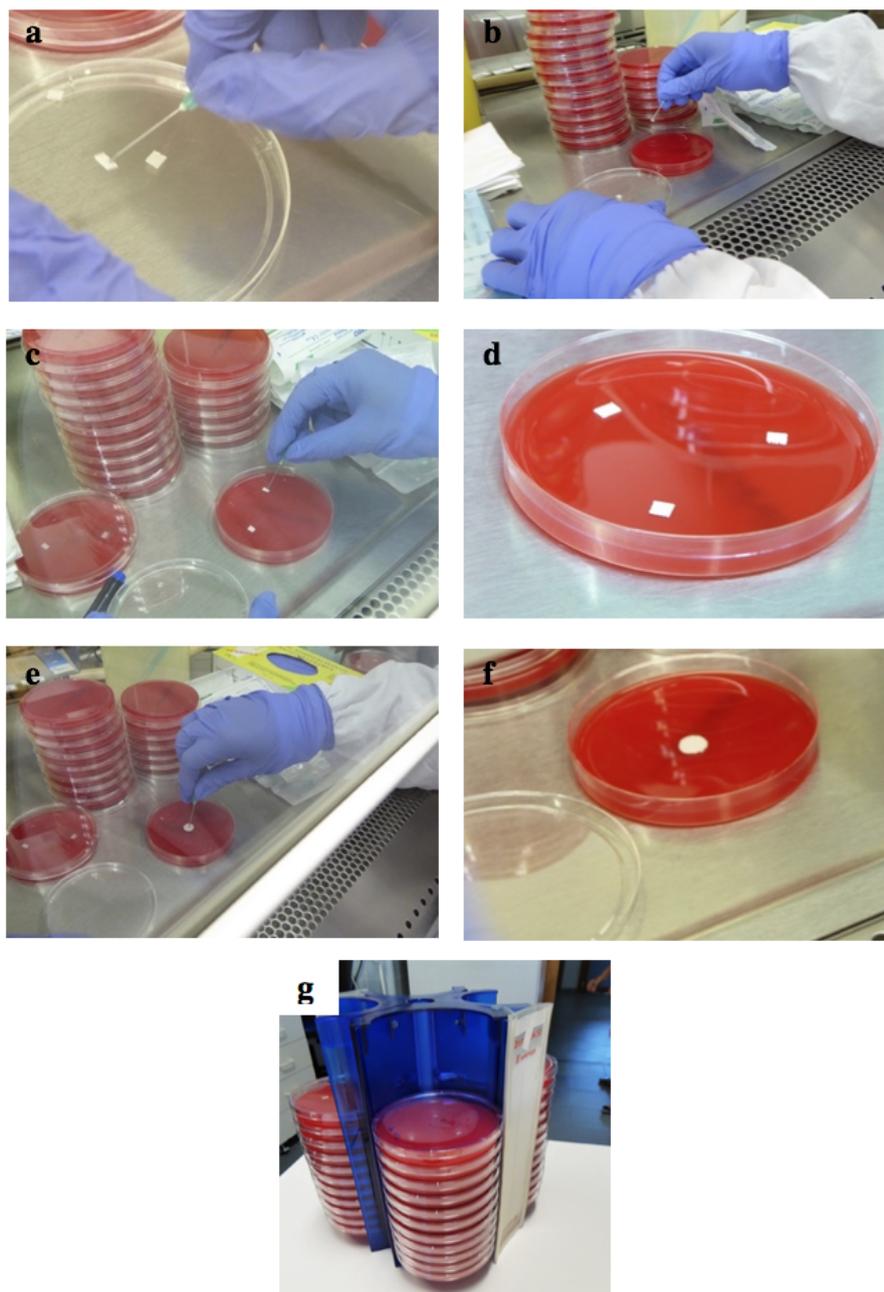


Figura 2.4: Procedimento realizado para o teste microbiológico para o método de esterilização por óxido etileno. Numa câmara de fluxo laminar, com uma agulha estéril (a), os pequenos retângulos foram cortados espaçadamente sobre as placas de meio de cultura sólido (b, c). Depois de colocadas todas as amostras do *scaffolds* em questão, a placa foi fechada (d) e o procedimento repetiu-se para as restantes amostras, quer fossem pequenos retângulos ou discos (f). Por fim, as placas foram encaixadas num suporte apropriado e foram colocadas a incubar durante 18 dias (g).

2.3.2 Ensaio microbiológico para o método de esterilização por radiação γ

O teste microbiológico realizado para confirmação da técnica de esterilização por radiação γ permite, não só, observar se o *scaffold* apresenta atividade microbiana após a irradiação, bem como se é bactericida ou bacteriostático. Após a irradiação, foram adicionados a cada uma das amostras 10 ml de meio de cultura líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB MHA000T2B, Merck Millipore, Alemanha). Seguidamente, os *falcons* foram incubados durante 21 dias, a $30^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, numa estufa dedicada (Thermo Electron Corporation, Hera Cell 150, Alemanha), para assim se observar a presença ou a ausência de crescimento microbiano. Passado o referido tempo de incubação, uma alíquota da cultura de cada amostra, colhida com uma ansa esterilizada num bico de *bunsen*, foi transferida para a superfície das placas de meio de cultura sólido TSA (Oxoid, TSA Col+SB Plus 2159532, RU) e foi espalhada sobre a superfície do meio num movimento rápido e suave, designado por método das estrias. Este método permite que as células fiquem isoladas umas das outras de maneira que, depois da incubação e no caso da presença de microrganismos, se desenvolvam colónias isoladas [63]. As placas do meio de cultura foram colocadas a incubar a uma temperatura constante de 30°C durante 24 horas. Com o objetivo de avaliar a eficiência da esterilização, foram preparados os seguintes controlos:

- **Positivo:** *falcon* com 10 ml de TBS contaminado artificialmente com 106 UFC/ml de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (por cada data de esterilização);
- **Negativo:** *falcon* com 10 ml de TBS (por cada data de esterilização).
- **Bacteriostático:** uma amostra do *scaffold* 17, irradiada a 25 kGy, foi contaminada com 10^6 UFC/amostra de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, à qual foram adicionados 10 ml de TBS;
- **Bactericida:** amostra do *scaffold* 16 à qual foram adicionados 10 ml de TBS;
- **Ambiental:** 3 placas do meio de cultura sólido TSA mantidas abertas durante todo o procedimento.

Este estudo foi realizado, em condições assépticas, numa sala limpa com a classificação ISO 5, no LETAL do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, sob a supervisão da Dr^a Sandra Cabo Verde.

2.3.3 Ensaio microbiológico para o método de esterilização por plasma

À semelhança do descrito para os ensaios anteriores, o ensaio microbiológico da esterilização pelo método do plasma permite avaliar a esterilização dos *scaffolds* sujeitos ao tratamento por plasma. Este ensaio foi realizado em conjunto com o teste microbiológico

realizado para a técnica de esterilização pelo método do óxido de etileno, pelo que o procedimento é similar. De forma a inferir sobre a validade dos ensaios foram incluídos quatro grupos de controlo:

- **Positivo:** um item da amostra do *scaffold* PCL-HA(S)10-600-45, número 10, não esterilizado, colocada sobre a placa de meio de cultura sólido;

- **Ambiental (câmara de cultura):** um item da amostra do *scaffold* PCL-HA(S)10-300-90 esterilizado por plasma e identificado com o número 11, colocada primeiro em contacto com a base da câmara de fluxo laminar e depois sobre o meio de cultura.

- **2 Controlos ambientais (laboratório):** três itens das amostras *scaffolds* PCL-HA(S)25-300-45 e PCL-HA(S)10-600-45, números 16 e 7, respetivamente, colocadas primeiro em contacto com a bancada de manipulação perto da câmara de plasma e depois sobre o meio de cultura.

2.4 Estudos *in vitro*

O comportamento biológico dos diferentes *scaffolds* foi avaliado, numa primeira fase, pela realização de testes *in vitro*, utilizando fibroblastos humanos isolados a partir de polpa dentária, em colaboração com o Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC), e os macrófagos peritoneais de rato recolhidos pelo grupo de investigação no Instituto de Biofísica da Universidade de Coimbra (IBILI).

Na tentativa de simular as características mais aproximadas à situação real num humano, os fibroblastos foram escolhidos por serem as células predominantes do tecido conjuntivo, permitindo sintetizar, segregar, modificar e degradar os componentes da matriz extracelular (ECM- do inglês *extracellular matrix*), que formará o novo tecido [8]. Faria igualmente sentido, por exemplo, utilizar-se fibroblastos da gengiva ou da mucosa do palato, pois continuam a ser fibroblastos da cavidade oral. No entanto, uma vez que a colheita destas amostras é um método invasivo, que requer anestesia local e o consentimento do doente, utilizaram-se fibroblastos da polpa devido à facilidade de obtenção das células através dos frequentes procedimentos ortodônticos e para o qual já existe um protocolo de consentimento informado. A colheita de tecidos (gengiva ou mucosa do palato) não é efetuado propositadamente, mas sim em situações muito específicas de Periodontologia ou Cirurgia Oral, não tão vulgares em Medicina Dentária. A cavidade oral possui normalmente espécies microbianas e estes doentes têm habitualmente descompensação da flora oral. A colheita de dentes segue um protocolo de desinfecção muito criterioso, que diminui a carga microbiana das amostras.

Já a escolha de macrófagos peritoneais de rato baseou-se no facto do programa de

expressão genética e proteica ser muito semelhante ao dos macrófagos humanos [64]. Com efeito, a presença de uma grande quantidade de células torna a cavidade peritoneal o local de eleição para a colheita de macrófagos [65].

Um ponto importante e comum a todos os procedimentos de cultura foi o facto de que sempre que se colocou material na câmara de fluxo laminar e na estufa de cultura, o mesmo foi aspergido com álcool a 75° para garantir uma boa desinfeção. Antes do trabalho laboratorial ser iniciado, a câmara foi devidamente limpa na véspera, a lâmpada de U.V. foi ligada por cerca de 8 h (durante a noite) e 30 - 60 min imediatamente antes do procedimento, para se obter um ambiente estéril. O fluxo manteve-se ligado durante todo o procedimento.

2.4.1 Metodologia da colheita e cultivo das células

1. Fibroblastos

Os fibroblastos foram inicialmente cultivados em frascos estéreis de 25 cm^2 para células aderentes (Corning Inc CorningFlask, 430639, EUA) e expandidos em cultura em monocamada a 37°C, numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% CO_2 (Thermo Electron Corporation, Hera Cell 150, EUA). O meio de cultura utilizado foi o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco 1x, 11966-025, RU) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – do inglês *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, F7524, EUA), 1% de L-glutamina (Biowest, L-Glutamine 100x, 200 Mm X0550-100, RU) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Lonza, Pen/Strep Amphotericin B, 100x, 17-745E, EUA), também denominado por DMEM completo. A incubação decorreu aproximadamente durante 48 h. No fim deste período as células foram observadas ao microscópio ótico de contraste de fase (MOCF) (Nikon, Eclipse TS100, Japão) e, se tivessem atingido cerca de 70% de confluência, eram tripsinizadas e transferidas para novos frascos de 25 cm^2 ou de 75 cm^2 (Corning Inc CorningFlask, 430639, EUA) (Corning Inc Costar, 430641U, EUA) conforme o número de células. Se esta situação não se verificasse, o meio era mudado para fornecer mais nutrientes às células e para retirar os produtos do metabolismo próprios do crescimento celular, que se vão acumulando e fazem mudar de cor o indicador de pH presente no meio de cultura.²

²Um dos componentes do meio de cultura é o vermelho de fenol, um indicador de pH. O metabolismo normal das células, devido à sua proliferação, gera compostos que acidificam o meio, tornando-o de alaranjado a amarelo, de acordo com a menor ou maior acidez, o que dá uma indicação visual rápida da boa progressão da cultura.

2. Macrófagos

Para os testes *in vitro* com macrófagos foi necessário, numa primeira fase, proceder à ocisão do animal por inalação de isoflurano. O isoflurano (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Isoflurine, Portugal) é um líquido à temperatura ambiente e, através do equipamento utilizado (E-Z Anesthesia, EZ 1315, Alemanha), transforma-se num gás que é inalado pelo animal e provoca, primeiro, uma anestesia indolor e, depois, overdose que leva à depressão do centro respiratório.

Após *overdose* anestésica, o animal foi aspergido com álcool a 75° e colocado dentro de uma câmara de fluxo laminar (Holten Lamin Air, HB2448, Dinamarca, certificada pela Certilab, Portugal), sobre um suporte protegido com material absorvente, em decúbito dorsal. O protocolo de colheita foi otimizado pelo grupo [66, 67]. De seguida, foram injetados cerca de 20 ml de tampão fosfato salino (PBS – do inglês *phosphate buffered saline*) numa prega da cavidade peritoneal, utilizando uma seringa de 20 ml (TSE, BD DiscarditII, 20 ml 0905, Espanha), acoplada a uma agulha 25 G (T.Terumo Neolus, 25 G5/8” 0,516mm NN-2516R, Bélgica). Nesta etapa do procedimento, foi crucial que o bisel da seringa estivesse virado para cima, para não atingir nenhum órgão desta cavidade, nomeadamente o intestino. O PBS utilizado foi preparado no laboratório, segundo o procedimento descrito no (**Apêndice .1**).

Depois da injeção de PBS, realizou-se uma massagem abdominal durante 1 a 2 min, de modo a que as células fossem atraídas mecânica e quimiotaticamente para o exterior dos vasos sanguíneos e tecidos. Com uma seringa de 1 ml (T.TerumoSyringe,U-100 insulina 1 ml SS+01H1, Bélgica), acoplada a uma agulha de 19 G (T.Terumos Neolus, 19 G1” 1.125mm NN-1925R,Bélgica), fez-se a colheita da suspensão celular composta por PBS e células sanguíneas da linhagem fagocítica, nomeadamente macrófagos, com alguns eritrócitos e plaquetas. A suspensão celular foi colocada em *falcons* estéreis de 15 ml (Sarstedt, 12017mm 62.554.502, Alemanha), os quais foram centrifugados a 1 100 rpm (rotações por min), durante 10 min a 4°C (Heraeus, Multifuge 1L-R, Alemanha, certificada pela Certilab, Portugal). Após a centrifugação, aspergiram-se os tubos com álcool a 75° e, dentro de outra câmara de fluxo laminar (Holten Lamin Air, HB2448, Dinamarca, certificada pela Certilab, Portugal), numa sala de cultura, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 1 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma, R0883, RU), suplementado com 10% de FBS (Sigma, F7524, EUA), 1% de L-glutamina (Sigma, G7513, Alemanha) e 1% de solução antibiótica com Pen/Strep (Sigma, A5955, Alemanha). O meio suplementado designa-se por RPMI-1640 completo.

A suspensão celular foi homogeneizada com uma micropipeta e foram recolhidos 10 μ l para um *ependorf* estéril de 1,5 ml (Deltalab S.L, Microtubo 20 ml Tapon Plano 4092.7N, Espanha). Fora da câmara de fluxo laminar, adicionaram-se 10 μ l de uma solução a 0,4 % de azul tripano (Sigma-Aldrich, T0776,EUA) (solução a 0,4 %),

preparado no laboratório, à suspensão do *eppendorf*. Uma alíquota desta suspensão celular, corada com azul tripano, foi colocada numa câmara de *Neubauer* (Neubauer-improved,0640030, Alemanha) para ser observada ao MOCF (Nikon, Eclipse TS100, Japão) com ampliação de 100× (**Figura 2.5**).

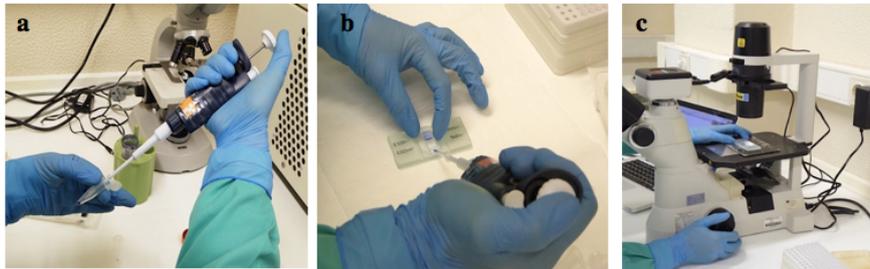


Figura 2.5: Imagens representativas do processo de adição do azul tripano à câmara de *Neubauer*. Adicionam-se 10 μ l do corante à suspensão celular (a) e coloca-se uma alíquota da suspensão corada na câmara (b) para ser observada ao MOCF (c).

O azul tripano é um corante vital diazo que permite corar seletivamente as células. Apesar do seu mecanismo de coloração se basear no princípio de que as células viáveis possuem membranas intactas, muito seletivas quanto aos compostos que as atravessam e, portanto, não absorvem o azul tripano quando íntegras, os macrófagos, como são células fagocíticas, englobam o azul tripano. Assim, neste caso particular, os macrófagos corados são os macrófagos vivos [68]. Esta etapa do procedimento foi realizada para avaliar a quantidade relativa de eritrócitos e plaquetas presentes, verificando a ausência de contaminação microbiana.

De forma a poderem separar-se os macrófagos das restantes células sanguíneas, a suspensão celular foi semeada em caixas de cultura estéreis de 6 poços para células aderentes (Corning Inc Costar®, 6 well cell Flat Bottom 3516, EUA), que foram continuadas a incubar, de um dia para o outro, a 37°C numa atmosfera humedecida e enriquecida em 5% de CO_2 . Como as células sanguíneas não são aderentes, ao contrário dos macrófagos, o meio foi aspirado dos poços, com a micropipeta mais adequada, e foram lavados com PBS estéril ajustado a pH 7,4.

Para permitir o descolamento dos macrófagos do fundo do poço, foi realizado um método mecânico. Para tal, adicionou-se 1 ml de RPMI completo a cada poço e, com um raspador estéril (Sarstedt, Cell Scraper 25 cm 83.1830, EUA), realizaram-se movimentos circulares suaves para descolar as células. A suspensão celular foi recolhida com uma pipeta de 1 000 μ l (Gilson, Pipetman Neo F144566, França), com pontas estéreis (Sarstedt, Popette tip 1000 l 70.762, Alemanha), para um *falcon* estéril de 15 ml que foi, posteriormente, centrifugado nas condições anteriormente referidas. Após a centrifugação, de novo na câmara, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 1 ml de meio de cultura RPMI completo. O teste de

viabilidade celular pelo método de exclusão do azul tripano foi novamente realizado segundo o procedimento já referido, o que permitiu determinar o número de células viáveis presentes na suspensão celular.

2.4.2 Estudos de adesão e citotoxicidade celular

Com o objetivo de observar o comportamento biológico dos diferentes *scaffolds*, foram realizados estudos de adesão celular usando os *scaffolds* como suporte para a cultura de fibroblastos, macrófagos e sua co-cultura, e estudos de citotoxicidade para avaliação da proliferação celular.

1. Monocultura com Fibroblastos

A realização dos ensaios de monocultura com fibroblastos implicou a preparação prévia de $1,3 \times 10^4$ células/ml por poço [42]. Para tal o meio foi aspirado do frasco de cultura com recurso a um pipetador automático (Gilson, pipetting Aid 08033, França), acoplado a pipetas de vidro estéreis (VWR, Pasteur Pipettes 612-107, EUA). De seguida, transferiram-se para o frasco 6 a 7 ml de uma solução de tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich, Trypsin-EDTA solution T4049-500 ml, EUA), ali-quotada no laboratório. A cultura celular de fibroblastos foi mantida a incubar numa atmosfera de 5% CO_2 /95% ar humedecido, a $37^\circ C$, durante 5-10 min, para assim ocorrer o descolamento celular que foi controlado ao MOCF. Para inativar a tripsina, dentro de uma câmara de fluxo, foram adicionados à suspensão celular 1 a 2 ml de meio DMEM completo, dependendo do volume celular. A suspensão celular foi então recolhida para *falcons* estéreis de 15 ml e centrifugada a 1 100 rpm durante 5 min a $4^\circ C$, na centrifuga anteriormente referida.

Seguindo o protocolo referido na página 33, preparam-se as amostras para determinar a viabilidade celular. Como o método do azul tripano se baseia no princípio de que as células viáveis possuem membranas intactas que excluem qualquer corante, as células vivas observadas ao microscópio são as células que não estão coradas a azul. As células mortas são permeáveis ao corante, pelo que surgem coradas a azul [69].

Assim, efetuou-se a contagem das células vivas nos quatro quadrantes da câmara de *Neubauer* e calculou-se a média do número de células vivas. Uma vez que o volume de cada quadrante é de $0,1 \text{ mm}^3$, o número total de células foi multiplicado por 10^4 . Sempre que a concentração celular foi elevada, diluiu-se a suspensão de modo a tornar a contagem mais fácil, anotando o fator de diluição a ter em conta, obrigatoriamente, nos cálculos posteriores.

Após a preparação da suspensão celular, os *scaffolds* que se pretendiam estudar foram distribuídos em caixas estéreis de 48 poços de fundo plano para células

aderentes (Corning Inc Costar®, 3548, EUA) Este procedimento foi realizado com a ajuda de uma agulha estéril 25 G (T.Terumo Neolus, 25 G5/8” 0,516mm NN-2516R, Bélgica) e requer especial cuidado, uma vez que o fluxo da câmara e as diferentes geometrias e composições dos *scaffolds* afetam a metodologia. Colocados os *scaffolds*, volta-se a homogeneizar a suspensão celular e semeiam-se, sobre cada *scaffold*, aproximadamente $1,3 \times 10^4$ fibroblastos por ml. No final, adiciona-se DMEM completo até perfazer o volume de $300 \mu\text{l}$ por poço (**Figura 2.6**).

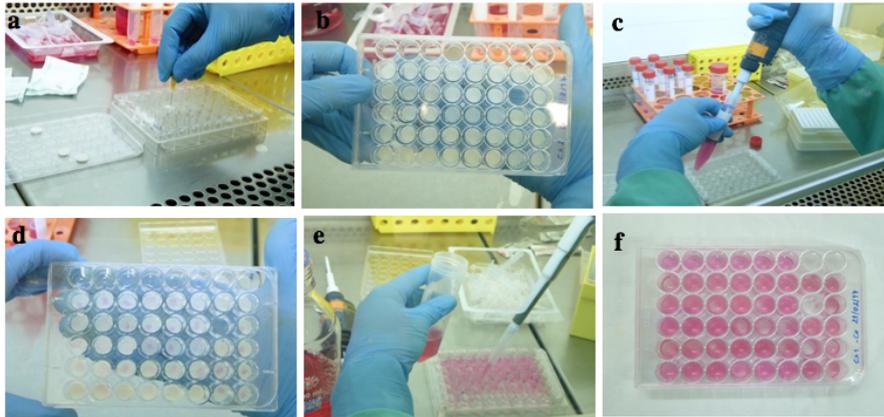


Figura 2.6: Procedimento realizado para os ensaios de monocultura com fibroblastos. Com uma agulha estéril (**a**), os *scaffolds* são colocados no interior dos poços pretendidos (**b**). De seguida, a suspensão celular é semeada sobre os *scaffolds* colocados nos poços destinados para controlos (**c,d**). Por fim, adiciona-se meio, de maneira a perfazer os $300 \mu\text{l}$ (**e**) por poço. A caixa, identificada e isolada com fita cola, está pronta a incubar (**f**).

As caixas foram posteriormente isoladas com fita cola e mantidas a incubar a 37°C , numa atmosfera humidificada com $5\% \text{CO}_2$ durante 3 ou 7 dias, dependendo da experiência [61, 62]. Em todas as experiências foram realizados triplicados para cada amostra de *scaffold*. Para garantir que o *scaffold* não exercia nenhum efeito sobre as células, os controlos realizados consistiram na adição do volume de suspensão celular pretendido e da posterior adição de meio até perfazer os $300 \mu\text{l}$. O número médio de controlos realizados nas experiências foi de 6 poços por cada caixa utilizada.

2. Monocultura com Macrófagos

Para a realização deste estudo distribuíram-se suspensões celulares com 5×10^4 células/ ml em meio de cultura nas placas acima referidas, com um volume final de 300 μ l. O procedimento foi muito semelhante ao anteriormente descrito, com a diferença de que com os macrófagos não se usa DMEM completo, mas sim RPMI completo como meio de cultura.

A cultura celular foi mantida numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO_2 , a 37°C, durante 3 ou 5 dias [61, 62].

3. Co-cultura com Fibroblastos e Macrófagos

Para a realização deste estudo foi necessária a preparação prévia de um volume de células tal que permitisse distribuir 5×10^4 macrófagos e $1,3 \times 10^4$ fibroblastos, por poço, em simultâneo em vários poços.

Como no organismo os macrófagos são as primeiras células de defesa a chegar ao local de entrada de um agente agressor, *in vitro* optou-se por recriar a mesma situação [70]. Assim, após a colocação dos *scaffolds* aos respetivos poços, primeiro foram adicionados os macrófagos e só depois os fibroblastos [61, 62]. Neste caso da co-cultura, dadas as características dos fibroblastos, que produzem fatores de crescimento que são aproveitados pelos macrófagos, foi usado DMEM completo. No final, adiciona-se meio até o volume perfazer os 300 μ l por poço e a caixa é mantida a incubar a 37°C, numa atmosfera humidificada e com 5% CO_2 durante 3 ou 5 dias [61, 62].

2.4.3 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar os efeitos dos diferentes *scaffolds* na proliferação dos fibroblastos, dos macrófagos e da coc-cultura, foi realizado o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) com o intuito de perceber se as diferentes formulações induziriam comportamentos distintos nas células.

O MTT é um teste colorimétrico quantitativo que se baseia na capacidade das mitocôndrias ativas, presentes nas células viáveis, converterem o MTT (composto de cor amarela) em cristais de *formazan* de cor azul/roxa escura, com um máximo de absorvância aos 570 nm (**Figura 2.7**). Quando as células morrem, perdem a capacidade de converter o MTT em cristais de *formazan*. Assim, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor será o sinal gerado no espectrofotómetro. Por sua vez, este sinal depende de alguns parâmetros, nomeadamente, da concentração de MTT, do período

de incubação, do número de células viáveis e da sua atividade metabólica, podendo haver alguma margem de erro devido a mitocôndrias ativas extracelulares [71].

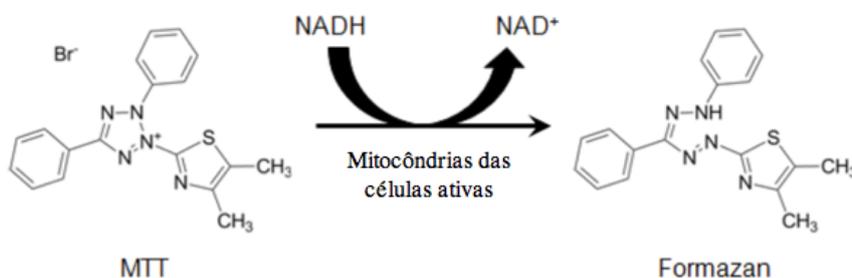


Figura 2.7: Redução do MTT a *formazan* pelas células metabolicamente ativas (imagem adaptada de [71]).

Passado o respetivo tempo de incubação, com uma micropipeta de 1 000 μl (Gilson, Pipetman Neo F144566, França) e pontas estéreis (Sarstedt, Pipette tip 1000 *mul* 70.762, Alemanha), aspirou-se o volume total do meio de cultura presente nos poços. Devido às diferentes formulações dos *scaffolds*, a ponta da micropipeta foi mudada a cada conjunto dos triplicados. De seguida adicionaram-se 270 μl de DMEM completo a todos os poços e, posteriormente, 30 μl de MTT, preparado no laboratório, (Sigma-Aldrich, M2128, EUA) (**Apêndice .2**), homogeneizando bem a mistura. As caixas, devidamente isoladas com fita cola, foram mantidas a incubar durante 4 h, a 37°C, com 5% de CO_2 .

Após a incubação, o meio voltou a ser aspirado e adicionaram-se 300 μl de uma solução de isopropanol ácido a 0,04 M, preparado no laboratório, (Sigma-Aldrich, I9516, EUA), usando as micropipetas referidas sem pontas estéreis. Como o isopropanol ácido destrói as células e dissolve os cristais azuis que se acumulam dentro destas, este procedimento pode ser realizado num ambiente não estéril.

Passados 15 min, a absorvância foi quantificada a 570 nm, com um comprimento de onda de referência de 620 nm, usando um espectrofotómetro (BioTeck, Synergy HT, EUA, certificado pela Izasa, Portugal), da FMUC. Este aparelho está acoplado a um computador PC (HP Compaq, China) com monitor HP 1755, que, por sua vez, está acoplado a um programa específico Gen 5 BioTeck.

Antes e após a realização do MTT, a adesão das células às diferentes formulações foi observada e fotografada no MOCF (com o equipamento fotográfico digital já referido).

2.5 Estudos *in vivo*

Com o objetivo de complementar alguns dos resultados obtidos *in vitro*, foram realizados estudos *in vivo* em ratos *Wistar*, de forma a observar a resposta fisiológica face

a algumas formulações e métodos de esterilização. A escolha destes animais justifica-se pelo facto de serem mamíferos que possuem uma temperatura corporal, um metabolismo fisiológico e uma elevada percentagem do código genético muito semelhantes aos do ser humano. Para além das vantagens supracitadas, é um animal fácil de criar e trabalhar e é pouco dispendioso.

2.5.1 Implantação dos *scaffolds*

Neste estudo foram utilizados 8 ratos *Wistar* do sexo masculino, com 15 semanas de idade, criados nas condições exigidas pela legislação da União Europeia em vigor, no biotério do IBILI-FMUC.³ Os *scaffolds* foram selecionados de acordo com os resultados *in vitro*, escolhendo-se uns que apresentavam resultados mais favoráveis e outros menos favoráveis. Espera-se concluir sobre os possíveis efeitos do método de esterilização e da formulação utilizados.

A abordagem adotada encontra-se representada na **Figura 2.8** e consistiu em implantar o mesmo tipo de *scaffold*, de dimensões médias de $2 \times 2,5$ mm, mas submetidos a diferentes esterilizações, nos três dos quatro quadrantes do dorso dos animais. Para todos os ratos, optou-se por implantar no primeiro quadrante o *scaffold* esterilizado por radiação γ ; no segundo quadrante, o mesmo *scaffold* esterilizado por óxido etileno; no terceiro quadrante, o esterilizado por plasma; e no quarto, apenas se iria criar a bolsa subcutânea para simular as mesmas condições cirúrgicas da implantação. Para cada animal foi ainda criada uma ficha para efetuar o registo dos procedimentos.

O procedimento cirúrgico foi efetuado dentro de uma câmara de fluxo laminar (Holtem Lamin Air, BB2448, Dinamarca, certificada pela Certilab, Portugal), sujeita a esterilização por U.V. durante a noite e durante a hora imediatamente antes da cirurgia com o fluxo e a lâmpada U.V. ligados.

Os ratos foram todos previamente pesados numa balança dedicada (Seca, 734, Alemanha), foram anestesiados, com tempos desfasados, por inalação de isoflurano. A dosagem administrada foi adequada ao peso de cada animal, para garantir uma duração anestésica durante todo o procedimento cirúrgico e no pós-operatório imediato. Sob efeito anestésico, as áreas do campo operatório foram desinfetadas com uma solução de espuma de iodopovidona (Egrema, 0670, Espanha), permitindo efetuar a tricotomia nas áreas de implantação (quatro áreas aproximadamente quadrangulares nos quatro quadrantes dorsais referidos). Depois da tricotomia, estas áreas foram novamente desinfetadas com solução dérmica de iodopovidona (Agadine, 13060029, Portugal).

³De acordo com o anexo II do Decreto-Lei Português n.º 113/2013



Figura 2.8: Esquema representativo dos campos cirúrgicos criados.

Posteriormente, o rato foi transferido para a câmara de fluxo laminar, posicionado em decúbito ventral sobre um suporte revestido com material absorvente. Nesta fase é importante referir que todos os materiais de manipulação cirúrgica não descartáveis foram sujeitos a esterilização prévia por óxido de etileno e todos os animais e materiais que entraram na câmara de fluxo laminar foram aspergidos com álcool a 75°, para garantir a melhor desinfecção possível.

Nas áreas tricotomizadas foram então feitas pequenas incisões transversais e criadas bolsas subcutâneas. À medida que cada bolsa era criada, se fosse o caso, o *scaffold* era inserido no seu interior e a incisão cirúrgica era suturada para permitir a contenção do material, a cicatrização dos tecidos e evitar a contaminação bacteriana. No fim do procedimento para os quatro quadrantes, as regiões suturadas foram de novo desinfetadas com a solução dérmica de iodopovidona. Posteriormente, o animal foi transferido para a respetiva gaiola, devidamente identificada, com um cobertor aquecido a 37°C e vigiado no pós-operatório até recuperar a consciência e beber água. O procedimento repetiu-se para todos os animais.

De maneira a controlar o progresso da resposta fisiológica, os ratos foram observados diariamente para certificar que o processo de cicatrização corria sem intercorrência e que nenhum *scaffold* era perdido/rejeitado e foram pesados semanalmente numa balança adequada (Seca, 734, Alemanha).

2.5.2 Ocisão dos Animais

Passados 30 dias, os ratos foram ocisados após *overdose* anestésica com isofluorano. Foi realizada novamente a tricotomia dos quatro campos operatórios e, por sensibilidade táctil, verificou-se a localização subcutânea do *scaffold*. De seguida, foram recolhidas amostras das regiões de tecido ocupadas pelo *scaffold* e circundantes, bem como do quadrante de controlo. As amostras foram colocadas em cassetes específicas para estudos histológicos (Thermo Fisher Scientific, PrintMateEmbedding Cassettes A84210078, EUA) corretamente identificadas de acordo com um sistema de código previamente elaborado e registado na ficha de cada animal. Cada cassette (**Figura 2.9**) foi fotografada e, de seguida, as quatro de cada animal foram colocadas dentro de um recipiente apropriado e devidamente identificado com formol neutro tamponado a 10% (Applichem Panreac, 143091.1214, Espanha) no frigorífico a 4°C.

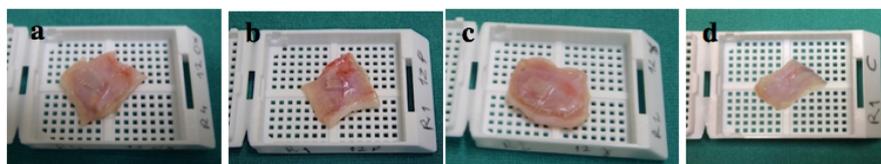


Figura 2.9: Exemplo de amostras recolhidas para a formulação PCL-HA(S)10-300-45 com a esterilização por óxido etileno (a), plasma (b), radiação (c) e controlo (d).

2.5.3 Estudo Histológico

O estudo histológico foi realizado no laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Medicina Dentária da FMUC.

Segundo o protocolo para o estudo histológico, o procedimento é constituído por um conjunto de passos fundamentais que devem ser iniciados após a obtenção das amostras, para evitar a digestão dos tecidos pelas enzimas presentes nas células, que leva à sua rápida degradação. O primeiro passo designa-se por fixação e é, sem dúvida, o mais importante para obter bons resultados. Este passo foi iniciado no momento em que as cassetes foram colocadas dentro do recipiente com formol neutro tamponado a 10%. Esta solução aquosa vai penetrar nos tecidos e substituir toda a água tecidual, protegendo e impedindo a degradação da amostra. Cada uma das amostras foi fixada a 4°C pelo menos durante 1 semana, foi seccionada a meio e foi mantida a fixar por mais 4 dias [72].

Foi iniciado depois o processo para análise histológica de rotina com inclusão em *paraplast*, uma espécie de cera com polímeros plásticos, que dá suporte de corte e estrutura ao tecido. Assim, a preparação das amostras, num equipamento adequado (Ika Labortechnik,

H5501 digital, Alemanha), começou com a desidratação dos tecidos através de sucessivas soluções alcoólicas, desde a solução de álcool a 70° até à concentração de 100°, realizando-se o que se designa por desidratação (Ensure, Ethanol absolute for analysis k46525683516, Alemanha). De seguida, o álcool a 100° foi substituído por um solvente orgânico miscível com o *paraplast*, o xilol (Sigma Aldrich, 534,056,EUA). À medida que o solvente se infiltra no tecido, este torna-se cada vez mais transparente (diafanização). De seguida, o tecido diafinizado foi transferido para o meio de inclusão, o *paraplast*, a 60°C dentro da estufa (Raypa, Drying oven 40°C, Espanha) durante a noite. O *paraplast* tem uma temperatura de fusão de 56-58°C (Sigma, P3568, EUA) e fornece à amostra a consistência rígida necessária ao arrefecer até à temperatura ambiente, para facilitar a obtenção de cortes finos. A esta temperatura de 60°C, o solvente evapora e o tecido é preenchido pelo *paraplast* no estado líquido, realizando-se o que se designa de impregnação.

Após esta fase, foi efetuada a inclusão das amostras em moldes preenchidos com *paraplast* no estado líquido, usando um equipamento dedicado (Medite, Tes 99, Alemanha). Foi vertido *paraplast* para recipientes retangulares de inox (Thermo Fisher Scientific, Mini Metal Base Mold, Leica Biosystems, EUA) e foram colocados os tecidos com a ajuda de pinça de disseção aquecida para ficarem aderentes ao fundo com a orientação apropriada para o corte. Os moldes são transferidos para uma zona arrefecida do aparelho, para endurecerem à temperatura ambiente. Os blocos endurecidos foram colocados num micrótopo (Leica, RM2155, Alemanha) e foram cortados em seções extremamente finas com 3 a 5 μm de espessura, usando facas descartáveis dedicadas (Kiato, Sterile Surgical blades carbon steel 188999108, Alemanha). Os blocos foram desbastados e, quando se via atingiu toda a superfície da amostra, os cortes histológicos foram recolhidos sob a forma de uma “ténia” de cortes sequenciais. Escolhidos os cortes, estes são estendidos numa solução alcoólica a 30% sobre uma lâmina de vidro (Knittel Glser, Star Frost Microscope slides ca. 7626 mm KO67, Alemanha) e transferidos para uma tina termostaticada de fundo escuro a 37°C com água corrente (Falc, WB-M5, Itália) Estes cortes ficam assim livres da maior parte das rugas (o *paraplast* estica devido à temperatura) e são transferidos para lâminas de vidro previamente revestidas com uma camada fina de cola biológica (Sigma Aldrich, Poly-L-Lysine solution 0.1% em água p8920, EUA), identificadas e secas em racks (Medite, 0T540.340, Alemanha). De seguida, vão novamente à estufa anteriormente indicada, durante pelo menos 24 h, para certificar que os cortes ficaram perfeitamente adrentes à lâmina [72, 73].

A coloração histológica selecionada foi a coloração de rotina Hematoxilina-Eosina. Antes de se iniciar a coloração histológica foi necessário, primeiramente, retirar o *paraplast* e hidratar os tecidos, uma vez que os corantes são aquosos. Para isso, colocaram-se as lâminas dentro de cestos de vidro compatíveis com tinas de vidro apropriadas. A sequência de tinas de vidro contém: duas com xilol, duas com álcool a 100°, duas com álcool a 96°, uma com álcool a 70° e outra com água destilada. Efetuada a desparafinização e hidratação

dos cortes, as amostras foram coradas com hematoxilina 2% (Sigma Aldrich, MHS1, EUA), lavadas com água corrente e coradas com eosina 1% (Sigma Aldrich, HT110280, EUA). Este método é baseado no princípio de que a hematoxilina cora o ADN do núcleo das células e outras substâncias acídicas, tais como porções do citoplasma ricas RNA e matriz de cartilagem em azul e roxo escuros, e a eosina cora os componentes citoplasmáticos a cor de rosa. Depois de coradas, as lâminas com os cortes histológicos passam-se novamente por álcool a 70° e refaz-se o percurso das tinas, anteriormente referido, até ao xilol. Este percurso fará com que as lâminas desidratem e fiquem em xilol, diafanizado. Para proteger os cortes e tornar a preparação histológica definitiva, os cortes histológicos corados foram protegidos com uma lamela (RS, Cover Glass 100 PCS Thickness 0,13-0,17 mm, França) colada à lâmina com uma cola sintética (meio de montagem) (Fluka, 44581, Alemanha) miscível com o xilol [72, 73].

Deixou-se secar de um dia para o outro na estufa e, retirado o excesso de meio de montagem, as preparações foram observadas à lupa ótica (Nikon, SMZ 1500, Japão) e ao microscópio ótico (Nikon, Eclipse E 600, Japão) que, por estarem associados a um sistema computadorizado com software adequado, permitiram o tratamento e registo das imagens obtidas em suporte digital.

2.6 Cultura de células primárias da polpa e da papila de dentes humanos

2.6.0.1 Metodologia de extração das células

Neste estudo foram utilizados dentes molares imaturos sem cárie para obtenção da polpa e da papila apical obtidas por extração dentária devida a tratamento ortodôntico. Imediatamente após a extração, o dente foi lavado com uma solução aquosa de etanol 70° (v/v) e com PBS. Com o auxílio de uma broca dentária estéril, iniciaram-se movimentos suaves e concisos na região entre a coroa e a raiz que permitiram abrir cuidadosamente o dente. A polpa foi extraída na sua totalidade e foi transferida para um *falcon* estéril de 15 ml com meio DMEM completo. De seguida, extraiu-se a papila apical que foi transportadas nas mesmas condições. Na **Figura 2.10** estão representados os principais passos descritos.

Este procedimento foi realizado com a colaboração do Departamento de Medicina Dentária da FMUC. Os tubos com as células foram transportadas até ao IBILI num contentor com gelo picado.

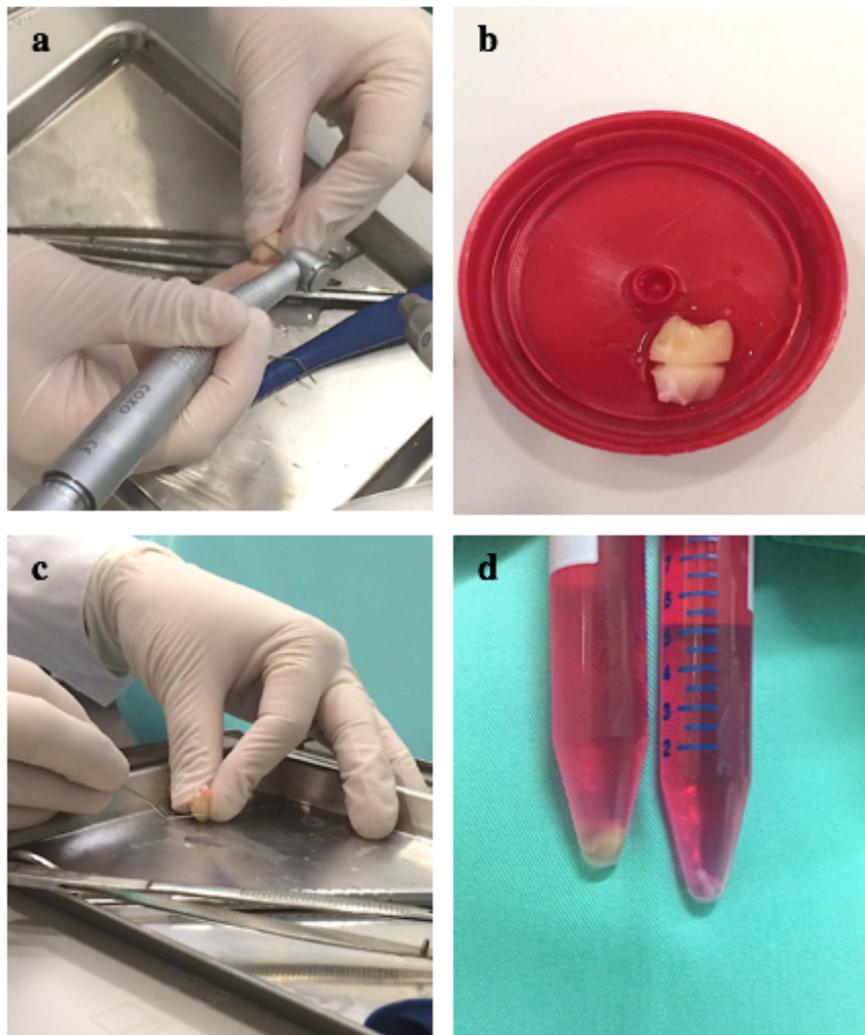


Figura 2.10: Sequência de imagens ilustrativas do procedimento da obtenção da polpa dentária a partir do dente. Com uma broca dentária abre-se, cuidadosamente, o dente (a,b), extraem-se a polpa e a papila (c) e colocam-se as mesmas em *falcons* com DMEM (d).

2.6.0.2 Meios e condições de cultivo

Em condições estéreis e com a ajuda de uma micropipeta, a polpa foi transferida do *falcon* para uma caixa de Petri de 100 mm de diâmetro (Sigma-Aldrich, P7741, EUA). Posteriormente, com uma lâmina de bisturi (Kiato, Sterile Surgical blades carbon steel 188999108, Alemanha) e uma agulha estéreis (T.TerumoNeolus, 19 G1” 1.125 mm NN-1925R, Bélgica) o tecido pulpar foi cortado em pequenos pedacinhos de 1-2 mm. Os explantes foram distribuídos por uma caixa de 6 poços (Corning Inc Costar, 6 well cell flat bottom 3516, EUA), separados uns dos outros, e sobre cada fragmento adicionaram-se, aproximadamente, 20 μ l de DMEM completo suplementado com fungizona (gibco, Fungizone Amphotericin B 250g/ml, RU). Como a cavidade oral é um local de excelência para

2. Materiais e Métodos

o crescimento de fungos, bactérias e outros microrganismos, foi adicionada a fungizona ao meio de cultura para que eliminasse qualquer fungo presente ou inibisse o seu desenvolvimento. As caixas foram posteriormente seladas com fita-cola e colocadas na estufa (Thermo Electron Corporation, Hera Cell 150, Alemanha) a uma temperatura constante de 37°C, numa atmosfera humidificada e com 5% CO_2 . No final, repetiu-se o mesmo procedimento para o tecido da papila.

As células foram observadas diariamente e, sempre que foi necessário, mudou-se o meio de cultura. Na **Figura 2.11** está representada a metodologia seguida.

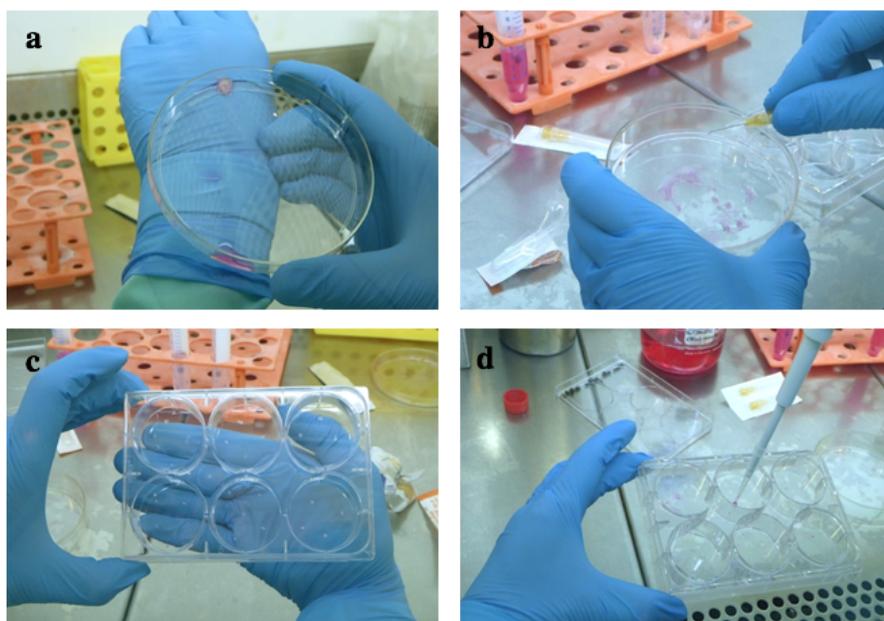


Figura 2.11: magens ilustrativas do procedimento de cultivo. A amostra de polpa (ou papila) foi transferida para uma caixa de Petri (a) e foi reduzida a pequenos fragmentos (b). Com uma agulha estéril distribuíram-se os fragmentos por uma caixa de 6 poços (c) e adicionou-se meio a cada um deles (d).

Após 6 semanas de incubação, a cultura celular do tecido da papila foi descartada, uma vez que não se observaram diferenças durante o período de incubação. Na cultura do tecido da polpa verificou-se desenvolvimento celular, retiraram-se os explantes, dissociaram-se mecanicamente as células novas e foram transferidas para um frasco de 25 cm^2 (Corning Inc CorningFlask, 430639, EUA) com DMEM completo. A cultura celular da polpa foi mantida a incubar na estufa já referida, numa atmosfera de 5% CO_2 /95% ar, a 37°C.

2.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada unicamente aos estudos *in vitro*, através do *software* de tratamento estatístico SPSS, do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*, versão 23 (IBM Corporation, Armonk, EUA).

Para esta análise foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, visto que nos permite comparar um número reduzido de amostras entre 3 ou mais grupos independentes, que não seguem uma distribuição normal.

De modo a cumprir com os objetivos deste trabalho, determinar a melhor esterilização para cada uma das formulações testadas, procedeu-se numa fase inicial à elaboração de uma tabela para cada uma das células em estudo: fibroblastos, macrófagos e a sua co-cultura. Nesta tabela foi representada a esterilização com o respetivo valor de p , que produziu os melhores comportamentos para cada uma das formulações, nos dias estudados. O critério de seleção consistiu na observação do valor da mediana de MTT e no grau de dispersão dos valores. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Contudo, como nos propusemos a avaliar a influência de muitas variáveis simultaneamente – o ângulo do filamento, a origem e o teor de HA, o espaçamento entre os filamentos e a esterilização utilizada – neste estudo, não se justificava analisar os resultados atendendo exclusivamente ao valor de p , pois comparamos várias amostras diferentes, com um número reduzido de casos.

Por este motivo, optou-se, numa fase seguinte, por se construir uma tabela dos valores máximos da mediana de MTT para cada formulação, esterilização e correspondentes dias estudados (**Apêndice .3**).

Em cada dia estudado e para cada tipo de célula (individual ou em combinação) selecionámos de todas as esterilizações, o melhor valor obtido entre as três e determinamos o valor percentual dos restantes relativamente a esse máximo.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

O presente capítulo apresentará os resultados obtidos em quatro partes principais. No primeiro subcapítulo são apresentados os resultados dos testes microbiológicos realizados para os três métodos de esterilização. Seguidamente, são apresentados os resultados dos estudos *in vitro* e, mediante estes, os *scaffolds* selecionados para testar na fase seguinte. Numa terceira parte são apresentados os resultados dos estudos *in vivo*, nomeadamente os resultados dos estudos histológicos após os 30 dias de pós-operatório e, por último, são descritos os resultados obtidos relativos à cultura primária de células da polpa e da papila de dentes humanos.

3.1 Testes microbiológicos

A principal questão que se colocou no início deste trabalho foi perceber se os métodos de esterilização aplicados permitiam a destruição dos microrganismos presentes nos *scaffolds*, de forma a garantir a esterilidade do produto. Nesta fase do estudo, a determinação da(s) espécie(s)/estirpe(s) contaminante(s) que pudesse(m) desenvolver-se, não foi realizada, uma vez que o objetivo único era certificar a eficácia da esterilização.

3.1.1 Teste microbiológico para o método de esterilização por óxido etileno

O teste microbiológico para o método de esterilização por óxido etileno foi avaliado através da incubação do material com o meio de cultura sólido *Tryptic Soy Agar*, enriquecido com a adição de sangue de ovelha. A justificação para a escolha deste meio está relacionada com o facto de ser o meio mais utilizado, em muitos países europeus, na monitorização de espécies clínicas [74]. Pela análise da **Figura 3.1** é possível observar algumas das amostras sem qualquer sinal de contaminação (**Figura 3.1 a,b,c**), comparativamente com o controlo positivo (**Figura 3.1 f**). Relativamente às **Figura 3.1 d,e**, observa-se, de facto, que o meio de cultura microbiológico tem áreas contaminadas que não envolvem os *scaffolds*. Isto significa que a contaminação teve origem num erro durante o procedimento laboratorial, como por exemplo, na manipulação da agulha para colocação dos *scaffolds*, que deixou de estar estéril, e não do processo de esterilização usado. Se a contaminação fosse resultado da ausência de esterilidade, a contaminação seria em torno do *scaffold* (como acontece no controlo positivo) e não em sítios dispersos da caixa de Petri.

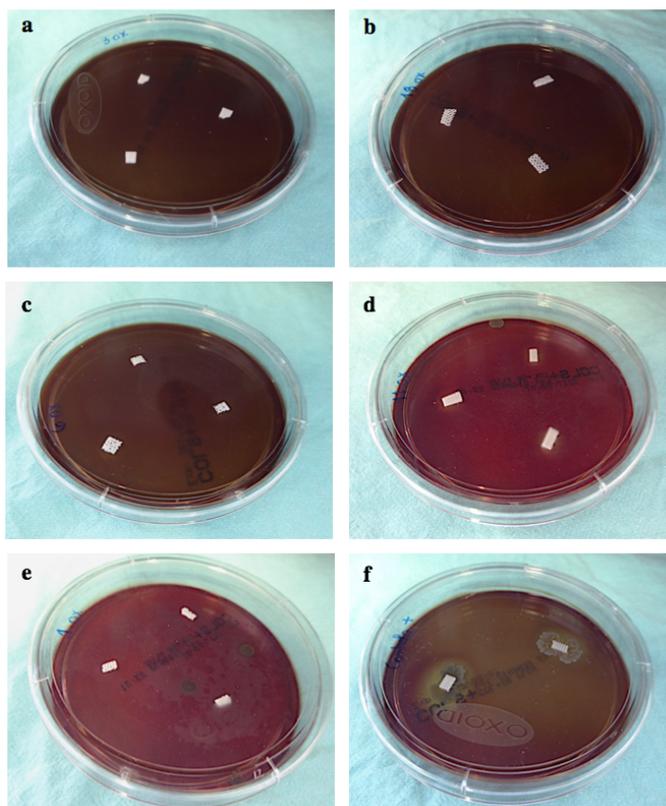


Figura 3.1: Fotografias de algumas das amostras não contaminadas (**a, b, c**), contaminadas devido a falhas no procedimento (**d,e**) e o controlo positivo (**f**).

Para as restantes amostras, nenhum dos meios apresentou quaisquer evidências de contaminação neste período de incubação. Como o procedimento foi realizado com um meio nutritivo, isto é, um meio que promove o crescimento rápido dos microrganismos e, neste caso, microrganismos frequentemente associados a patologias clínicas, se as amostras não apresentaram sinais de contaminação durante duas semanas de incubação, não é de esperar que permitam o desenvolvimento de microrganismos após 18 dias.

3.1.2 Teste microbiológico para o método de esterilização por radiação gama (γ)

As doses médias de radiação estimadas para as amostras irradiadas foram de $24,9 \pm 0,2$ kGy, que está de acordo com a dose mínima para esterilização por radiação de dispositivos médicos e produtos para cuidados de saúde, descritos pela norma ISO 11137 [75]. Os resultados obtidos nos ensaios de esterilidade estão apresentados na **Tabela 3.1**.

Neste trabalho, os *scaffolds* irradiados foram colocados em suspensão em 10 ml de meio de cultura líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB) durante 21 dias, de modo a observar se ocorria crescimento microbiano. Com base na **Tabela 3**, fazendo uma posterior comparação com os controlos positivos e negativos (um controlo positivo e negativo por cada data de ensaio), não se observou crescimento microbiano em nenhuma amostra. Não obstante, nos controlos positivos, que consistiram na indução propositada de contaminação com 10^6 unidades formadoras de colónias (UFC)/ml de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) em 10 ml de TSB, foi observada turbidez do meio de cultura, após 24 h do início da respetiva incubação, um sinal que significa a presença de crescimento microbiano.

A garantia de que o meio de cultura não apresentava quaisquer evidências de contaminação por si, foi demonstrada nos controlos negativos pela presença de um meio de cultura translúcido, que determina a ausência de crescimento microbiano.

Para avaliar que a dose de radiação aplicada garantia a inativação de uma concentração padrão de microrganismos, foram escolhidas amostras dos *scaffolds* 16 e 17 para serem contaminadas com 10^6 UFC de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e, de seguida, irradiadas. Na literatura, apesar de alguns estudos demonstrarem que o tratamento das amostras com 25 kGy remove alguns microrganismos, mas não assegura a esterilização total porque as bactérias mais resistentes como os esporos, sobrevivem até 30 kGy, está descrito que a dose de radiação de 25 kGy é a dose padrão e é a mais usada para a esterilização de produtos biomédicos, sendo suficiente para eliminar o crescimento microbiano [58]. Neste trabalho, apesar da dose de radiação mais indicada não ser consensual, a dose de 25 kGy mostrou-se muito eficaz para o fim pretendido, uma vez que nestas amostras também foi verificado ausência de crescimento microbiano.

Tabela 3.1: Tabela de resultados referentes ao ensaio de esterilização por radiação γ .

Amostras	Crescimento Microbiano	Formação de colónias
1	ND	ND
2	ND	ND
3	ND	ND
4	ND	ND
5	ND	ND
6	ND	ND
7	ND	ND
8	ND	ND
9	ND	ND
10	ND	ND
11	ND	ND
12	ND	ND
13	ND	ND
14	ND	ND
15	ND	ND
16*	ND	ND
17*	ND	ND
18	ND	ND
19	ND	ND
20	ND	ND
Controlo	Crescimento Microbiano	
Negativo	ND/ND	
Positivo	+(após 24h)/+(após 24h)	
Bacteriostático (Amostra 16)	ND	
Bactericida (Amostra 17)	+(após 24h)	
Ambiental	ND/ND/ND	

*Contaminados artificialmente e irradiados

ND: Não detetado crescimento microbiano

Para verificar que a própria amostra não irradiada por si só, não inibia o crescimento microbiano (efeito bacteriostático) característico da produção em ambiente não estéril, utilizou-se outra amostra do *scaffold* 16 não irradiada, que foi colocada em 10 ml de TSB. Neste teste não foi detetado crescimento microbiano, o que demonstra que o *scaffold* tem um efeito bacteriostático no meio. Paralelamente, efetuou-se também a avaliação do possível efeito bactericida dos *scaffolds*, ou seja, se o próprio produto provocava a morte dos microrganismos presentes. Para tal uma amostra do *scaffold* 17 irradiada, foi contaminada com 10^6 UFC/amostra de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e foi colocada em 10 ml de TSB. Da análise do resultado obtido, pode-se verificar que foi detetada a presença de crescimento bacterianos após 24 h em incubação, o que sugere que o *scaffold* não manifesta um efeito bactericida sobre o meio. Pelo contrário, se na amostra 17 irradiada não se tivesse detetado

crescimento microbiano pela observação do meio de cultura turvo, então poderia indicar um efeito bactericida do próprio material do *scaffold*.

A monitorização do ambiente em que decorreram estes ensaios também foi controlada pelas três placas de meio de cultura sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA) abertas durante todo o procedimento. Os resultados obtidos evidenciam que não foi detetado crescimento microbiano em nenhuma das placas, dados que indicam que a sala estava efetivamente limpa e que o procedimento foi realizado nas condições de esterilização e assepsia necessárias.

A ausência de crescimento microbiano foi posteriormente corroborada pela inoculação de cada amostra em meio de cultura sólido TSA, com o objetivo de avaliar a formação de colónias. Após as 24 h de incubação a 30°C, foi possível observar a ausência de colónias de microrganismos no meio de cultura sólido, que confirma a ausência de crescimento microbiano.

Assim, podemos inferir que esterilização por radiação γ foi eficaz no seu procedimento e os ensaios microbiológicos garantem esse resultado.

3.1.3 Teste microbiológico para o método de esterilização por plasma

Para avaliar a esterilização por plasma foram realizados estudos microbiológicos em meio de cultura sólido TSA, enriquecido com sangue de ovelha.

A **Figura 3.2** apresenta as imagens fotográficas de algumas amostras, nomeadamente, dois exemplos de amostras não contaminadas, o controlo ambiental do ensaio microbiológico, os controlos ambientais da esterilização e o controlo positivo. No que diz respeito às amostras não contaminadas (**Figura 3.2 a,b**) é possível observar que o ensaio de esterilidade é considerado válido, no sentido em que não foi verificado crescimento microbiano após as 18 semanas de incubação. A “nuvem” de vapor de água, evidente na **Figura 3.2 (b,d)**, deve-se à diferença de temperatura entre a sala e a estufa. Nas restantes amostras, aqui não apresentadas, os resultados foram, igualmente, de ausência de crescimento microbiano.

Sabendo que um dos principais requisitos da manipulação de um produto estéril é ter de ser obrigatoriamente manipulado em salas limpas e adequadas a todo o procedimento, o *scaffold* PCL-HA(S)10-300-90, codificado por 11* (**Figura 3.2 c**) manteve contacto direto com a base da câmara de fluxo e com a face que estabeleceu contacto voltada para baixo, foi colocado sobre o meio de cultura sólido TSA e incubado. Pela análise da **Figura 3.2 c** é possível observar que não foi detetado crescimento microbiano na amostra, o que evidencia que as condições de trabalho foram de perfeita segurança.

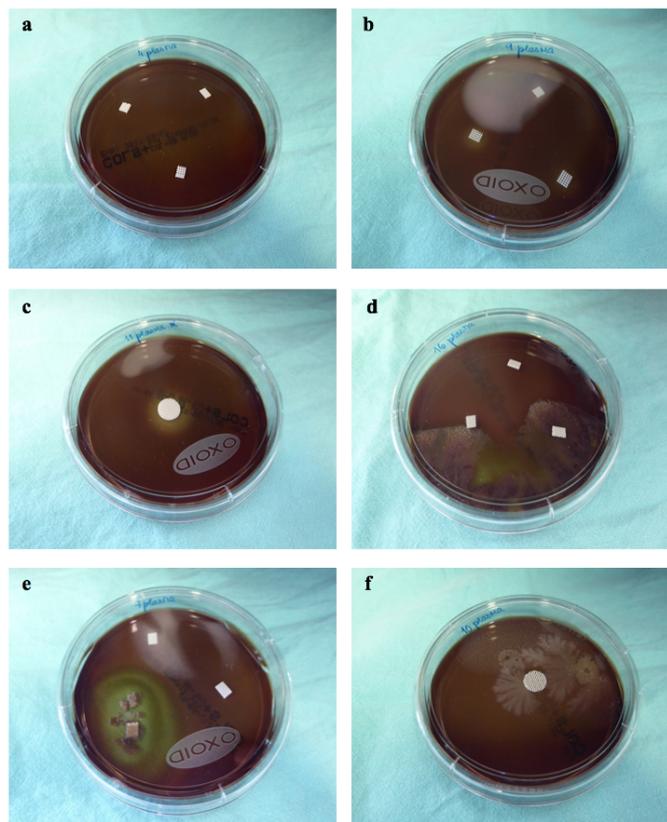


Figura 3.2: Fotografias de algumas das amostras não contaminadas (a, b), o controlo ambiental da esterilização (c), os controlos ambientais do ensaio microbiológico (d,e) e o controlo positivo (f).

Como controlo ambiental do processo de esterilização, os *scaffolds* PCL-HA(S)25-300-45 e PCL-HA(N)10-300-45, respetivamente identificados com os números 16 e 7 (**Figura 3.2 d,e**), foram esterilizados e, de seguida, colocados em contacto com a bancada de laboratório (perto da câmara de plasma). Com efeito, pela análise da **Figura 3.2 d,e**, é possível observar que, em ambas as caixas de Petri, uma das três amostras apresenta um crescimento microbiano significativo. Apesar da bancada ter sido limpa e desinfetada com álcool a 75° não é um ambiente estéril, o que explica estes resultados. A inserção dos *scaffolds* esterilizados por plasma nos tubos de *falcon* foi efetuada o mais perto do orifício de entrada do equipamento, sem tocar em nada exterior e os tubos foram roscados de imediato. No entanto, como a câmara de plasma não está inserida numa câmara de fluxo laminar, a contaminação evidente em ambas as figuras pode estar relacionada com microrganismos (bactérias, fungos, vírus) ou seus esporos presentes na bancada.

Para controlo positivo, uma amostra não esterilizada do *scaffold* PCL-HA(S)10-600-45, identificado com o número 10 (**Figura 3.2 f**), foi colocada sobre o meio de cultura sólido. Após incubação, foi verificada a presença de crescimento bacteriano, o que sugere que a esterilização por plasma foi eficaz na destruição dos microrganismos presentes nas

amostras.

Na **Figura 3.3** estão representados os casos em que a contaminação resultou de falhas técnicas durante a realização experimental. Em oposição à **Figura 3.2 d,e,f**, a **Figura 3.3 a,b,c** revela uma contaminação macroscopicamente diferente, sem estar em redor dos *scaffolds* apresentados. Esta contaminação parece indicar um erro no procedimento, como por exemplo, no manuseamento com a agulha que deixou de estar estéril.

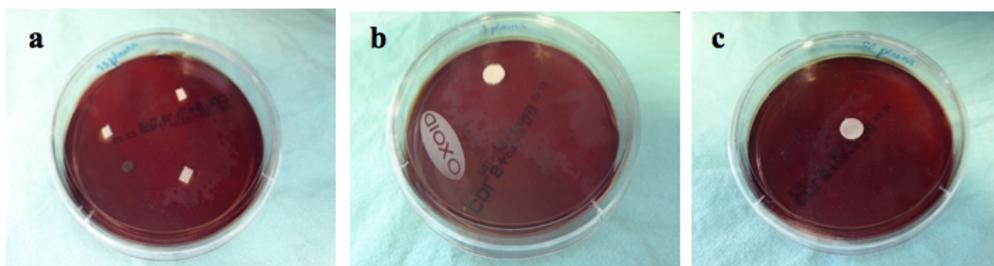


Figura 3.3: Fotografias de amostras contaminadas devido a falhas no procedimento.

De um modo geral, os resultados dos ensaios microbiológicos permitiram concluir que os três métodos de esterilização foram eficazes no seu procedimento e, por isso, pode-se dizer que o produto está em conformidade com o teste de esterilidade. Nos casos em que se observaram evidências de crescimento microbiano, foi claramente demonstrado que o teste foi inválido para causas não relacionadas ao produto, pelo que, todos os resultados estão em conformidade com o teste de esterilidade.

Assim, tendo-se verificado a esterilidade do produto, os mesmos puderam ser utilizados nos estudos *in vitro* e *in vivo* que se seguem.

3.2 Estudos *in vitro*

Os estudos *in vitro* foram realizados de modo a avaliar os efeitos biológicos das diferentes formulações de *scaffolds* esterilizados por óxido etileno, plasma e radiação γ , para posterior implantação de alguns destes num modelo animal.

Neste estudo, foram semeados, em monocultura fibroblastos e macrófagos sobre cada um dos *scaffolds*. Selecionaram-se fibroblastos pois são as principais células do tecido conjuntivo e, como tal, as que irão revestir o enxerto ósseo e dar suporte às células. Por sua vez os macrófagos são as células de defesa que irão responder face à presença/ausência de toxicidade do material a ser implantado. Os efeitos biológicos, nomeadamente a viabilidade celular, foram avaliados em diferentes períodos de tempo, recorrendo ao teste do MTT. A razão para a escolha dos tempos estudados reside no facto das células utilizadas estarem mais ou menos instituídas e com as suas funções normalizadas em diferentes tempos.

Convencionalmente, os macrófagos são as primeiras células a ser atraídas quimiotaticamente ao local cirúrgico, pelo que a sua ação terá de ser estudada nos tempos iniciais. No caso específico de algum dos *scaffolds* ser citotóxico, observar-se-iam macrófagos maiores comparativamente aos iniciais, uma vez que estes iriam fagocitar as partículas, os metabolitos e os resíduos de metabolitos tóxicos do material.

Relativamente aos fibroblastos, a sua ação normal é restabelecida plos 7 dias, razão pela qual, por exemplo, as suturas superficiais extra-orais são removidas, em média, a partir dos 7 dias [76].

A cultura de macrófagos foi avaliada, em estudos anteriores, aos 3, 5 e 7 dias, para combinar a função máxima destes com o melhor desempenho dos fibroblastos na sua co-cultura. Os resultados demonstraram que aos 3 dias os macrófagos evidenciavam o melhor desempenho, no entanto, aos 5 dias tinham uma atividade menos exuberante e aos 7 dias acabavam por morrer. Assim, os fibroblastos foram testados, em monocultura, também aos 3 dias, apesar de ainda estarem em desenvolvimento.

A co-cultura foi testada aos 3 dias tendo-se verificado que os fibroblastos não estavam maturados o suficiente para desempenharem as suas funções. Deste modo, fizeram-se estudos da co-cultura aos 5 dias. Observou-se uma resposta adequada dos macrófagos, já que são estimulam os fibroblastos a produzir mais fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF's, do inglês *vascular endothelial growth factor*) que, por sua vez, os levam a responder adequadamente no meio [77].

Por sua vez, os macrófagos ativados produzem maior quantidade de fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α) (uma citoquina pleiotrópica) que influencia positivamente quer os fibroblastos quer os macrófagos. Os macrófagos respondem aos TNF- α diferenciando-se para expressar diferentes recetores de membrana que, por sua vez, ativam a cascata de proteínas quinases mitogénicas (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) [78]. Da mesma forma, os fibroblastos são influenciados pelos TNF's, induzindo a produção de fatores de crescimento fibroblásticos (FGF's) que conduzem à sua proliferação e maturação [79]. O trabalho pretendia utilizar, ainda, células produtoras de osso, tendo-se, para tal, colhido polpa e papila dentárias no sentido de obter MSC e diferenciá-las naquelas. As células diferenciadas seriam cultivadas em monocultura, em co-cultura com macrófagos e com fibroblastos, respetivamente, e, ainda, em tri-cultura. De acordo com a literatura, os FGF's, plasma rico em plaquetas (PRP), TNF's, interleucinas (IL's), VEGF's e proteínas ósseas morfogenéticas (BMP's) influenciam a diferenciação e crescimento das células produtoras de osso [78, 79, 80, 81].

Nas **Figuras 3.4** estão representadas fotomicrografias de alguns *scaffolds* nas quais é possível observar que a arquitetura dos mesmos efetivamente varia, contudo as células disseminam-se em toda a sua estrutura.

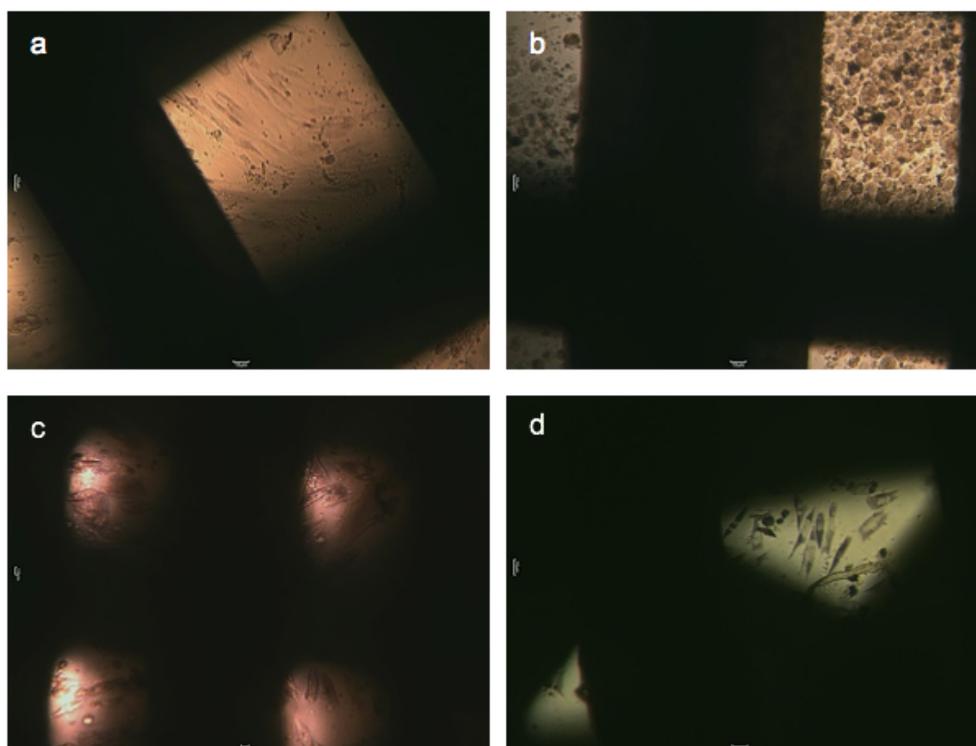


Figura 3.4: Fotomicrografias dos *scaffolds* PCL-600-90 (a), PCL-HA(S)10-600-90 (b), PCL-HA(N)25-300-90 (c) e PCL-HA(N)10-600-45 (d).

3.2.1 Monocultura de Fibroblastos

Os testes realizados em monocultura de fibroblastos tiveram como principal objetivo comparar o desempenho biológico de fibroblastos semeados sobre *scaffolds* esterilizados por óxido etileno, plasma e radiação γ , aos 3 e aos 7 dias.

Na tabela da **Figura 3.5** estão sumariadas as melhores esterilizações obtidas para cada formulação, nos diferentes tempos estudados. Pela análise desta é possível observar que as três esterilizações influenciam de modo semelhante o comportamento biológico dos fibroblastos, uma vez que nenhuma se mostrou tendencialmente melhor. Destaca-se que, para teores mais elevados de HA natural e ambos para a HA sintética, a radiação γ induz uma diminuição da viabilidade celular aos 7 dias, por comparação com os 3 dias. Uma vez que os ensaios para os 3 e para os 7 dias foram realizados nas mesmas condições, a diferença de desempenho verificada poderá estar relacionada com o grau de instituição dos fibroblastos que, segundo a literatura, é adequada a partir dos 7 dias [82]. Adicionalmente, para várias formulações existem várias diferenças estatísticas e algumas tendencialmente estatísticas, o que parece indicar que a esterilização adequada depende da formulação e do dia estudado.

Fibroblastos				
Formulação			Dias	
Material	Espaçamento entre filamentos (μm)	Ângulo ($^{\circ}$)	3	7
PCL	300	45	(p<0,096)	(p<0,057)
		90	(p<0,217)	(p<0,073)
	600	45	(p<0,005)	(p<0,077)
		90	(p<0,805)	(p<0,356)
PCL-HA(N)-10	300	45	(p<0,920)	(p<0,150)
		90	(p<0,549)	(p<0,101)
	600	45	(p<0,018)	(p<0,056)
		90	(p<0,044)	(p<0,069)
PCL-HA(N)-25	300	45	(p<1,000)	(p<0,184)
		90	(p<0,069)	(p<0,116)
	600	45	(p<0,023)	(p<0,689)
		90	(p<0,205)	(p<0,920)
PCL-HA(S)-10	300	45	(p<0,285)	(p<0,005)
		90	(p<0,038)	(p<0,229)
	600	45	(p<0,564)	(p<0,153)
		90	(p<0,037)	(p<0,513)
PCL-HA(S)-25	300	45	(p<0,023)	(p<0,840)
		90	(p<0,655)	(p<0,042)
	600	45	(p<0,094)	(p<0,038)
		90	(p<0,007)	(p<0,014)

Código de cores das esterilizações:

■ Óxido etileno ■ Plasma ■ Radiação γ

Figura 3.5: Identificação das melhores esterilizações para a monocultura de fibroblastos, para cada uma das formulações, aos 3 e 7 dias.

O gráfico da **Figura 3.6** traduz a relação entre a viabilidade celular e a técnica de esterilização usada para cada formulação. Ao valor máximo de viabilidade obtido para cada formulação foi atribuído o valor de 100%.

Da leitura da **Figura 3.6** pode observar-se que a esterilização por plasma induziu um desempenho biológico consideravelmente pior para um filamento mais espesso, sendo a formulação com PCL-HA(N)25 independente da espessura do filamento e do ângulo. Assim, foi a formulação ideal para esta esterilização. Quanto aos *scaffolds* PCL-HA(N)10-300-45 e PCL-HA(N)25-300-45, não se obtiveram diferenças consideráveis quanto à influência das técnicas de esterilização implementadas, o que está de acordo com o valor de p obtido para estas formulações (Tabela da **Figura 3.5**).

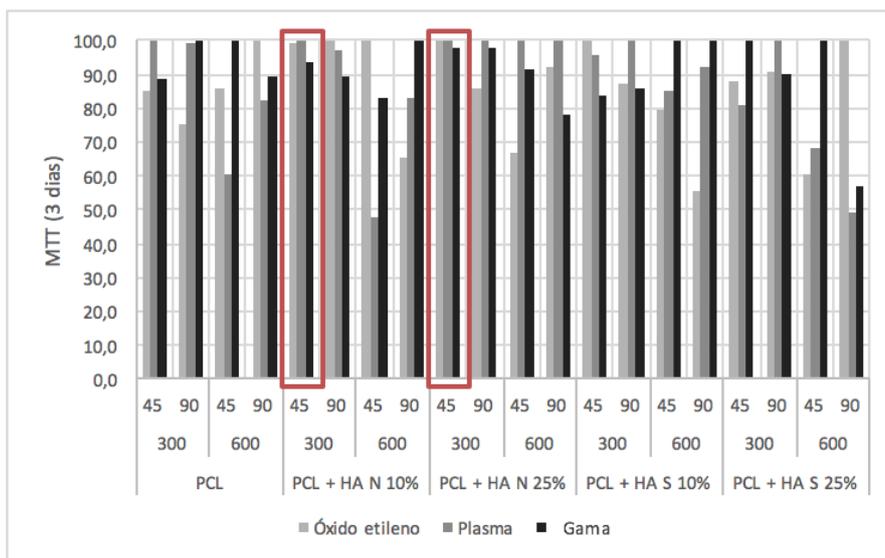


Figura 3.6: Representação gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de fibroblastos, após 3 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.

Como se pode verificar na **Figura 3.7**, quando os fibroblastos são semeados sobre os *scaffolds* PCL-300-45, PCL-600-90, PCL-HA(N)10-300-45, PCL-HA(N)25-600-45 e PCL-HA(S)25-300-45, não se constatarem diferenças de desempenho celular entre as três técnicas de esterilização.

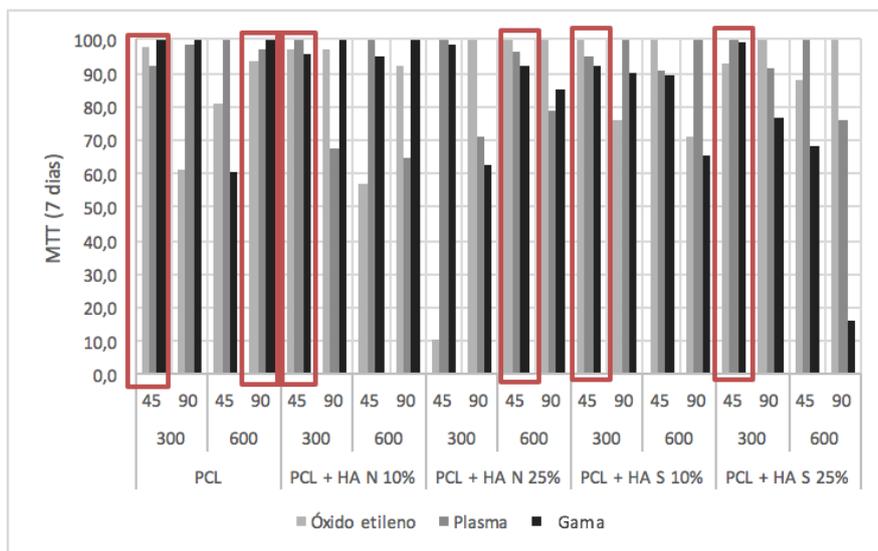


Figura 3.7: Representação gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de fibroblastos, após 7 dias do cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.

Adicionalmente, o óxido etileno parece induzir uma diminuição da proliferação celular no *scaffold* PCL-HA(N)25-600-45, comparativamente ao PCL-HA(N)10-600-45. Dadas as arquiteturas equivalentes, este facto poderá estar relacionado com o efeito biológico induzido pela maior quantidade de HA.

3.2.2 Monocultura de Macrófagos

Da tabela da **Figura 3.8**, para a monocultura de macrófagos, torna-se evidente que a esterilização por radiação γ é tendencialmente melhor comparada com as restantes técnicas. Mais uma vez, existem várias diferenças significativas entre cada formulação.

Macrófagos			
Formulação			Dias
Material	Espaçamento entre filamentos (μm)	Ângulo ($^\circ$)	3
PCL	300	45	(p<0,007)
		90	(p<0,007)
	600	45	(p<0,018)
		90	(p<0,127)
PCL-HA(N)-10	300	45	(p<0,030)
		90	(p<0,007)
	600	45	(p<0,018)
		90	(p<0,001)
PCL-HA(N)-25	300	45	(p<0,092)
		90	(p<0,024)
	600	45	(p<0,368)
		90	(p<0,050)
PCL-HA(S)-10	300	45	(p<0,116)
		90	(p<0,018)
	600	45	(p<0,021)
		90	(p<0,007)
PCL-HA(S)-25	300	45	(p<0,232)
		90	(p<0,284)
	600	45	(p<0,012)
		90	(p<0,007)

Código de cores das esterilizações:

■ Óxido etileno ■ Plasma ■ Radiação γ

Figura 3.8: Identificação das melhores esterilizações para a monocultura de macrófagos, de acordo com as formulações, aos 3 dias.

Como se pode ver na **Figura 3.9**, o *scaffold* PCL-HA(S)10 parece demonstrar um melhor comportamento *in vitro*, quando esterilizado por radiação γ . Comparando o comportamento do *scaffold* PCL-HA(N)10-300 com o PCL-HA(S)10-300, verifica-se um com-

portamento similar para os 45°, mas há uma diferença considerável entre os 90°. Da mesma forma, PCL-HA(N)10-600-90 tem comportamento semelhante a PCL-HA(N)25-600-45 e PCL-300-90 com PCL-600-45.

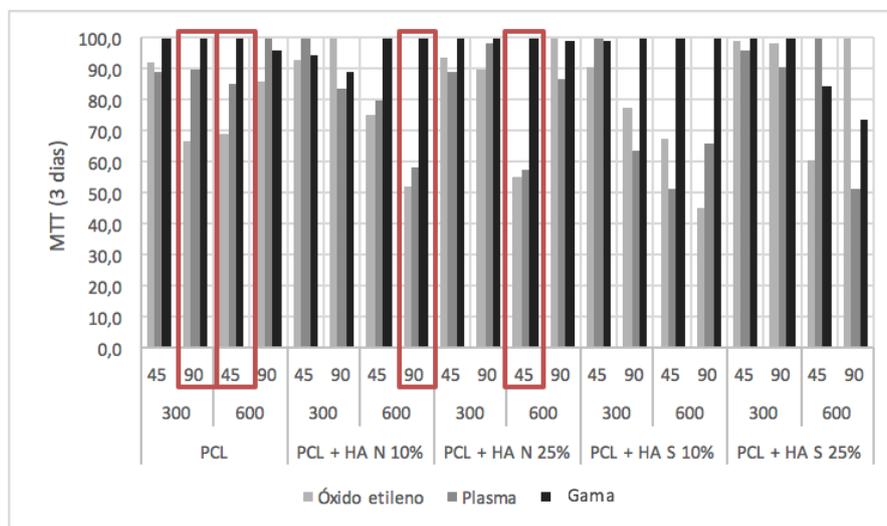


Figura 3.9: Representação gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de macrófagos, após 3 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.

Adaptando da literatura consultada, a justificação para os macrófagos estarem mais ativos, quando as formulações são sujeitas ao tratamento por radiação γ , poderá estar relacionada com o facto de esta induzir a quebra das cadeias, promovendo o estabelecimento de ligações cruzadas. Assim, este novo arranjo químico pode ser mais propício à ação dos macrófagos, comparativamente às restantes técnicas [75, 83].

3.2.3 Co-cultura de fibroblastos e macrófagos

A análise da tabela da **Figura 3.10** mostra, indubitavelmente, que os resultados obtidos são tendencialmente melhores para a esterilização por plasma aos 5 dias. Comparando com a tabela da **Figura 3.8**, pode inferir-se que, na co-cultura, os fibroblastos são mais influenciados pela esterilização realizada do que os macrófagos. Os valores da tabela revelam que existem várias diferenças estatisticamente significativas entre eles, o que sugere que a esterilização a usar depende da formulação.

A análise da **Figura 3.11** mostra que existem diferenças consideráveis entre os métodos de esterilização para o *scaffold* PCL-600-90 e PCL-HA(S)10-600-90, corroborada pelos valores de p (tabela da **Figura 3.10**). Para estes casos, a esterilização por radiação γ é definitivamente a mais vantajosa em termos de indução dos melhores comportamentos

celulares. Relativamente ao *scaffold* PCL-300-45 e PCL-300-90, observa-se que o comportamento das três esterilizações é bastante similar e, por isso, os valores de p (tabela da **Figura 3.10**) também são muito próximos. Da mesma forma, pode concluir-se que, para os *scaffolds* com máxima espessura do filamento e ângulo de 90°, a esterilização por plasma não é tão vantajosa em comparação com filamentos menos espessos. É ainda de referir que, para o *scaffold* PCL-HA(N)25-600-90, a utilização da esterilização por plasma ou radiação γ revela comportamentos análogos, no entanto, terá de se aumentar o número de amostras por formulação para se poder inferir uma tendência.

Co-cultura				
Formulação			Dias	
Material	Espaçamento entre filamentos (μm)	Ângulo ($^\circ$)	3	5
PCL	300	45	(p<0,007)	(p<0,066)
		90	(p<0,049)	(p<0,027)
	600	45	(p<0,015)	(p<0,061)
		90	(p<0,088)	(p<0,099)
PCL-HA(N)-10	300	45	(p<0,019)	(p<0,039)
		90	(p<0,032)	(p<0,733)
	600	45	(p<0,025)	(p<0,252)
		90	(p<0,058)	(p<0,280)
PCL-HA(N)-25	300	45	(p<0,292)	(p<0,066)
		90	(p<0,007)	(p<0,430)
	600	45	(p<0,014)	(p<0,051)
		90	(p<0,024)	(p<0,177)
PCL-HA(S)-10	300	45	(p<0,021)	(p<0,061)
		90	(p<0,116)	(p<0,491)
	600	45	(p<0,029)	(p<0,027)
		90	(p<0,007)	(p<0,027)
PCL-HA(S)-25	300	45	(p<0,025)	(p<0,252)
		90	(p<0,032)	(p=1)
	600	45	(p<0,012)	(p<0,066)
		90	(p<0,007)	(p<0,177)

Código de cores das esterilizações:

■ Óxido etileno ■ Plasma ■ Radiação γ

Figura 3.10: Identificação das melhores esterilizações para a co-cultura de macrófagos e fibroblastos, para cada uma das formulações, aos 3 e 5 dias.

De uma forma geral, a análise da **Figura 3.12**, revela que a esterilização por plasma foi a que produziu melhores comportamentos *in vitro*, seguida da esterilização por radiação γ e, por fim, óxido etileno. Os *scaffolds* PCL-HA(N)10-600-45 e PCL-HA(S)10-600-90 apresentam um comportamento bastante similar para as três esterilizações, contudo o primeiro apresenta uma resposta *in vitro* ligeiramente superior. Para os *scaffolds* PCL-HA(S)25-600-45 e PCL-HA(S)25-600-90, o comportamento *in vitro* também é similar, podendo significar que, para a co-cultura, para a mesma formulação, os ângulos da mesma não exercem uma influência considerável na resposta biológica. Este facto também se verifica para os *scaffolds*

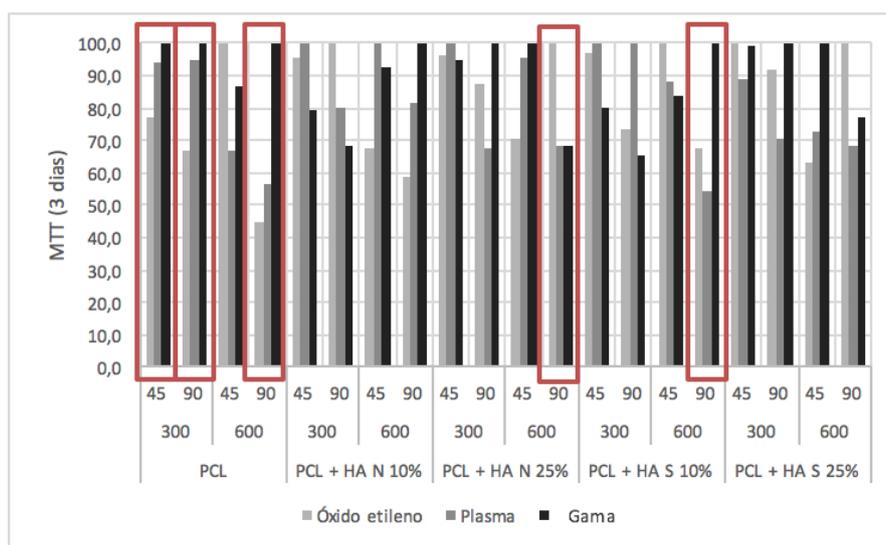


Figura 3.11: Representação gráfica do efeito da esterilização na adesão e proliferação celulares de co-cultura de macrófagos e fibroblastos, após 3 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.

PCL-HA(N)25-600-45 e PCL-HA(N)25-600-90 que, não só são mutuamente semelhantes, como revelam um comportamento muito próximo dos *scaffolds* PCL-HA(S)25-300-45 e PCL-HA(N)10-600-90, respetivamente. No que concerne aos *scaffolds* PCL-HA(S)10-600-90 e PCL-HA(N)10-600-90, a esterilização por plasma mostra-se, indiscutivelmente, a mais promissora. Por último, destaca-se o facto da esterilização por plasma e a radiação γ revelarem um comportamento celular equivalente, obtendo-se um valor de $p=1$. Contudo, com uma maior número de amostras é de esperar que a esterilização por plasma se destaque, de acordo com a tendência observada na tabela da **Figura 3.10**.

A diferença observada entre a influência biológica de cada esterilização para cada formulação, nos respetivos dias, poderá estar relacionada com a influência recíproca entre fibroblastos e macrófagos, reconhecida pela literatura. Tal como anteriormente referido, e dados os comportamentos obtidos em monocultura, os fibroblastos parecem ser o tipo celular mais dependente do tipo de esterilização (tabelas das **Figuras 3.5 e 3.8**). Estes fatores, em conjunto com uma maior funcionalização dos fibroblastos aos 5 dias, poderão explicar a tendência acentuada que se verifica para o melhor desempenho para a esterilização por plasma, em comparação com os 3 dias. Acresce que a esterilização por plasma de oxigénio pode induzir modificações na superfície dos *scaffolds*. O bombardeamento da superfície com átomos de O_2 induz a criação de espécies reativas que tornam a superfície mais hidrofílica, promovendo, assim, os processos de adesão e migração celular.

De um modo geral, nada se pode concluir em relação à influência de cada um dos parâmetros variados, a saber, o ângulo de contato, o espaçamento entre os filamentos, o

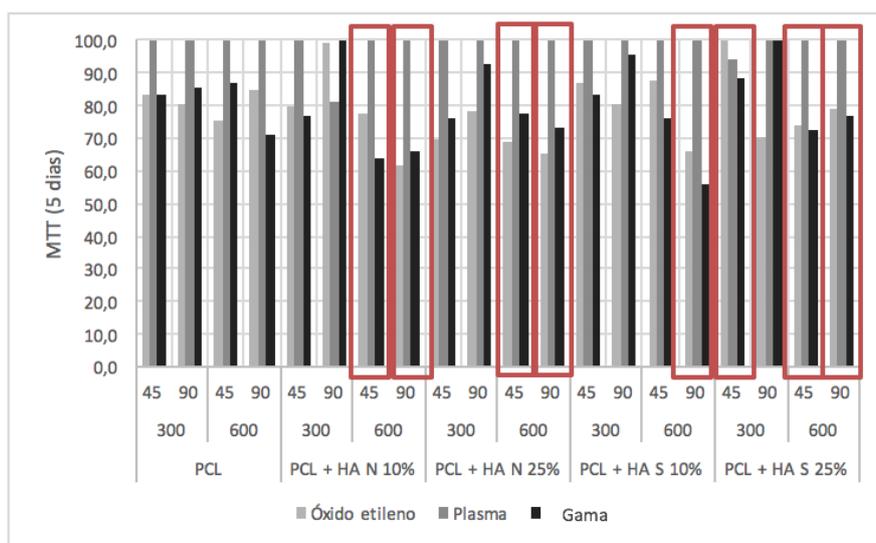


Figura 3.12: Representação do efeito da esterilização na adesão e proliferação celular de co-cultura de macrófagos e fibroblastos, após 5 dias de cultura. Os resultados expressam a diferença percentual relativamente ao máximo de viabilidade obtido para cada formulação.

reforço do *scaffold*, origem e a percentagem desse reforço. A divergência dos resultados, quer em monocultura quer em co-cultura, mostra o quanto os comportamentos celulares dependem da esterilização, da formulação, do tipo de células (individual ou em combinação) e dos dias estudados.

3.3 Estudos *in vivo*

Com o objetivo de estudar o comportamento de alguns *scaffolds*, foram realizados estudos *in vivo* que incluíram a implantação de um determinado tipo esterilizado pelas três técnicas já referidas, em três dos quatro quadrantes matemáticos do dorso de ratos *Wistars*. O quadrante sobranete foi utilizado como controlo do próprio animal, para assegurar que o procedimento cirúrgico não influenciaria a resposta à presença dos *scaffolds*, validando assim o procedimento.

Neste estudo em particular, optou-se sempre por seguir a mesma distribuição dos materiais esterilizados nos animais, segundo o padrão mencionado na página 40, apenas para facilitar a identificação dos mesmos durante todo o procedimento.

Assim foram testadas 5 formulações de *scaffolds*, sendo que três delas obtiveram, em média, bons resultados *in vitro* pelo menos para duas esterilizações - PCL-HA(N)25-300-90, PCL-HA(S)10-300-45 e PCL-HA(S)25-300-90 - e duas menos favoráveis - PCL-HA(S)25-600-90 e PCL-HA(S)25-600-90, como se verifica nas **Figuras 3.11 e 3.12**.

Apesar da utilização de um modelo animal experimental ser uma mais valia na extrapolação dos resultados, antes de avançar para os testes na espécie humana, as implicações e questões éticas envolvidas neste procedimento devem ser criteriosamente pensadas. Neste sentido, a escolha deve ter sempre presente o princípio dos 3R's que inclui três regras básicas: Substituição, do inglês *Replacement*; Redução, do inglês *Reduction* e Refinamento, do inglês *Refinement*. A substituição refere-se à utilização de métodos alternativos de investigação que não envolvam organismos vivos. Redução significa utilizar a quantidade de animais mínima que permita obter resultados igualmente credíveis. Por sua vez, Refinamento refere-se ao aperfeiçoar de todos os processos envolvidos durante o procedimento e de pessoal bem treinado e credenciado, de forma a evitar erros que comprometam o bem-estar animal, bem como impliquem uma utilização excessiva [84].

De forma a cumprir estes princípios, vários fatores foram tidos em consideração, previamente à realização do trabalho prático. O modelo animal utilizado foi escolhido dada as suas semelhanças genéticas e fisiológicas com a espécie humana, permitindo, assim, extrapolar os resultados para o ambiente clínico. O procedimento de distribuir o mesmo *scaffold* no dorso do animal, mas esterilizado pelas diferentes técnicas, teve por finalidade única diminuir o número de animais utilizados, respeitando assim um dos princípios referidos. Por fim, a facilidade de criação, os custos reduzidos de manutenção e a experiência de profissionais bem treinados e credenciados que integram este grupo de investigação foram fatores igualmente determinantes para a nossa decisão sobre o rato *Wistar* como modelo animal a usar.

Dada a intenção de uma aplicação óssea, numa primeira fase do estudo, os *scaffolds* foram implantados no tecido subcutâneo dos ratos, uma vez que este tecido contém todos os elementos básicos do tecido conjuntivo, possui maior taxa de metabolismo relativamente ao osso e é vascularizado. Estas propriedades enumeradas são cruciais nesta fase inicial, pois permitem identificar mais facilmente as respostas imunológicas à matriz implantada antes da implantação óssea [85].

3.3.1 Observações clínicas após implantação dos *scaffolds*

Após a implantação dos *scaffolds*, os animais foram colocados numa sala de recobro, cobertos por um material termo-isolante e foram mantidos na mesma disposição das gaiolas para evitar agressões que, direta ou indiretamente, pudessem induzir eventuais traumatismos na recuperação pós-cirúrgica. No fim do efeito anestésico, foi verificado que todos os animais apresentaram uma resposta vital adequada, não se tendo detetado comportamentos estranhos, sinais de dor ou infeção.

3.3.2 Observações macroscópicas ao longo do período experimental

Para avaliar uma possível resposta imunológica, os *scaffolds* foram mantidos durante um mês no animal. Durante este período de estudo, não foram observados, macroscopicamente, sinais de inflamação ou infecção e nenhum dos *scaffolds* foi rejeitado pelos animais. As suturas foram, como habitualmente, autoremovidas, demonstrando à primeira vista, que o processo cicatricial decorreu em conformidade com o esperado. De forma a monitorizar possíveis alterações no metabolismo normal do animal, foi realizada, semanalmente, a monitorização do peso. O peso médio inicial foi de 392 g e o peso médio final de 370 g, o que traduz uma diminuição aproximadamente de 6%, valor dentro do normal aceite pela legislação nacional e internacional⁴.

3.3.3 Observações histológicas

Antes de iniciar uma discussão relativamente às diferenças histológicas observadas, é importante referir que, no momento de extração dos implantes foi possível detetar diferenças macroscópicas quanto à integração tecidular e neovascularização. Estas diferenças devem-se efetivamente às diferentes formulações, nomeadamente aos diferentes materiais e arquiteturas correspondentes, bem como às técnicas de esterilização implementadas que, segundo a literatura, ao esterilizarem o material, podem induzir alterações nas propriedades do *scaffold* e gerar metabolitos tóxicos. Por sua vez, estas novas propriedades/metabolitos poderão influenciar, positiva ou negativamente, o desempenho biológico destes *scaffolds*.

Posteriormente à colheita, as amostras de *scaffolds*, integrados no tecido envolvente, foram analisadas por uma técnica histológica não descalcificada, com recurso à coloração hematoxilina-eosina. A utilização destes corantes permitiu a obtenção de fotografias à lupa e ao microscópio ótico, para tornar possível a avaliação histológica das várias estruturas que circundam o *scaffold* e o próprio *scaffold*. É de referir que, como os *scaffolds* utilizados têm por base a PCL e, sendo a PCL solúvel em hidrocarbonetos, como benzeno e tolueno, a cuja família o xilol, utilizado no procedimento descrito na página 42-43, pertence, torna-se evidente que a PCL não seja visível nas figuras que se seguem [50]. Contudo, a integridade dos tecidos circundantes é assegurada pelo processo de desidratação dos tecidos antes da diafanização com o xilol, no qual o *paraplast* é miscível. Em nenhuma das imagens se observaram artefactos relevantes, no entanto, em certos casos, devido à etapa do procedimento de preservação da lâmina por intermédio de uma cola sintética, alguns fragmentos deslocaram-se da sua posição normal. De seguida são, então, apresentadas várias imagens obtidas para cada *scaffold* implantado, submetido às três esterilizações: óxido

⁴De acordo com o anexo II do Decreto-Lei Português n° 113/2013

etileno, radiação γ e plasma.

As estruturas mais comumente observáveis são: estrato córneo (E), folículos pilosos (F), glândulas sebáceas (S), miofibrilas (M), tecido celular subcutâneo (T), colagénio (C), miofibrilhas incorporadas com fibras de colagénio (MC), vasos sanguíneos (Vs), infiltrado inflamatório (I) e tecido conjuntivo (TC) a invadir a estrutura ôca do *scaffold*. As manchas/esfumados escuros são restos da HA, aparecendo igualmente sob uma forma pontuada a delimitar os filamentos.

3.3.3.1 Análise histológica da zona de controlo

Como referido anteriormente, cada animal funcionou como controlo de si próprio, tendo-se, para tal, criado uma bolsa com a respetiva sutura. Esta bolsa teve como finalidade criar um descolamento de estruturas, de forma a avaliar a respetiva resposta de cicatrização. Tendo-se verificado que não existiam diferenças nas imagens obtidas para cada rato, optou-se por representar a imagem correspondente ao Rato 1.

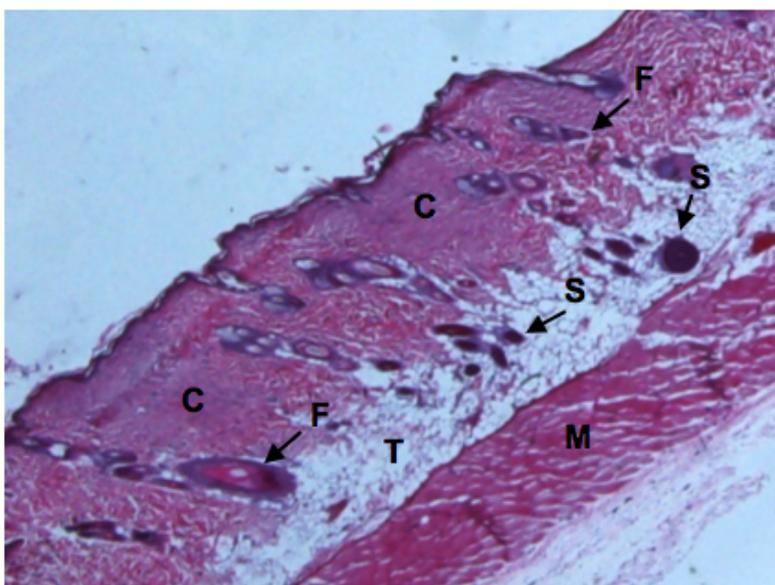


Figura 3.13: Corte histológico da zona de controlo, obtido com uma lupa ótica com ampliação $5,5\times$. Neste corte são visíveis folículos pilosos (F), glândulas sebáceas (S), miofibrilas (M), tecido celular subcutâneo (T) e tecido conjuntivo, em particular colagénio (C).

3.3.3.2 Análise histológica do *scaffold* PCL-HA(N)25-300-90

Na **Figura 3.14 A),B),C) e D)**, estão representados, respetivamente, os cortes histológicos obtidos para a esterilização por óxido etileno para duas ampliações distintas, radiação γ e plasma. Pela análise das figuras, pode concluir-se que, para esta formulação, a esterilização por óxido etileno é a que apresenta menos infiltrado inflamatório, seguido da esterilização por radiação γ e, por fim, plasma. Sabendo que o infiltrado inflamatório corresponde a uma cascata de células de defesa, que são recrutadas por atração quimiotática para o campo cirúrgico, a presença deste em menor quantidade, no *scaffold* esterilizado por óxido etileno, sugere que esta foi a esterilização que induziu um melhor comportamento *in vivo*.

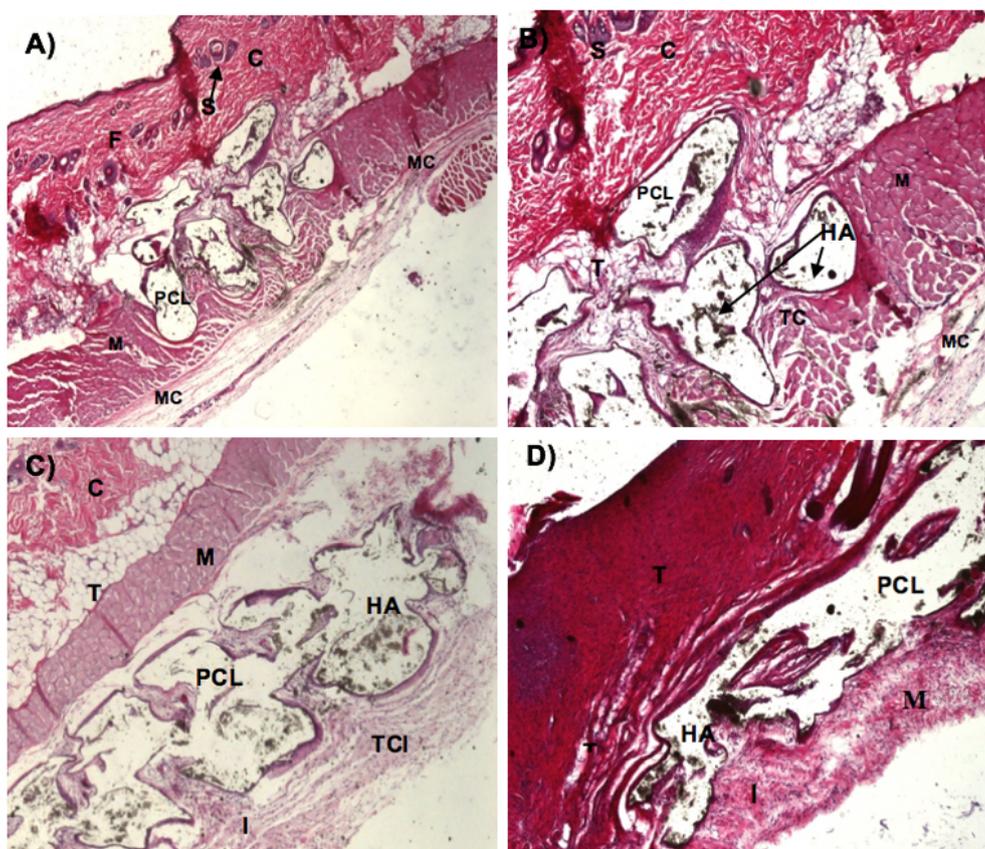


Figura 3.14: Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o scaffold PCL-HA(S)25-300-45, esterilizado por óxido etileno (A) (ampliação 20×), (B) (ampliação 40×), radiação γ (C) (ampliação 20×) e plasma (D) (ampliação 40×). Nestas imagens é possível observar folículos pilosos (F), glândulas sebáceas (S), miofibrilas (M), tecido celular subcutâneo (T), colagênio (C), miofibrilhas incorporadas com fibras de colagênio (MC), tecido conjuntivo (TC) a invadir a zona do *scaffold*, infiltrado inflamatório (I) e tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (TCI). A zona ocupada pelo *scaffold* (PCL) corresponde às estruturas brancas, uma vez que a PCL foi dissolvida em xilol. A HA presente é identificada pelos fragmentos mais escuros e delimitam a estrutura ôca do *scaffold*.

3.3.3.3 Análise histológica do *scaffold* PCL-HA(S)10-300-45

Pela análise da **Figura 3.15**), podemos observar que nas três figuras existe infiltrado inflamatório, sendo este mais notório na esterilização por plasma (**3.15 C**)). Os resultados parecem indicar um desempenho análogo, *in vivo*, entre a esterilização por óxido etileno (**3.15 A**) e por radiação γ (**3.15 B**), que são nitidamente melhores que a do plasma. Contudo, a esterilização por plasma torna-se favorável pela presença de vasos sanguíneos. Comparando com as imagens anteriores, **Figura 3.14**, é possível observar que

o teor de HA representado é inferior, uma vez que a HA desta formulação apresenta um teor de 10%.

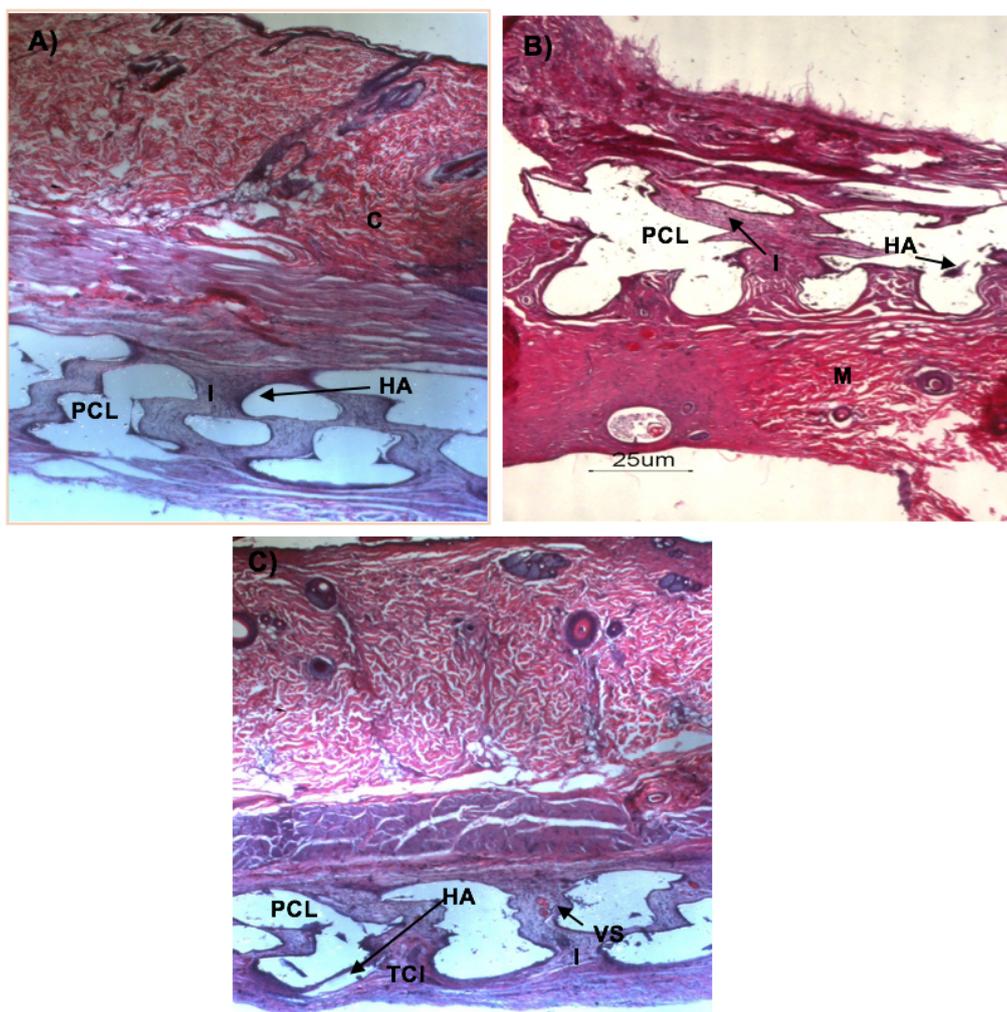


Figura 3.15: Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o scaffold PCL-HA(S)10-300-45, esterilizado por óxido etileno (A) (ampliação 40×), radiação γ (B) (ampliação 100×) e plasma (C) (ampliação 40×). Nestas imagens é possível destacar miofibrilas (M), colagénio (C), vasos sanguíneos (Vs) infiltrado inflamatório (I), tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o scaffold (TCI), a (PCL) e a HA.

3.3.3.4 Análise histológica do scaffold PCL-HA(S)25-300-90

Na **Figura 3.16** (A), (B) e (C) estão representados, respetivamente, os cortes histológicos obtidos para a esterilização por óxido etileno, radiação γ e plasma. Pela análise das figuras, pode concluir-se que esta formulação parece ser favorável *in vivo* à exceção do scaffold esterilizado por radiação γ . Na imagem (A), o scaffold não está visível, uma vez

que como tem maior teor de HA, o corte é mais espesso e ao colocar a lamela o conteúdo sofreu arrasto.

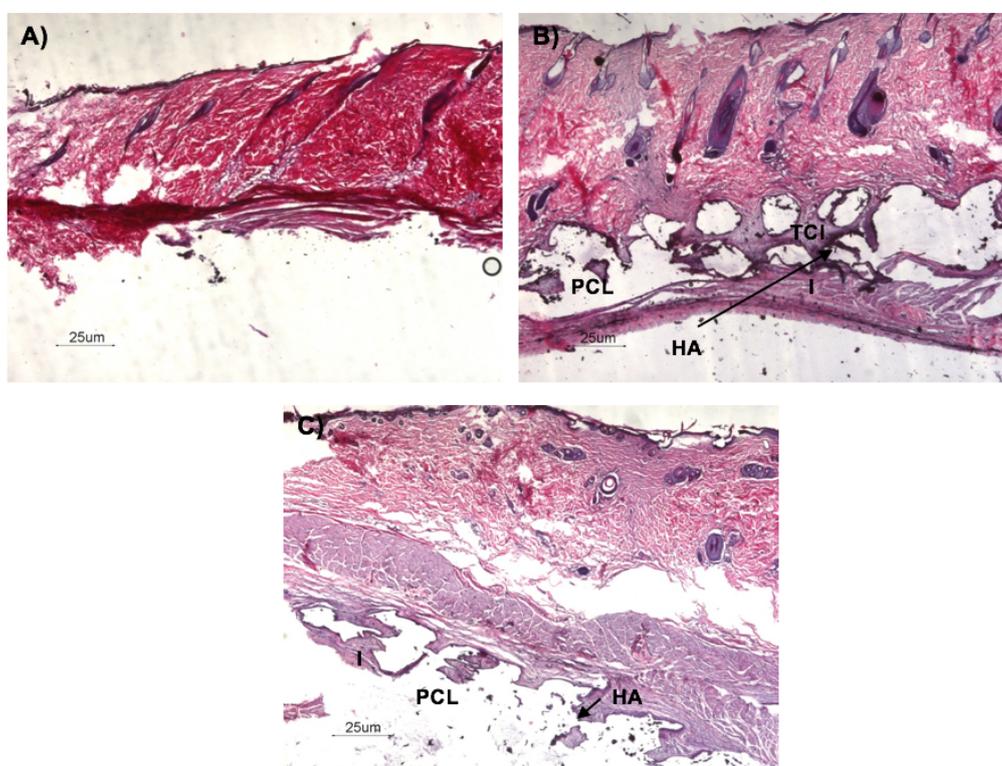


Figura 3.16: Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o scaffold PCL-HA(S)25-300-90, esterilizado por óxido etileno (A) (ampliação 100×), radiação γ (B) (ampliação 40×) e plasma (C) (ampliação 40×). Nestas imagens destacam-se o infiltrado inflamatório (I), o tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (TCI), a (PCL) e a HA.

3.3.3.5 Análise histológica do *scaffold* PCL-HA(S)25-600-90

Pela análise da **Figura 3.17**, verifica-se a presença de grandes quantidades de infiltrado inflamatório, traduzindo um mau desempenho *in vivo*. Este resultado é consistente com os resultados obtidos *in vitro* no sentido em que o *scaffold* não é dos mais favoráveis, contudo, *in vitro* a esterilização por plasma revela-se a mais promissora, mas *in vivo* o mesmo não acontece pois a esterilização por óxido etileno e γ revelam melhores desempenhos que a do plasma.

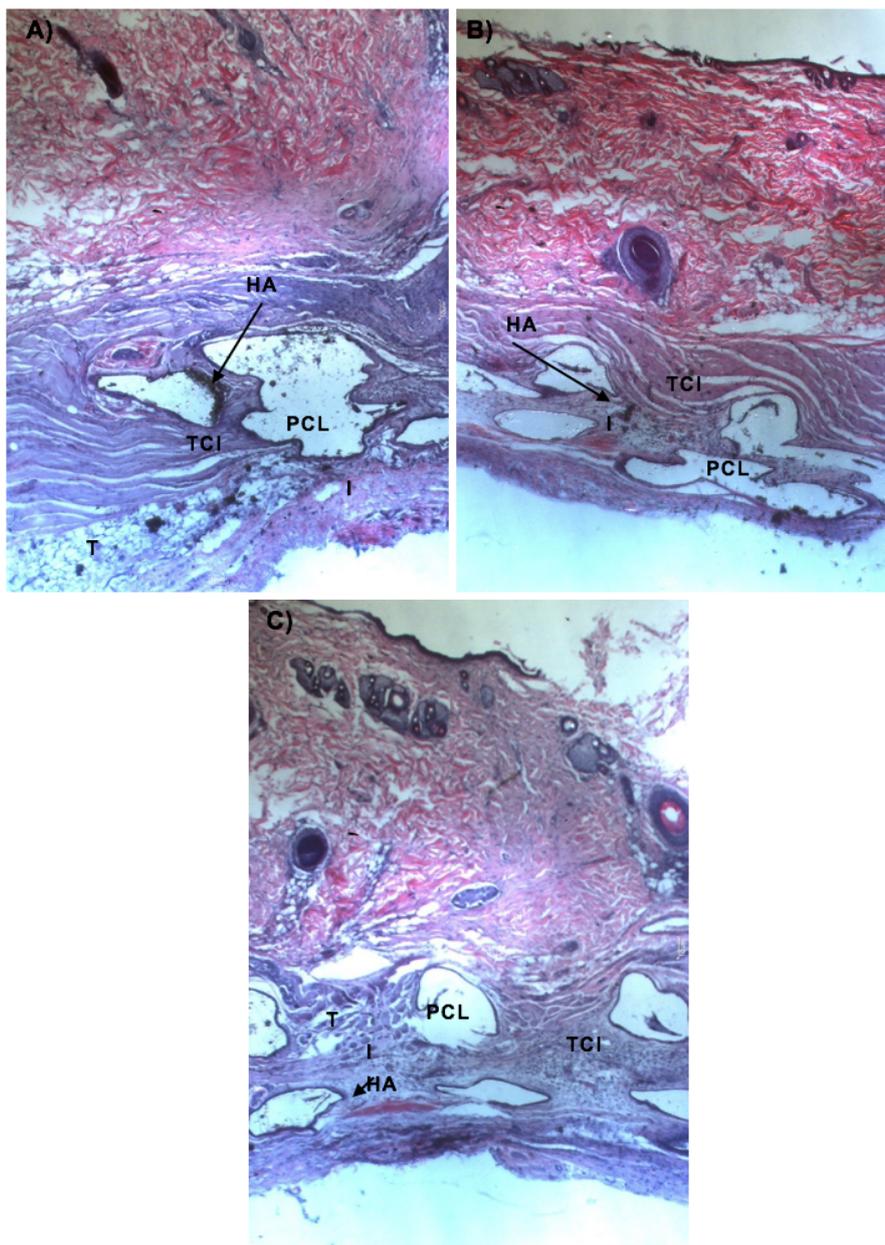


Figura 3.17: Corte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o *scaffold* PCL-HA(S)25-600-90, esterilizado por óxido etileno (A) (ampliação 40×), radiação γ (B) (ampliação 40×) e plasma (C) (ampliação 40×). Nestas imagens deu-se ênfase ao infiltrado inflamatório (I), à (PCL), à HA e ao tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (TCI).

3.3.3.6 Análise histológica do *scaffold* PCL-HA(N)25-600-90

Na **Figura 3.18** observam-se, respetivamente, os cortes histológicos obtidos para a esterilização por óxido etileno, radiação γ e plasma. Os cortes indicam que o *scaffold* não desempenha um pior comportamento *in vivo*, comparativamente ao evidenciado nos estudos *in vitro*. Observa-se, de facto, infiltrado inflamatório em ambas as imagens (B) e

(C), contudo não é em grandes quantidades, portanto, é de esperar que desapareça com o passar do tempo. Para além disto, estas mesmas figuras mostram vasos sanguíneos, o que sugere uma boa integração *in vivo*. Relativamente à imagem (A), tal como foi explicado anteriormente, a falta da porção com o biomaterial deve-se ao teor da HA, que dificulta a preservação do *scaffold* aquando da colocação da cola sintética para a montagem da preparação.

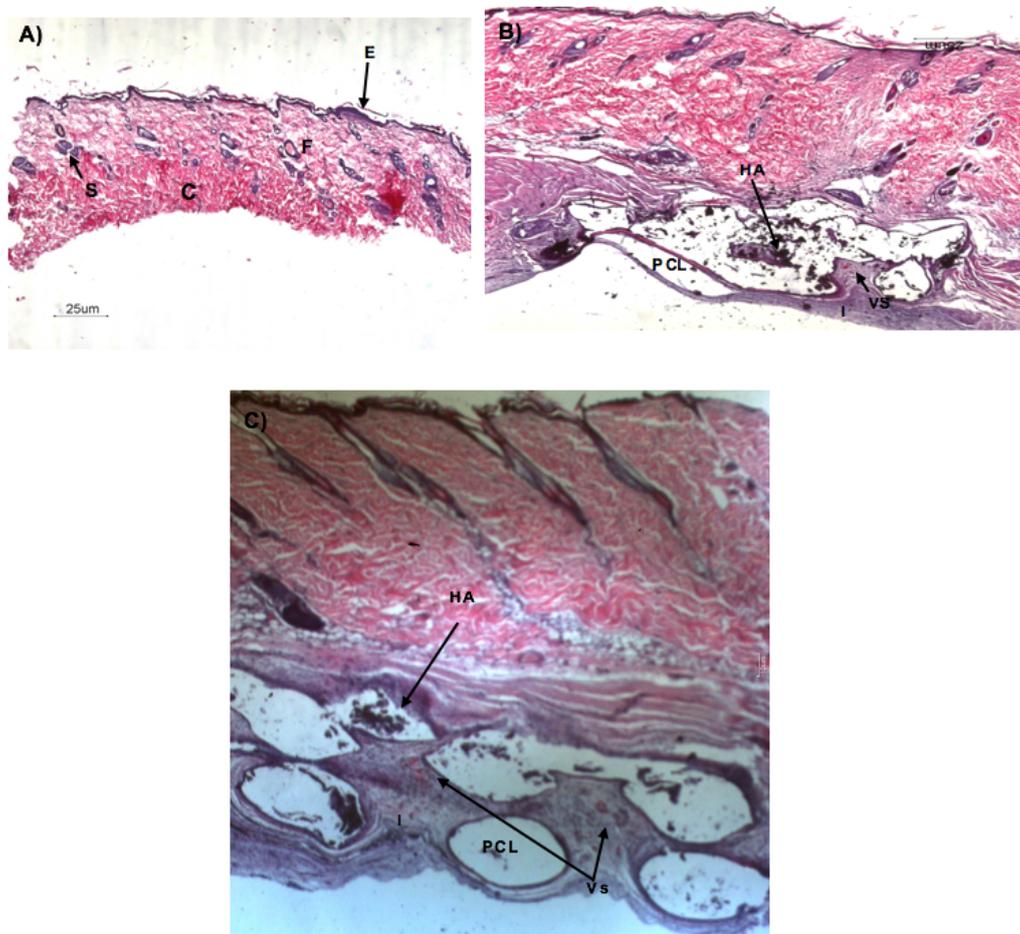


Figura 3.18: orte histológico observado a um microscópio ótico de um animal implantado com o scaffold PCL-HA(N)25-600-90, esterilizado por óxido etileno (A) (ampliação 40×), radiação γ (B) (ampliação 40×) e plasma (C) (ampliação 40×). Nestas imagens deu-se ênfase ao infiltrado inflamatório (I), à (PCL), à HA, aos vasos sanguíneos (Vs) presentes, ao tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório a envolver o *scaffold* (TCI), à glândula sebácea (S), colagénio (C), extrato córneo (E) e ao folículo piloso (F).

3.4 Cultura de células primárias da polpa e da papila de dentes humanos

Dada a importância que as células estaminais têm na regeneração de células produtoras de osso, no caso do dente - odontoblastos - e no osso - osteoblastos - face a lesões ou traumatismos, foi realizado um procedimento inovador de obtenção de células da polpa e da papila obtidas através da extração de um dente humano jovem. Este procedimento teve como finalidade única obter células produtoras de osso, para ser possível iniciar os testes com estas células. Os resultados permitiram concluir que o modelo experimental foi adequado, uma vez que a maioria dos explantes aderiu à placa de poços, tendo-se verificado crescimento de estruturas, semana a semana. Até ao momento, os resultados demonstraram que as células estaminais se diferenciaram em células da linhagem adipogénica, por ser a forma mais fácil de diferenciação e por estarem em número reduzido.

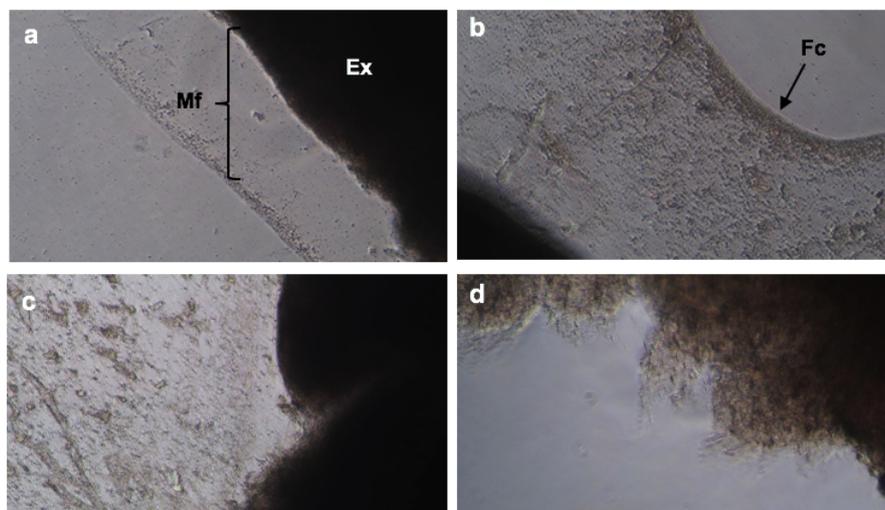


Figura 3.19: Fotomicrografias representativas dos explantes (**Ex**) da polpa (**a,b,c**) e da papila (**d**), onde é possível observar o desenvolvimento de uma membrana formadora de células (**Mf**), com uma frente de crescimento ativa (**Fc**).

Pela análise da **Figura 3.19 a,b e c** é possível observar uma membrana à volta do explante. Ao longo das várias semanas de incubação, cresceram e diferenciaram-se, nesta membrana, células adipogénicas, uma vez que é um processo de diferenciação simples que exige menos fatores sinalizadores.

No que diz respeito à papila (**Figura 3.19 d**) não se observou o crescimento de nenhuma membrana, também porque a papila era consideravelmente mais pequena que a polpa.

Na realização deste trabalho, não se atingiu a fase de efetuar o protocolo de diferenciação. Numa próxima experiência este protocolo será otimizado retirando mais cedo

o explante e passando as células para um frasco de cultura, com adição de fatores diferenciadores ósseos, tais como a vitamina D, vitamina C, L-glutamina, glicerofosfato e dexametasona.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho permitiu dar mais alguns passos para a otimização de matrizes poliméricas de PCL e matrizes compósitas de PCL-HA com vista a uma aplicação em Dentária para regeneração de pequenos defeitos ósseo na mandíbula e no maxilar. Um dos requisitos desta aplicação é o facto do material que compõe o *scaffold* ser osteocondutor, de forma a guiar a formação do tecido ósseo. Como tal, foram utilizadas duas origens diferentes de hidroxiapatite, a natural e a sintética, com um tamanho de partícula micrométrico para dar reforço à PCL. Apesar das diferenças estequiométricas reportadas na literatura, neste trabalho, os resultados relativos a este desempenho não foram conclusivos.

De modo a cumprir o objetivo deste trabalho, que consistiu na determinação do método de esterilização que induzia o melhor comportamento biológico para cada uma das formulações testadas, procedeu-se, numa fase inicial, à esterilização dos *scaffolds* por óxido etileno, radiação γ e plasma. Para assegurar que a esterilização tinha sido eficaz, na eliminação de todas as espécies microbianas, foram realizados testes de microbiologia para cada uma delas. Os resultados obtidos revelaram que, efetivamente, os *scaffolds* estavam estéreis, tendo sido utilizados nos estudos que se seguem.

Numa segunda fase, os *scaffolds* esterilizados foram utilizados nos estudos *in vitro* de monocultura de fibroblastos, macrófagos e a co-cultura de fibroblastos e macrófagos. Os resultados obtidos não foram conclusivos, uma vez que a esterilização depende fortemente da formulação utilizada. No caso particular dos estudos em monocultura, observou-se que o

tipo celular e os dias avaliados também influenciam os comportamentos celulares, obtendo-se comportamento diferentes que não se relacionam no seu todo. No entanto, nos estudos de co-cultura, os resultados revelaram uma tendência para um melhor desempenho, aos 5 dias, quando esterilizados por plasma. Uma justificação para este facto poderá estar relacionada com o maior grau de instituição dos fibroblastos neste tempo e, essencialmente, com as modificações de superfície reportadas na literatura, no momento da esterilização. O facto da esterilização por plasma aumentar a concentração de componentes polares à superfície, torna o *scaffold* mais hidrofílico. Sabendo ainda que as células aderem preferencialmente a superfícies hidrofílicas e moderadamente hidrofílicas, a modificação de superfície intrínseca à esterilização por plasma aumenta a adsorção de proteínas sem modificar a sua natural conformação e, conseqüentemente, promove a adesão celular. Relativamente ao tipo de células, podemos concluir que, em co-cultura, são os fibroblastos quem lidera o desempenho *in vitro*, uma vez que na monocultura de macrófagos foi observada uma tendência considerável para a utilização da radiação γ , diminuindo nos estudos em co-cultura. O facto dos macrófagos apresentarem um melhor desempenho *in vitro* nos *scaffolds* esterilizados por radiação γ poderá estar relacionado com o facto desse processo poder induzir a quebra das cadeias. Apesar da quebra das cadeias induzir a posterior formação de ligações cruzadas, o rearranjo da estrutura atómica pode ser favorável à maximização da função dos macrófagos pelo possível aumento da área exposta ou produção de resíduos.

Com o intuito de melhorar os resultados *in vitro* obtidos sugere-se a possível produção de *scaffolds* com HA de tamanho nanométrico, uma vez que os materiais em nanoescala têm revelado *performances* melhoradas devido ao aumento da área de superfície e, especialmente, à sua reatividade superficial pela maior capacidade de ligação com proteínas. Adicionalmente, vários estudos, que comparam as características da HA manométrica com a micrométrica, têm demonstrado diferenças ao nível dos processos de adesão e da topografia, que se têm relevado primordiais na modelação dos comportamentos celulares. Dados os valores de viabilidade celular por vezes baixos, a possibilidade de inclusão de PRP nestes estudos seria uma alternativa promissora para a estimulação da proliferação celular *in vitro*. Como se trata de uma aplicação óssea, sugere-se que, futuramente, sejam realizados estudos em monocultura, co-cultura dois a dois e tri-cultura com fibroblastos, macrófagos e células produtoras de osso. Visto que a diferenciação destas células é um processo extremamente difícil, poderá ser interessante adicionar BMP's que estimulem a diferenciação celular.

De forma a esclarecer o desempenho *in vitro* de alguns *scaffolds*, em particular, três mais favoráveis *in vitro* – PCL-HA(N)25-300-90, PCL-HA(S)10-300-45 e PCL-HA(S)25-300-90 – e dois menos favoráveis – PCL-HA(S)25-600-90 e PCL-HA(N)25-600-90 – também foram realizados estudos *in vivo* em ratos *Wistar*, com posterior análise histológica. Nesta fase inicial do estudo, os *scaffolds* foram implantados no dorso do animal com a finalidade de avaliar o potencial imunogénico face à implantação da mesma formulação de *scaffold*

esterilizado pelas diferentes técnicas. A observação das lâminas histológicas revelou a presença de uma maior ou menor quantidade de infiltrado inflamatório a envolver a estrutura ôca do *scaffold*, dependendo dos metabolitos libertados pela esterilização que reagem mais ou menos com as células. De uma forma geral, os resultados obtidos *in vivo* sugerem melhores resultados para a esterilização por óxido etileno, obtendo-se menores quantidades de infiltrado inflamatório. Estes resultados não estão em conformidade com a tendência verificada para os estudos em co-cultura, porém *in vitro*, não se consegue simular a constante renovação de fluidos como num organismo vivo nem o vasto leque de células que vão povoar o *scaffold*, o que poderá estar na causa destas diferenças. A partir dos resultados *in vitro* foi possível ainda verificar que os materiais utilizados mostraram uma adequada biocompatibilidade, indicada pela ausência de reações inflamatórias acentuadas ou infeção. À semelhança do que aconteceu em trabalhos anteriores, não se pode extrapolar os resultados do *in vitro* para o *in vivo*, dado a estas diferenças. Porém, pode concluir-se que o modelo experimental adotado se revelou muito eficaz na avaliação do comportamento biológico das três esterilizações usadas.

Como trabalho futuro seria interessante implantar os *scaffolds* em osso. Para tal, será necessário produzir *scaffolds* de maior espessura e cortar com o formato do defeito criado. Idealmente o fémur seria o osso de eleição para este procedimento, porém, dadas às forças exercidas pelos membros posteriores do rato, seria indicado, numa primeira fase a implantação na calote craneana, sendo a cirurgia extremamente minuciosa.

Por fim, foi realizado um procedimento de diferenciação de células da polpa e da papila apical, extraídas de um dente humano jovem, em células produtoras de osso. Assim, foi realizado um procedimento alternativo ao método enzimático, anteriormente testado num dos trabalhos do grupo de investigação. Este novo procedimento tem sido explorado nos mais diversos laboratórios de todo o mundo e promete ser revolucionário na medida que é mais económico face ao anteriormente experimentado e é acessível a toda a comunidade científica. A principal desvantagem é que é um processo mais moroso, mas que no final produz altos rendimentos. Contudo, nesta tentativa, como a polpa e a papila extraídas provieram de um dente não tão jovem quanto seria desejado, as células estaminais diferenciaram-se na forma celular mais fácil – células adipogénicas. Por razões externas ao trabalho, não foi possível obter mais fragmentos da polpa e da papila para repetir o estudo com dentes mais jovens.

Em jeito de conclusão, a divergência dos resultados revela o quanto as características da formulação, vista como um todo, e a esterilização que se utilizou influenciam o comportamento celular. Posto isto, a sinergia resultante da combinação das várias formulações dos *scaffolds* e de técnicas que os esterilizem, mas ao mesmo tempo induzam alterações na superfície que potenciem melhores comportamentos celulares, poderá estar na base do sucesso deste biomaterial, na regeneração de defeitos ósseos para aumento qualitativo e

quantitativo de osso. Contudo, de forma a tirar conclusões mais precisas, é imprescindível a realização de testes mecânicos que determinem verdadeiramente as alterações induzidas na superfície e/ou no *bulk* do biomaterial, após esterilização pelas técnicas implementadas. De facto, seria interessante investir, de ora em diante, nestes testes, dando continuidade a este trabalho.

Referências Bibliográficas

- [1] M. Figueiredo and G. Carlos, “Cavidade Oral,” in *Histologia - Texto e Imagens - Histologia, Histogênese, Organogênese*, pp. 201–230, 2007.
- [2] B. Phulari, P. NK, R. Rathore, and R. Phulari, “Introduction to Dental Anatomy,” in *Textbook of Dental Anatomy, Physiology and Occlusion*, pp. 3–21, 2014.
- [3] Jayasudha, Baswara, Navin, and Prasanna, “Enamel Regeneration - Current Progress and Challenges,” *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, vol. 8(9), pp. 6–9, 2014.
- [4] S. Standring, N. R. Borley, P. Collins, A. R. Crossman, M. A. Gatzoulis, J. C. Healy, D. Johnson, V. Mahadevan, R. L. Newell, and C. Wigley, “Oral cavity,” in *Grays’s anatomy*, ch. 30, pp. 499–525, 40 ed., 2008.
- [5] R. Lewis and R. Dwyer-Joyce, “Wear of human teeth: A tribological perspective. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers,” *Part J: Journal of Engineering Tribology*, vol. 219(1), pp. 1–18, 2005.
- [6] C. Gonçalves, “Tecido Conjuntivo,” in *Histologia - Texto e Imagens - Histologia, Histogênese, Organogênese* (I. d. U. de Coimbra, ed.), ch. 2, pp. 31–44, 2 ed., 2007.
- [7] D. Pashley, R. Walton, and H. Slavkin, “Histology and Physiology of the dental pulp,” in *Ingle and L. Bakland, ed., Endodontics*, pp. 25–61, 5 ed., 2002.
- [8] P. Collins, A. R. Crossman, M. A. Gatzoulis, J. C. Healy, D. Johnson, V. Mahadevan, R. L. Newell, C. Wigley, S. Standring, and N. R. Borley, “Integrating cells into tissues,” in *Grays’s anatomy*, pp. 27–40, 40 ed., 2008.
- [9] B. Hashemi-Beni, M. Khoroushi, M. Foroughi, S. Karbasi, and A. Khademi, “Tissue engineering: Dentin – pulp complex regeneration approaches (A review),” *Tissue and Cell*, pp. 1–13, 2017.
- [10] M. Goldberg, J. Farges, S. LacerdaPinheiro, N. Six, N. Jegat, F. Decup, D. Septier, F. Carrouel, S. Durand, and C. Chaussainmiller, “Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair,” *Pharmacological Research*, vol. 58(2), pp. 137–147, 2008.

- [11] E. J. Pearce and B. Everts, “Dendritic cell metabolism,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, no. 1, pp. 18–29, 2014.
- [12] N. Kawashima and T. Okiji, “Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex,” *Congenital Anomalies*, vol. 56(4), pp. 144–153, 2016.
- [13] B. Berkovitz, B. Moxham, R. Linden, and A. Sloan, “Dental Tissues. II. Dentine/pulp complex: structure, composition, development and oral pain,” in *Master Dentistry Volume Three*, ch. 13, pp. 161–193, 2011.
- [14] R. Rodrigues, B. Viana, I. Vieira, J. Tavares, R. Lobo, A. Portela, and M. Vasconcelos, “Dental Stem Cells Characterization and Bone Regenerative potencial in Oral Medicine,” *International Journal of Stem Cell Research & Theraphy*, pp. 1–5, 2015.
- [15] M. Maxim, O. Soritau, M. Baciut, S. Bran, and G. Baciut, “The role of dental stem cells in regeneration,” *Clujul Medical*, vol. 88(4), p. 479, 2015.
- [16] A. Diogenes, M. Henry, F. Teixeira, and K. Hargreaves, “An update on clinical regenerative endodontics,” *Endodontic Topics*, vol. 28(1), pp. 2–23, 2013.
- [17] F. Rodriguez-Lozano, C. Bueno, C. Insausti, L. Meseguer, M. Ramírez, M. Blanquer, N. Marín, S. Martínez, and J. Moraleda, “Mesenchymal stem cells derived from dental tissues,” *Internation Endodontic Journal*, vol. 44(9), pp. 800–806, 2011.
- [18] S. Surendan and G. Sivamurthy, “Current applications and future prospects of stem cells in dentistry,” vol. 42(6), pp. 556–561, 2015.
- [19] A. Louvier, E. Euvrard, L. Nicod, G. Rolin, F. Gindraux, L. Pazart, C. Houdayer, P. Risold, F. Meyer, and C. Meyer, “Odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells from healthy and carious teeth on an original PCL-based 3D scaffold,” *International Endodontic Journal*, 2017.
- [20] K. Alghazali, Z. Nima, R. Hamzah, M. Dhar, D. Anderson, and A. Biris, “Bpne-tissue engineering: complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies,” *Drug Metabolism Reviews*, vol. 47(4), pp. 431–454, 2015.
- [21] M. Ferreira, E. Carrilho, and J. Leitão, “Mecanismo e Classificação das Reabsorções Radiculares,” 2006.
- [22] Y. Imai, M. Youn, K. Inoue, I. Takada, A. Kouzmenko, and S. Kato, “Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases,” *Physiological Reviews*, vol. 93(2), pp. 481–523, 2013.
- [23] P. Philip, “Peri-implant tissue biology, physiology and pathology,” in *Implants and restorative Dentistry*, pp. 88–106, 1 ed., 2001.

- [24] K. Benner, “Morphological aspects of oral Implantology,” in *Implants and restorative Dentistry*, pp. 26–46, 2001.
- [25] A. Curry, M. Querido, M. Pegoraro, and F. Tranquitella, “Reconstrução de maxilas atróficas com enxertos autogéno de crista ilíaca,” in *Implantes Osseointegrados - Técnica e Arte*, pp. 123–142, 1 ed., 2002.
- [26] R. Horowitz, D. Holtzclaw, and P. Rosen, “A review on alveolar ridge preservation following tooth extraction,” *Journal of evidence based dental practice*, vol. 12(3), pp. 149–160, 2012.
- [27] K. Morjaria, R. Wilson, and R. Palmer, “Bone healing after tooth extraction with or without an intervention: a systematic review of randomized controlled trials,” *Clinical implant Dentistry and Related Research*, vol. 16(1), pp. 1–20, 2012.
- [28] B. Leblebicioglu, “Immediate effects of tooth extraction on ridge integrity and dimensions,” *Clinical Oral Investigations*, vol. 19(8), pp. 1777–1784, 2015.
- [29] A. Abdelhamid, “Alveolar bone preservation. Biological Basis and Techniques,” *International Journal of Dental Sciences and Research*, vol. 5(3), pp. 56–68, 2017.
- [30] I. Milinkovic and L. Cordaro, “Are there specific indications for the different alveolar bone augmentation procedures for implant placement? A systematic review,” *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 43(5), pp. 606–625, 2014.
- [31] R. Spin-Neto, A. Stavropoulos, F. Coletti, R. Faeda, L. Pereira, and E. Marcantonio, “Graft incorporation and implant osseointegration following the use of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts for lateral ridge augmentation,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 25(2), pp. 226–233, 2013.
- [32] G. Ceccarelli, R. Presta, M. Angelis, S. Lupi, and R. Baena, “Emerging Perspectives in Scaffolds for Tissue Engineering in Oral Surgery,” *Stem Cells International*, pp. 1–11, 2017.
- [33] A. Garg, “Grafting Materials in Repair and restoration,” in *Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*, pp. 83–102, 1999.
- [34] S. Parithimarkalaignan and T. Padmanabhan, “Osseointegration: An Update,” *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, vol. 13(1), pp. 2–6, 2013.
- [35] K. Payne, I. Balasundaram, S. Deb, L. Di Silvio, and K. Fan, “Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery,” *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 52(1), pp. 7–15, 2014.
- [36] R. Rai, R. Raval, R. Khandeparker, S. Chidrawar, A. Khan, and M. Ganpat, “Tissue Engineering: Step Ahead in maxillofacial Reconstruction,” *Journal of International Oral Health*, vol. 7(9), pp. 138–142, 2015.

- [37] S. Salmasi, L. Nayyer, A. Seifalian, and G. Blunn, “Nanohydroxyapatite effect on the degradation, osteoconduction and mechanical properties of polymeric bone tissue engineered scaffolds,” *The Open Orthopaedics Journal*, vol. 10, pp. 900–919, 2016.
- [38] Y. Luo, G. Engelmayr, D. Augeste, L. Ferreira, J. Karp, R. Saigal, and R. Langer, “3D Scaffolds,” in *Principles of tissue Engineering*, pp. 475–494, 4 ed., 2014.
- [39] S. Park, S. Lee, and W. Kim, “Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite(PCL/HA) blend scaffolds using 3D plotting system for bone tissue engineering,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 34(4), pp. 505–514, 2010.
- [40] S. Bose, S. Vahabzadeh, and Bandyopadhyay, “Bone tissue engineering using 3D printing,” *Materials Today*, vol. 16(12), pp. 496–504, 2013.
- [41] J. Zhao, L. Guo, X. Yang, and J. Weng, “Preparation of bioactive porous HA/PCL composite scaffolds,” *Applied Surface Science*, vol. 255(5), pp. 2942–2946, 2008.
- [42] P. Coimbra, J. Almeida, J. Santos, A. Santos, S. Pereira, H. Chunha, B. Olivieiros, C. Capela, T. Viana, N. Alves, and M. Figueiredo, “Characterization of poly(caprolactone)/hydroxyapatite composite scaffolds produced by a melt extrusion additive manufacturing technique,” *Polymer Science: research advances practical applications and educational aspects*, pp. 131–138, 2017.
- [43] J. Kim, T. Lee, D. Cho, and B. Kim, “Solid Free-form fabrication-based PCL/HA scaffolds fabricated with a multi-head deposition system for bone tissue engineering,” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 21(6-7), pp. 951–962, 2010.
- [44] J. Gomes, R. Silva, and M. Vieira, “Otimização da Reação de Síntese de Hidroxiapatite por Precipitação Aquosa,” *Ciencia e Tecnologia dos Materiais*, vol. 19, pp. 1–9, 2007.
- [45] N. Ramesh, S. Morrati, and G. DIAS, “Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends,” *Journal of Biomedical Materials Research Parte B: Applied biomaterials*, pp. 1–12, 2017.
- [46] M. Spector, “Basic Principles of tissue Engineering,” in *Tissue Engineering - applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*, pp. 3–16, 1999.
- [47] K. Ang, K. Leong, C. Chua, and M. Chandrasekaran, “Compressive properties and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, pp. 655–660, 2007.

- [48] N. Wongsupa, T. Nuntanaranont, S. Kamolmattayakul, and N. Thuaksuban, “Biological characteristic effects of human dental pulp stem cells on poly- ϵ -caprolactone-biphasic calcium phosphate fabricated scaffolds using modified melt stretching and multilayer deposition,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 28(2), pp. 1–11, 2017.
- [49] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, and J. Kohn, “Biodegradable Polymers,” in *Principles of Tissue Engineering*, pp. 441–473, 4 ed., 2014.
- [50] M. Woodruff and D. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century.,” *Progress in Polymer Science*, vol. 35(10), pp. 1217–1256, 2010.
- [51] M. Labet and W. Thielemans, “Synthesis of polycaprolactone: a review,” *The Royal Society of Chemistry*, vol. 38, pp. 3484–3504, 2009.
- [52] H. Declercq, T. Desmet, E. Berneel, P. Dubruel, and M. Cornelissen, “Synergistic effect of surface modification and scaffold design of bioplotting 3-D poly- ϵ -caprolactone scaffolds in osteogenic tissue engineering.,” *Acta Biomaterialia*, vol. 9(8), pp. 7699–7708, 2013.
- [53] Z. Dai, J. Ronholm, Y. Tian, B. Sethi, and X. Cao, “Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering application.,” *Journal of Tissue Engineering*, vol. 7, pp. 1–13, 2016.
- [54] M. Figueiredo, F. A. G. Martins, J. Freitas, F. Judas, and H. Figueiredo, “Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone.,” *Ceramics international*, vol. 36, pp. 2383–2393, 2010.
- [55] H. Kim, “Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 83A(1), pp. 169–177, 2007.
- [56] T. Patrício, M. Domingos, A. Gloria, and P. Bártolo, “Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for Tissue Engineering.,” *Procedia CIRP*, vol. 5, pp. 110–114, 2013.
- [57] R. Ghobeira, C. Philips, H. Declercq, P. Cools, N. De Geyter, R. Cornelissen, and R. Morent, “Effects of different sterilization methods on the physico-chemical and bioresponsive properties of plasma-treated polycaprolactone films.,” *Biomedical Materials*, vol. 12(1), pp. 1–19, 2017.
- [58] R. Augustine, A. Saha, V. Jayachandran, S. Thomas, and N. Kalarikkal, “Dose-dependent effects of gamma irradiation on the Materials Properties and Cell proliferation of electrospun polycaprolactone Tissue Engineering scaffolds.,” *International*

- Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 64(10), pp. 526–533, 2015.
- [59] M. Perucca, “Introduction to plasma and plasma technology,” in *Plasma Technology for Hyperfunctional Surfaces. Food, Biomedical and Textile Applications.*, pp. 3–32, 2010.
- [60] H. Shintani, “Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action (Review).” *Experimental and Therapeutic Medicine*, pp. 731–738, 2010.
- [61] S. Pereira, *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.
- [62] C. Silva, *Avaliação da influência do método de esterilização na adesão e proliferação de várias linhas celulares em scaffolds de compósitos de poly-ε-caprolactona/hidroxiapatite produzidos por uma técnica de fabricação aditiva*. Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, 2016.
- [63] E. Sanders, “Aseptic Laboratory Techniques:Plating Methods.,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 63, pp. 1–18, 2012.
- [64] F. Martinez, L. Helming, R. Milde, A. Varin, B. Melgert, C. Draijer, B. Thomas, M. Fabbri, A. Crawshaw, L. Ho, N. Ten Hacken, V. Cobos Jimenez, N. Kootstra, J. Hamann, D. Greaves, M. Locati, A. Mantovani, and S. Gordon, “Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences.,” *Blood*, vol. 121(9), pp. e57–e69, 2013.
- [65] A. Ray and B. Dittel, “Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 35, pp. 1–3, 2010.
- [66] A. Santos, *Água trocável do pulmão - contribuição para o desenvolvimento de uma metodologia para a sua avaliação*. Tese de doutoramento em ciências médicas, Universidade de Coimbra, 2001.
- [67] A. Santos, V. Silva, H. Cunha, A. Arranjo, D. Rafael, B. Oliveiros, and M. Videira, “Viability and cytotoxicity assays of novel anti-neoplastic nanoparticle formulations for peritoneal rat macrophages. Special Nanotoxicology.” 2013.
- [68] S. Tryan, A. Puhar, M. Ngo-Camus, and N. Ramarao, “Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*.,” *PLoS ONE*, vol. 6(9), pp. 1–5, 2011.
- [69] W. Strober, “Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability.,” *Current Protocols in Immunology*, pp. A3.B.1–A3.B.2, 2015.

- [70] F. Borges, *Criação de um banco de macrófagos peritoneais de rato e ratinho*. Tese de licenciatura em análises clínicas e saúde pública, Instituto de Piaget, Polo de Mirandela, 2009.
- [71] T. Riss, R. Morayec, A. Niles, S. Duellman, H. Benik, T. Worzella, and L. Minor, “Cell Viability Assays,” in *Assay Guidance Manual*, pp. 355–386, 2 ed., 2017.
- [72] A. Mescher, “Histology & Its Methods of Study,,” in *Junqueiras Basica Histology – Text and Atlas*, pp. 21–58, 13 ed., 2013.
- [73] S. Suvarna and C. Layton, *Bancroft’s theory and practice of histological techniques consult.* 1 ed., 2013.
- [74] BD, “Instructions for use - ready-to-use plated media,” 2017.
- [75] M. Di Foggia, U. Corda, E. Plescia, P. Taddei, and A. Torreggiani, “Effects of sterilisation by high-energy radiation on biomedical polycaprolactone)/hydroxyapatite composites,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 21(6), pp. 1789–1797, 2010.
- [76] A. Nascimento, *Reconstruction plastique du membre supérieur - investigation anatomique at application chirurgicale et Régénération lymphatique en réimplantations et lambeaux vascularisés dans la chirurgie expérimentale et clinique*. Tese de doutoramento em ciências da vida e da matéria, especialidade de ortopedia/cirurgia plástica reconstrutiva, Universidade René Descartes - Paris V (U.F.R. Biomédicale Saints-Pères) e Doctor Communitatis Europæ (Tese de Doutoramento Europeu), 1994.
- [77] T. Koh and A. DiPietro, “Inflammation and wound healing: The role of the macrophage,” *Expert Rev Mol Med*, vol. 13, pp. 1–14, 2013.
- [78] D. Riches, E. Chan, and B. Winston, “TNF- α -Induced Regulation and Signalling in Macrophages,” in *Immunobiol*, pp. 477–490, 1996.
- [79] L. Kuhn, G. Ou, L. Charles, M. Hurley, C. Rodner, and G. Gronowicz, “Fibroblast Growth Factor-2 and Bone Morphogenetic Protein-2 Have a Synergistic Stimulatory Effect on Bone Formation in Cell Cultures From Elderly Mouse and Human Bone.,” *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, vol. 68(10), pp. 1170–1180, 2013.
- [80] P. Kuo, Y.-T. Huang, C. Chang, and J. Chang, “Bone Morphogenetic Protein-2 and -4 (BMP-2 and -4) Mediates Fraxetin-Induced Maturation and Differentiation in Human Osteoblast-Like Cell Lines,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 29(1), pp. 119–124, 2006.
- [81] P. Kasten, J. Bogel, I. Beyen, and S. Weiss, “Effect of Platelet-rich Plasma on the in vitro Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Distinct Calcium Phosphate Scaffolds: The Specific Surface Area Makes a Difference,” *Journal of Biomaterials applications*, vol. 23, pp. 169–188, 2008.

- [82] P. Bonvallet, M. Schultz, E. Mitchell, J. Brain, K. Culpepper, S. Thomas, and S. Bellis, “Microporous Dermal-Mimetic Electrospun Scaffolds Pre-Seeded with Fibroblasts Promote Tissue Regeneration in Full-Thickness Skin Wounds,” *PloS ONE*, vol. 10(3), pp. 1–17, 2015.
- [83] E. Cottam, D. Hukins, K. Lee, C. Hewitt, and M. Jenkins, “Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material.,” *Medical Engineering & Physics*, vol. 31, pp. 221–226, 2009.
- [84] P. Flecknell, “Replacement, Reduction and Refinement.,” in *Altex*, pp. 73–77, 2002.
- [85] A. Ivanov, M. Kozadaev, N. Bogomolova, O. Matveeva, M. Punchin’yan, I. Norkin, Y. Salkovsky, and G. Lyubun, “Biocompatibility of Polycaprolactone and Hydroxyapatite Matrices in vivo.,” *Cell and Tissue Biology*, vol. 9, pp. 422–429, 2015.

Apêndices

.1 PBS

O procedimento consiste em adicionar a um frasco *Schott* de 500 ml estéril (Duran, 00361668, Alemanha) 7,4 g de Na_2HPO_4 (Panreac, 1319651211, Espanha), 0,215 g de KH_2PO_4 (Merck, 6580, EUA), 3,6 g de NaCl (Sigma, S7653, EUA) e 500 ml de água ultra pura. No fim, o pH é ajustado a 7,4 e o frasco é fechado e rotulado.

.2 MTT

O procedimento consiste em adicionar 4 mg de MTT para 10 ml de PBS estéril. Homogeneiza-se a solução com um vórtex e filtra-se a mesma para a tornar estéril.

.3 Tabelas

Tabela 1: Fibroblastos - 3 dias

Formulação				Controlo	Óxido etileno	Plasma	Gamma	Max	Qual	Óxido etileno (%)	Plasma (%)	Gamma (%)
1/1/0/300/45/3	PCL	300	45	0,143	1,51	1,77	1,57	1,77	Plasma	85,31	100,00	88,70
1/1/0/300/90/3			90	0,143	1,3	1,72	1,73	1,73	Gamma	75,14	99,42	100,00
1/1/0/600/45/3		600	45	0,143	1,15	0,81	1,34	1,34	Gamma	85,82	60,45	100,00
1/1/0/600/90/3			90	0,143	0,84	0,69	0,75	0,84	Óxido etileno	100,00	82,14	89,29
1/2/10/300/45/3	PCL + HA N 10%	300	45	0,143	1,96	1,98	1,86	1,98	Plasma	98,99	100,00	93,94
1/2/10/300/90/3			90	0,143	1,92	1,86	1,72	1,92	Óxido etileno	100,00	96,88	89,58
1/2/10/600/45/3		600	45	0,143	1,81	0,86	1,5	1,81	Óxido etileno	100,00	47,51	82,87
1/2/10/600/90/3			90	0,143	0,91	1,15	1,39	1,39	Gamma	65,47	82,73	100,00
1/2/25/300/45/3	PCL + HA N 25%	300	45	0,143	2,14	2,14	2,09	2,14	Óxido etileno	100,00	100,00	97,66
1/2/25/300/90/3			90	0,143	2,01	2,35	2,3	2,35	Plasma	85,53	100,00	97,87
1/2/25/600/45/3		600	45	0,143	1,1	1,64	1,5	1,64	Plasma	67,07	100,00	91,46
1/2/25/600/90/3			90	0,143	0,91	0,99	0,77	0,99	Plasma	91,92	100,00	77,78
1/3/10/300/45/3	PCL + HA S 10%	300	45	0,143	1,95	1,87	1,63	1,95	Óxido etileno	100,00	95,90	83,59
1/3/10/300/90/3			90	0,143	1,45	1,66	1,43	1,66	Plasma	87,35	100,00	86,14
1/3/10/600/45/3		600	45	0,143	1,11	1,19	1,4	1,4	Gamma	79,29	85,00	100,00
1/3/10/600/90/3			90	0,143	0,77	1,27	1,38	1,38	Gamma	55,80	92,03	100,00
1/3/25/300/45/3	PCL + HA S 25%	300	45	0,143	2,15	1,98	2,45	2,45	Gamma	87,76	80,82	100,00
1/3/25/300/90/3			90	0,143	1,71	1,88	1,69	1,88	Plasma	90,96	100,00	89,89
1/3/25/600/45/3		600	45	0,143	1,22	1,37	2,01	2,01	Gamma	60,70	68,16	100,00
1/3/25/600/90/3			90	0,143	1,71	0,84	0,98	1,71	Óxido etileno	100,00	49,12	57,31

Tabela 2: Fibroblastos - 7 dia

Formulação				Controlo	Óxido etileno	Plasma	Gamma	Max	Qual	Óxido etileno %	Plasma%	Gama%
1/1/0/300/45/3 1/1/0/300/90/3 1/1/0/600/45/3 1/1/0/600/90/3	PCL	300	45	0,154	1,61	1,51	1,64	1,64	Gamma	98,17	92,07	100,00
			90	0,154	1,07	1,73	1,75	1,75	Gamma	61,14	98,86	100,00
	600	45	0,154	1,15	1,42	0,86	1,42	Plasma	80,99	100,00	60,56	
		90	0,154	0,72	0,75	0,77	0,77	Gamma	93,51	97,40	100,00	
1/2/10/300/45/3 1/2/10/300/90/3 1/2/10/600/45/3 1/2/10/600/90/3	PCL + HA N 10%	300	45	0,154	1,89	1,94	1,86	1,94	Plasma	97,42	100,00	95,88
			90	0,154	2,17	1,51	2,24	2,24	Gamma	96,88	67,41	100,00
	600	45	0,154	1,13	1,98	1,88	1,98	Plasma	57,07	100,00	94,95	
		90	0,154	1,18	0,83	1,28	1,28	Gamma	92,19	64,84	100,00	
1/2/25/300/45/3 1/2/25/300/90/3 1/2/25/600/45/3 1/2/25/600/90/3	PCL + HA N 25%	300	45	0,154	0,2	1,94	1,91	1,94	Plasma	10,31	100,00	98,45
			90	0,154	2,1	1,49	1,31	2,1	Óxido etileno	100,00	70,95	62,38
	600	45	0,154	1,34	1,29	1,24	1,34	Óxido etileno	100,00	96,27	92,54	
		90	0,154	1,13	0,89	0,96	1,13	Óxido etileno	100,00	78,76	84,96	
1/3/10/300/45/3 1/3/10/300/90/3 1/3/10/600/45/3 1/3/10/600/90/3	PCL + HA S 10%	300	45	0,154	1,69	1,6	1,56	1,69	Óxido etileno	100,00	94,67	92,31
			90	0,154	1,55	2,04	1,84	2,04	Plasma	75,98	100,00	90,20
	600	45	0,154	1,2	1,09	1,07	1,2	Óxido etileno	100,00	90,83	89,17	
		90	0,154	0,75	1,06	0,69	1,06	Plasma	70,75	100,00	65,09	
1/3/25/300/45/3 1/3/25/300/90/3 1/3/25/600/45/3 1/3/25/600/90/3	PCL + HA S 25%	300	45	0,154	1,86	2	1,98	2	Plasma	93,00	100,00	99,00
			90	0,154	1,8	1,65	1,38	1,8	Óxido etileno	100,00	91,67	76,67
	600	45	0,154	1,59	1,81	1,23	1,81	Plasma	87,85	100,00	67,96	
		90	0,154	1,04	0,79	0,17	1,04	Óxido etileno	100,00	75,96	16,35	

Tabela 3: Co-cultura - 3 dias

Formulação				Controlo	Óxido etileno	Plasma	Gamma	Max	Qual	Óxido etileno %	Plasma %	Gamma %
12/1/0/300/45/3 12/1/0/300/90/3 12/1/0/600/45/3 12/1/0/600/90/3	PCL	300	45	0,166	1,31	1,6	1,7	1,7	Gamma	77,06	94,12	100,00
			90	0,166	1,2	1,7	1,8	1,8	Gamma	66,67	94,44	100,00
	600	45	0,166	1,37	0,92	1,19	1,37	Óxido etileno	100,00	67,15	86,86	
		90	0,166	0,76	0,97	1,71	1,71	Gamma	44,44	56,73	100,00	
12/2/10/300/45/3 12/2/10/300/90/3 12/2/10/600/45/3 12/2/10/600/90/3	PCL + HA N 10%	300	45	0,166	2,05	2,15	1,71	2,15	Plasma	95,35	100,00	79,53
			90	0,166	2,09	1,67	1,43	2,09	Óxido etileno	100,00	79,90	68,42
	600	45	0,166	1,21	1,8	1,66	1,8	Plasma	67,22	100,00	92,22	
		90	0,166	0,72	1	1,23	1,23	Gamma	58,54	81,30	100,00	
12/2/25/300/45/3 12/2/25/300/90/3 12/2/25/600/45/3 12/2/25/600/90/3	PCL + HA N 25%	300	45	0,166	1,92	2	1,9	2	Plasma	96,00	100,00	95,00
			90	0,166	1,99	1,54	2,28	2,28	Gamma	87,28	67,54	100,00
	600	45	0,166	1,06	1,44	1,51	1,51	Gamma	70,20	95,36	100,00	
		90	0,166	1,42	0,97	0,97	1,42	Óxido etileno	100,00	68,31	68,31	
12/3/10/300/45/3 12/3/10/300/90/3 12/3/10/600/45/3 12/3/10/600/90/3	PCL + HA S 10%	300	45	0,166	1,91	1,97	1,58	1,97	Plasma	96,95	100,00	80,20
			90	0,166	1,5	2,05	1,34	2,05	Plasma	73,17	100,00	65,37
	600	45	0,166	1,4	1,23	1,17	1,4	Óxido etileno	100,00	87,86	83,57	
		90	0,166	0,78	0,63	1,16	1,16	Gamma	67,24	54,31	100,00	
12/3/25/300/45/3 12/3/25/300/90/3 12/3/25/600/45/3 12/3/25/600/90/3	PCL + HA S 25%	300	45	0,166	2,02	1,8	2	2,02	Óxido etileno	100,00	89,11	99,01
			90	0,166	1,78	1,37	1,94	1,94	Gamma	91,75	70,62	100,00
	600	45	0,166	1,12	1,29	1,78	1,78	Gamma	62,92	72,47	100,00	
		90	0,166	1,25	0,85	0,96	1,25	Óxido etileno	100,00	68,00	76,80	

Tabela 4: Co-cultura - 5 dias

Formulação				Controlo	Óxido etileno	Plasma	Gamma	Max	Qual	Óxido etileno %	Plasma %	Gama %
12/1/0/300/45/3	PCL	300	45	0,146	1,47	1,76	1,47	1,76	Plasma	83,52	100,00	85,52
12/1/0/300/90/3			90	0,146	1,66	2,07	1,77	2,07	Plasma	80,19	100,00	85,51
12/1/0/600/45/3		600	45	0,146	0,85	1,13	0,98	1,13	Plasma	75,22	100,00	86,73
12/1/0/600/90/3			90	0,146	0,68	0,8	0,57	0,8	Plasma	85,00	100,00	71,25
12/2/10/300/45/3	PCL + HA N 10%	300	45	0,146	2,08	2,62	2,01	2,62	Plasma	79,39	100,00	76,72
12/2/10/300/90/3			90	0,146	1,85	1,52	1,87	1,87	Gamma	98,93	81,28	100,00
12/2/10/600/45/3		600	45	0,146	1,2	1,54	0,98	1,54	Plasma	77,92	100,00	63,64
12/2/10/600/90/3			90	0,146	0,92	1,49	0,98	1,49	Plasma	61,74	100,00	65,77
12/2/25/300/45/3	PCL + HA N 25%	300	45	0,146	1,69	2,42	1,85	2,42	Plasma	69,83	100,00	76,45
12/2/25/300/90/3			90	0,146	1,98	2,54	2,36	2,54	Plasma	77,95	100,00	92,91
12/2/25/600/45/3		600	45	0,146	1,12	1,62	1,26	1,62	Plasma	69,14	100,00	77,78
12/2/25/600/90/3			90	0,146	0,69	1,06	0,78	1,06	Plasma	65,09	100,00	73,58
12/3/10/300/45/3	PCL + HA S 10%	300	45	0,146	1,73	1,99	1,66	1,99	Plasma	86,93	100,00	83,42
12/3/10/300/90/3			90	0,146	1,19	1,48	1,42	1,48	Plasma	80,41	100,00	95,95
12/3/10/600/45/3		600	45	0,146	1,02	1,16	0,88	1,16	Plasma	87,93	100,00	75,86
12/3/10/600/90/3			90	0,146	0,77	1,16	0,65	1,16	Plasma	66,38	100,00	56,03
12/3/25/300/45/3	PCL + HA S 25%	300	45	0,146	2,03	1,91	1,8	2,03	Óxido etileno	100,00	94,09	88,67
12/3/25/300/90/3			90	0,146	1,4	1,98	1,98	1,98	Plasma	70,71	100,00	100,00
12/3/25/600/45/3		600	45	0,146	1,04	1,4	1,02	1,4	Plasma	74,29	100,00	72,86
12/3/25/600/90/3			90	0,146	0,76	0,96	0,74	0,96	Plasma	79,17	100,00	77,08

Tabela 5: Macrófagos - 3 dias

Formulação				Controlo	Óxido etileno	Plasma	Gamma	Max	Qual	Óxido etileno %	Plasma %	Gamma %
2/1/0/300/45/3	PCL	300	45	0,1815	1,55	1,5	1,68	1,68	Gamma	92,26	89,29	100,00
2/1/0/300/90/3			90	0,1815	1,23	1,66	1,84	1,84	Gamma	66,85	90,22	100,00
2/1/0/600/45/3		600	45	0,1815	1,06	1,31	1,53	1,53	Gamma	69,28	85,62	100,00
2/1/0/600/90/3			90	0,1815	0,73	0,85	0,82	0,85	Plasma	85,88	100,00	96,47
2/2/10/300/45/3	PCL + HA N 10%	300	45	0,1815	1,96	2,1	1,98	2,1	Plasma	93,33	100,00	94,29
2/2/10/300/90/3			90	0,1815	2,11	1,77	1,88	2,11	Óxido etileno	100,00	83,89	89,10
2/2/10/600/45/3		600	45	0,1815	1,46	1,55	1,94	1,94	Gamma	75,26	79,90	100,00
2/2/10/600/90/3			90	0,1815	0,71	0,79	1,36	1,36	Gamma	52,21	58,09	100,00
2/2/25/300/45/3	PCL + HA N 25%	300	45	0,1815	1,93	1,82	2,05	2,05	Gamma	94,15	88,78	100,00
2/2/25/300/90/3			90	0,1815	1,87	2,04	2,08	2,08	Gamma	89,90	98,08	100,00
2/2/25/600/45/3		600	45	0,1815	1,24	1,28	2,23	2,23	Gamma	55,61	57,40	100,00
2/2/25/600/90/3			90	0,1815	0,85	0,74	0,84	0,85	Óxido etileno	100,00	87,06	98,82
2/3/10/300/45/3	PCL + HA S 10%	300	45	0,1815	1,6	1,77	1,76	1,77	Plasma	90,40	100,00	99,44
2/3/10/300/90/3			90	0,1815	1,4	1,15	1,8	1,8	Gamma	77,78	63,89	100,00
2/3/10/600/45/3		600	45	0,1815	1,21	0,92	1,78	1,78	Gamma	67,98	51,69	100,00
2/3/10/600/90/3			90	0,1815	0,81	1,17	1,78	1,78	Gamma	45,51	65,73	100,00
2/3/25/300/45/3	PCL + HA S 25%	300	45	0,1815	1,99	1,93	2,01	2,01	Gamma	99,00	96,02	100,00
2/3/25/300/90/3			90	0,1815	1,85	1,71	1,88	1,88	Gamma	98,40	90,96	100,00
2/3/25/600/45/3		600	45	0,1815	1,51	2,48	2,1	2,48	Plasma	60,89	100,00	84,68
2/3/25/600/90/3			90	0,1815	1,62	0,83	1,19	1,62	Óxido etileno	100,00	51,23	73,46